



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας

***Επίδραση εκδόχων και άλλων παραγόντων
στη σταθερότητα και φωτοσταθερότητα
δραστικών ενώσεων
σε διαλύματα και σε στερεές φαρμακευτικές
μορφές***

***Όλγα Γαλανοπούλου
Χημικός ΕΚΠΑ***

Αθήνα 2014

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Αικατερίνη Αντωνιάδου –Βυζά	Καθηγήτρια, Επιβλέπουσα
Μιχαήλ Κουμπάρης	Καθηγητής
Εμμανουήλ Μικρός	Καθηγητής

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Αικατερίνη Αντωνιάδου –Βυζά	Καθηγήτρια
Μιχαήλ Κουμπάρης	Καθηγητής
Εμμανουήλ Μικρός	Καθηγητής
Άννα Τσαντίλη-Κακουλίδου	Καθηγήτρια
Ειρήνη Παντερή	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Ευάγγελος Γκίκας	Επίκουρος Καθηγητής
Ιωάννης Ντότσικας	Λέκτορας

*Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από τη Σχολή Θετικών Επιστημών του
Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του
συγγραφέα .(Ν .5343/1932 Άρθρο 202)*

Η έρευνα είναι συχνά ένα μοναχικό ταξίδι, που ο προορισμός του μπορεί να φαίνεται ως το αποτέλεσμα και το συμπέρασμα, η ουσία κρύβεται στην ίδια τη διαδρομή. Αυτή που την ξεκινά κανείς με εφόδιο την περιέργεια και μέρα με τη μέρα, βήμα με το βήμα την εξελίσσει σε σκέψεις και γνώσεις, σε εργασίας και μεθοδικότητα, σε αντίληψη και τρόπο ζωής.

Για το ταξίδι αυτό, που όταν κανείς το αγαπήσει, τελειωμό δεν έχει, θέλω να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια, κ. Αντωνιάδου-Βυζά. Στην επιμονή και την πίστη της οφείλεται η ολοκλήρωση της ερευνητικής εργασίας.

Στους ανθρώπους που η συμβολή τους είναι σύντομη αλλά λυτρωτική σε κομβικές στιγμές ανήκει ο κ. Χατζούδης, του Ερευνητικού Ιδρύματος «Δημόκριτος». Οι γνώσεις του και η χρόνια ενασχόλησή του με τις φωτοχημικές αντιδράσεις, με βοήθησαν στην κατανόηση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Οφείλω να αναφέρω πως δίχως την υποστήριξη της φαρμακευτικής βιομηχανίας ΕΛΠΕΝ ΑΕ, στην οποία εργάζομαι, δεν θα είχα την ευχέρεια να πραγματοποιήσω την συγκεκριμένη ερευνητική εργασία, τόσο χρονικά όσο και υλικοτεχνικά. Η διαρκής αναζήτηση είναι σημαντικό μέρος της φιλοσοφίας αλλά και τρόπος ζωής του ιδρυτή της, κ. Πενταφράγκα Δημήτρη. Η κ. Ρόζου Σταυρούλα, τόσο με τρέχουσα ιδιότητα της διευθύντριας του Αναλυτικού Ερευνητικού Τμήματος όσο και με την παλαιότερη της ερευνήτριας του Ε.Κ.Π.Α. αγκάλιασε, συζήτησε και παρείχε τεχνογνωσία, δίνοντας δυνατότητες εφαρμογής των αποτελεσμάτων της έρευνας.

Όταν ένα ταξίδι τελειώνει, υπάρχουν πράγματα που τα αφήνουμε και πρέπει να τα αφήνουμε πίσω. Αυτά που κρατάμε, είναι αυτά που θα ορίσουν ποιο θα είναι το επόμενο ταξίδι ...

Περιεχόμενα

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A.	ΕΚΔΟΧΑ	17
A.1.	Έκδοχα και δραστικές	17
A.1.1.	Τρόποι αποικοδόμησης φαρμάκων	18
A.1.2.	Άμεσες αλληλεπιδράσεις μεταξύ εκδόχων και δραστικών	20
A.1.3.	Αποτελέσματα αλληλεπίδρασης μεταξύ εκδόχων και δραστικών σε στερεές φαρμακευτικές μορφές στη βιοδιαθεσιμότητα φαρμάκων	22
A.1.4.	Αλληλεπιδράσεις μεταξύ εκδόχων και δραστικών συστατικών σε στερεές φαρμακευτικές μορφές που επηρεάζουν τη φαρμακοκινητική	23
A.1.5.	Καταλληλότητα εκδόχων σε φαρμακευτικά σκευάσματα	25
A.2.	Πολυμερή Έκδοχα	26
A.2.1.	Σκευάσματα με πολυμερή	27
A.3.	Εφαρμογές Εύχρηστων Πολυμερών	33
A.3.1.	Κιτοσάνη	33
A.3.2.	Μικύλλια	34
A.3.3.	Κολλαγόνο	35
A.3.4.	Κυκλοδεξτρίνες	36
A.3.5.	Πολυ-βινυλοπυρρολιδονη	38
A.4.	Σκευάσματα πολυμερών και αλληλεπιδράσεις	38
A.4.1.	Σκευάσματα διασποράς στερεών	38
A.4.2.	Προβλήματα σκευασμάτων διασποράς στερεών	39
B.	ΠΟΛΥ-ΒΙΝΥΛΟΠΥΡΡΟΛΙΔΟΝΗ (PVP)	41
B.1.	Αναλυτικές τεχνικές – πολυμερή	42
B.2.	Χαρακτηριστικά PVP - Ιδιότητες (Tg, δίκτυο πολυμερούς, φορέας)	45
B.3.	Παρασκευή μακρομοριακών συστημάτων – Σύνδεση με μη ομοιοπολικούς δεσμούς	47
B.4.	PVP, T_g, και μίγματά του	49
B.4.1.	Πολυ-αιθυλενογλυκόλη	49
B.4.2.	Σουκρόζη	50
B.4.3.	Πολυακρυλικό οξύ	50
B.5.	Αλληλεπιδράσεις PVP με δραστικές ουσίες	52

B.6.	Θερμοκρασία Μετάβασης στην Υαλώδη από την Άμορφη Κατάσταση	55
B.7.	Πολυ-βινυλοπυρρολιδόνη ως παράγοντας σταθεροποίησης	58
Γ.	ΦΩΤΟΧΗΜΙΚΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ	63
Γ.1.	Εισαγωγή – Φωτεινή ενέργεια	63
Γ.2.	Σκευάσματα –Φαρμακευτικές ουσίες και φωτοδιασπάσεις	65
Γ.3.	Παράμετροι φωτοχημικής αποικοδόμησης	66
Γ.4.	Φωτοπροστασία φαρμάκων	68
Γ.5.	Ακτινομετρικό σύστημα – Διωδρική υδροχλωρική κινίνη	68
Δ.	ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΩΝΤΑΙ	71
Δ.1.	Καρβεδιλόλη	71
Δ.1.1.	Καρβεδιλόλη: Δομή και φαρμακολογική δράση	71
Δ.1.2.	Δομή καρβεδιλόλης στο χώρο	72
Δ.1.3.	Καρβεδιλόλη: Μεταβολισμός	72
Δ.1.4.	Δράση	74
Δ.2.	Μετρονιδαζόλη	76
Δ.2.1.	Μετρονιδαζολη: Δομή και φαρμακολογική δράση	76
Δ.2.2.	Μετρονιδαζολη: Μεταβολισμός-Φαρμακοκινητική	76
Δ.2.3.	Μετρονιδαζολη: Δράση	77
Δ.2.4.	Μετρονιδαζολη: Άλλες αναφορές	77

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

E.	ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΟΣ ΚΑΡΒΕΔΙΛΟΛΗΣ	81
E.1.	Εισαγωγή	81
E.1.1.	Χρησιμοποιούμενα μέσα	81
E.1.2.	Καρβεδιλόλη	83
E.1.3.	Διεθνείς οδηγίες	84
E.1.4.	Παρακολούθηση δισκίων καρβεδιλόλης	85
E.2.	Προκαταρκτικά πειράματα για να διαπιστωθεί η προέλευση του αγνώστου προϊόντος	87
E.2.1.	Διερεύνηση προέλευσης αγνώστου προϊόντος	87
E.2.2.	Μελέτη της επίδρασης της αναλογίας καρβεδιλόλης και πολυβινυλο-πυρρολιδόνης στην εμφάνιση του αγνώστου προϊόντος	89
E.3.	Πειράματα εκτίμησης συνθηκών εμφάνισης	91

E.3.1.	Μελέτη συνθηκών σχηματισμού	91
E.3.2.	Σύγκριση ποιότητας πολυβινυλοπυρρολιδονών	95
ΣΤ.	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΓΝΩΣΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ	107
ΣΤ.1.	Προσπάθεια παραλαβής με εκχύλιση	107
ΣΤ.2.	Προσπάθεια παραλαβής με λυοφιλοποίηση	112
Z.	ΠΡΟΣΠΑΘΕΙΕΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΓΝΩΣΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ	115
Z.1.	Φασματοσκοπία και φασματομετρία αγνώστου προϊόντος	115
Z.1.1.	Μελέτη ¹ H-NMR	115
Z.1.2.	Μελέτη του δείγματος του απομονωμένου αγνώστου προϊόντος I με φασματομετρία μάζας	122
Z.2.	Προσπάθεια απομάκρυνσης αλάτων από το έκλουσμα αγνώστου προϊόντος	126
Z.3.	Σχολιασμός πολικότητας αγνώστου προϊόντος σε σχέση με την καρβεδιλόλη	128
Z.4.	Επίδραση του pH του διαλύματος παραμονής στο άγνωστο προϊόν	129
Z.5.	Παρακολούθηση της συμπεριφοράς του αγνώστου προϊόντος και της καρβεδιλόλης σε διαφορετικά pH κινητής φάσης	132
H.	Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΝΕΡΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗ ΦΥΛΑΞΗ ΤΩΝ ΜΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΡΒΕΔΙΛΟΛΗ-PVP ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΟΥ ΤΗ ΔΙΚΑΙΟΛΟΓΟΥΝ	137
Θ.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΟΣ ΚΑΡΒΕΔΙΛΟΛΗΣ	147
I.	ΝΕΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΔΙΑΣΠΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΑΡΒΕΔΙΛΟΛΗΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΪΟΝ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ	151
I.1.	Απομόνωση Αγνώστων Προϊόντων 2 και 3	152
I.2.	Φασματομετρία μάζας	153
I.3.	Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού	156
I.4.	Παρακολούθηση της χρωματογραφικής συμπεριφοράς των	158

I.5.	αγνώστων προϊόντων σε αλλαγές του pH της κινητής φάσης Συσχέτιση της εμφάνισης των αγνώστων προϊόντων με την περιεχόμενη υγρασία σε μίγματα PVP και καρβεδιλόλης	159
I.6.	Συμπεράσματα – Σχόλια	161
IA.	ΜΕΛΕΤΗ ΦΩΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΚΑΡΒΕΔΙΛΟΛΗΣ	163
IA.1.	Πειραματικές συνθήκες ελέγχου φωτοσταθερότητας της καρβεδιλόλης	163
IA.1.1.	Σύστημα ελέγχου φωτοσταθερότητας της καρβεδιλόλης	164
IA.1.2.	Αξιολόγηση της ομοιομορφίας στη διαπερατότητα των κυψελίδων	166
IA.1.3.	Έλεγχος επαναληψιμότητας φωτόλυσης	167
IA.1.4.	Περιγραφή διαδικασίας αλληλουχίας δειγματοληψιών	170
IA.2.	Παρακολούθηση της μεταβολής της συγκέντρωσης των εναντιομερών κατά την φωτοεπαγόμενη αποικοδόμηση μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης	171
IA.2.1.	Ανάπτυξη Χρωματογραφικής Μεθόδου	172
IA.2.2.	Εκτίμηση της φωτοχημικής αποικοδόμησης των επιμερών της καρβεδιλόλης για μικρό χρονικό διάστημα	180
IA.2.3.	Παρακολούθηση φωτοχημικής αποικοδόμησης μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης για χρόνο ίσο με $t_{1/2}$	183
IA.2.4.	Αποτελέσματα – Συμπεράσματα	190
IA.3.	Παρακολούθηση της φωτοχημικής αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης σε μεθανολικά διαλύματα	191
IA.3.1.	Επίδραση αρχικής συγκέντρωσης του δείγματος στην ταχύτητα των φωτοχημικών διεργασιών	191
IA.3.2.	Μελέτη φωτοχημικής αποικοδόμησης μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης με αρχική συγκέντρωση $1,1 \times 10^{-2}$ M	192
IA.3.3.	Μελέτη φωτοχημικής αποικοδόμησης μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης με αρχική συγκέντρωση $9,94 \times 10^{-4}$ M	196
IA.3.4.	Μελέτη φωτοχημικής αποικοδόμησης μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης με αρχική συγκέντρωση $1,09 \times 10^{-4}$ M	199
IA.3.5.	Μελέτη φωτοχημικής αποικοδόμησης μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης με αρχική συγκέντρωση $1,1 \times 10^{-5}$ M	201
IA.3.6.	Μελέτη φωτοχημικής αποικοδόμησης μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης με αρχική συγκέντρωση $1,0 \times 10^{-6}$ M	202
IA.3.7.	Παρακολούθηση της Φωτοχημικής αποικοδόμησης μεθανολικών διαλυμάτων καρβεδιλόλης σε συγκεντρώσεις από 10^{-6} έως 10^{-5} M.	205

ΙΑ.3.8.	Αποτελέσματα – Συμπεράσματα	208
ΙΑ.4.	Μελέτη της επίδραση του διαλυτικού μέσου στις φωτοεπαγόμενες διεργασίες αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης	213
ΙΑ.4.1.	Παρακολούθηση της φωτοχημικής αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης σε μίγμα μεθανόλης/νερού και μεθανόλης/ρυθμιστικού διαλύματος	214
ΙΑ.4.2.	Παρακολούθηση της φωτοχημικής αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης στα επίπεδα συγκέντρωσης 10^{-4} και 10^{-5} M σε μίγματα μεθανόλης νερού σε διαφορετικές αναλογίες	216
ΙΑ.5.	Η επίδραση της παρουσίας εκδόχων στη φωτοχημική αποικοδόμηση της καρβεδιλόλης	222
ΙΑ.5.1.	Παρακολούθηση της φωτοχημικής αποικοδόμησης μεθανολικού διαλύματος της καρβεδιλόλης με αρχική συγκέντρωση $2,61 \times 10^{-3}$ M και παρουσία 4,2 g/L PVP.	223
ΙΑ.5.2.	Παρακολούθηση της φωτοχημικής αποικοδόμησης μεθανολικού διαλύματος της καρβεδιλόλης με αρχική συγκέντρωση $2,08 \times 10^{-5}$ M και παρουσία 4,2 g/L PVP	227
ΙΑ.5.3.	Παρακολούθηση της φωτοχημικής αποικοδόμησης μεθανολικού διαλύματος της καρβεδιλόλης με αρχική συγκέντρωση $2,14 \times 10^{-3}$ M και παρουσία 9,7 g/L PVP	229
ΙΑ.5.4.	Παρακολούθηση της φωτοχημικής αποικοδόμησης μεθανολικού διαλύματος της καρβεδιλόλης με αρχική συγκέντρωση $1,72 \times 10^{-5}$ M και παρουσία 9,7 g/L PVP	231
ΙΑ.5.5.	Παρακολούθηση της φωτοχημικής αποικοδόμησης μεθανολικού διαλύματος της καρβεδιλόλης με αρχική συγκέντρωση $2,12 \times 10^{-3}$ M και παρουσία 0,19 g/L PVP	234
ΙΑ.5.6.	Παρακολούθηση της φωτοχημικής αποικοδόμησης μεθανολικού διαλύματος της καρβεδιλόλης με αρχική συγκέντρωση $1,69 \times 10^{-5}$ M και παρουσία 0,19 g/L PVP	236
ΙΑ.5.7.	Παρατηρήσεις –Συμπεράσματα	238
ΙΑ.5.8.	Παρακολούθηση της φωτοχημικής αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης με αρχική συγκέντρωση 2×10^{-5} M, σε μεθανολικά διαλύματα παρουσία 4,3 g/L και 0,17 g/L PVP και σε μίγμα μεθανόλης νερού παρουσία 4,3 g/L PVP	241
ΙΑ.5.9.	Έλεγχος παρουσίας PVP στην παρεχόμενη από την ακτινοβολία ενέργεια κατά τη χημική αποικοδόμηση ακτινομετρικού συστήματος	246
ΙΑ.5.10	Παρατηρήσεις –Συμπεράσματα	249

IB.	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΗΣ ΣΤΟΝ ΡΥΘΜΟ ΦΩΤΟΛΥΤΙΚΗΣ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΚΑΡΒΕΔΙΛΟΛΗΣ	251
IB.1.	Παρακολούθηση πορείας συμπλοκοποίησης της β-CD με την καρβεδιλόλη, με διαλύτη μίγμα μεθανόλης και νερού	251
IB.2.	Χρωματογραφική παρακολούθηση της πορείας συμπλοκοποίησης της καρβεδιλόλης με HP-β-CD	255
IB.3.	Παρακολούθηση της φωτοεπαγώμενης αποικοδόμησης υδατικού διαλύματος της καρβεδιλόλης παρουσία υποκατεστημένης β-Κυκλοδεξτρίνης	262
ΙΓ.	ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΚΑΡΒΕΔΙΛΟΛΗΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ¹H-NMR	265
ΙΓ.1.	Απόδοση κορυφών καρβεδιλόλης με ¹ H-NMR σε μεθανόλη	265
ΙΓ.2.	Μελέτη φασματικών μεταβολών της καρβεδιλόλης σε διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων	269
ΙΓ.2.1.	Μελέτη φασματικών μεταβολών της καρβεδιλόλης σε μεθανολικά διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων	269
ΙΓ.2.2.	Μελέτη φασματικών μεταβολών της καρβεδιλόλης σε διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων, με διαλύτη MeOD/D ₂ O 80/20 v/v	273
ΙΓ.3.	Επίδραση σύστασης του διαλύτη στην έκταση των φαινομένων	277
ΙΓ.4.	Παρατηρήσεις – Σχόλια	282
ΙΔ.	ΜΕΛΕΤΗ ΦΩΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕΤΡΟΝΙΔΑΖΟΛΗΣ	287
ΙΔ.1.	Παρακολούθηση της φωτοχημικής αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης σε υδατικό περιβάλλον	289
ΙΔ.1.1.	Μελέτη φωτοχημικής αποικοδόμησης υδατικού διαλύματος μετρονιδαζόλης με αρχική συγκέντρωση $5,20 \times 10^{-3}$ M	291
ΙΔ.1.2.	Μελέτη φωτοχημικής αποικοδόμησης υδατικού διαλύματος μετρονιδαζόλης με αρχική συγκέντρωση $3,80 \times 10^{-3}$ M	291
ΙΔ.1.3.	Μελέτη φωτοχημικής αποικοδόμησης υδατικού διαλύματος μετρονιδαζόλης με αρχική συγκέντρωση $2,56 \times 10^{-3}$ M	293
ΙΔ.1.4.	Μελέτη φωτοχημικής αποικοδόμησης υδατικού διαλύματος	294

	μετρονιδαζόλης με αρχική συγκέντρωση $1,20 \times 10^{-3}$ M	
ΙΔ.1.5.	Μελέτη φωτοχημικής αποικοδόμησης υδατικού διαλύματος μετρονιδαζόλης με αρχική συγκέντρωση $7,96 \times 10^{-4}$ M	296
ΙΔ.1.6.	Μελέτη φωτοχημικής αποικοδόμησης υδατικού διαλύματος μετρονιδαζόλης με αρχική συγκέντρωση $5,12 \times 10^{-4}$ M	297
ΙΔ.1.7.	Μελέτη φωτοχημικής αποικοδόμησης υδατικού διαλύματος μετρονιδαζόλης με αρχική συγκέντρωση $2,06 \times 10^{-4}$ M	299
ΙΔ.1.8.	Μελέτη φωτοχημικής αποικοδόμησης υδατικού διαλύματος μετρονιδαζόλης με αρχική συγκέντρωση $1,04 \times 10^{-4}$ M	301
ΙΔ.1.9.	Μελέτη φωτοχημικής αποικοδόμησης υδατικού διαλύματος μετρονιδαζόλης με αρχική συγκέντρωση $8,40 \times 10^{-5}$ M	302
ΙΔ.1.10.	Μελέτη φωτοχημικής αποικοδόμησης υδατικού διαλύματος μετρονιδαζόλης με αρχική συγκέντρωση $5,00 \times 10^{-5}$ M	304
ΙΔ.1.11.	Μελέτη φωτοχημικής αποικοδόμησης υδατικού διαλύματος μετρονιδαζόλης με αρχική συγκέντρωση $2,03 \times 10^{-5}$ M	305
ΙΔ.1.12.	Μελέτη φωτοχημική αποικοδόμησης υδατικού διαλύματος μετρονιδαζόλης με αρχική συγκέντρωση $1,00 \times 10^{-5}$ M	306
ΙΔ.1.13.	Σχόλια – Παρατηρήσεις	307
ΙΔ.2.	Αποικοδόμηση μετρονιδαζόλης σε διαφορετικά pH του διαλύτη	310
ΙΔ.3.	Μελέτη του ρυθμού φωτοχημικών μεταβολών της μετρονιδαζόλης παρουσία διαφορετικών εκδόχων	316
ΙΔ.3.1.	Επίδραση απλών και γραμμικών εκδόχων στην φωτοχημική αποικοδόμηση της μετρονιδαζόλης	317
ΙΔ.3.2.	Επίδραση κυκλοδεξτρινών στην φωτοχημική αποικοδόμηση της μετρονιδαζόλης	322
ΙΔ.4.	Φασματοσκοπία μετρονιδαζόλης	327
ΙΕ.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΦΩΤΟΧΗΜΙΚΩΝ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΕΩΝ	329
ΙΣΤ.	ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	341
ΙΣΤ.1.	Αναλυτικές τεχνικές –Χρωματογραφία	341
ΙΣΤ.1.1.	Εισαγωγή	341
ΙΣΤ.1.2.	Στατική Φάση	341
ΙΣΤ.1.3.	Κινητή Φάση	343
ΙΣΤ.1.4.	Ανιχνευτής	344
ΙΣΤ.2.	Καρβεδιλόλη -Αναλυτικές τεχνικές προσδιορισμού	346
ΙΣΤ.3.	Καρβεδιλόλη -Βιομηχανικός προσδιορισμός σε δισκία	348

	(ELPEN)	
ΙΣΤ.4.	Καρβεδιλόλη -Ανάπτυξη χρωματογραφικής μεθόδου για καρβεδιλόλη και το υπό μελέτη άγνωστο προϊόν της	348
ΙΣΤ.4.1.	Επιλογή στατικής φάσης	348
ΙΣΤ.4.2.	Βελτιστοποίηση κινητής φάσης	349
ΙΣΤ.5.	Καρβεδιλόλη -Επικύρωση Μεθόδου ΧΜ4	359
ΙΣΤ.5.1.	Εκλεκτικότητα	359
ΙΣΤ.5.2.	Όριο Ανίχνευσης – Όριο Ποσοτικοποίησης	364
ΙΣΤ.5.3.	Γραμμικότητα	364
ΙΣΤ.5.4.	Πιστότητα	367
ΙΣΤ.5.5.	Ακρίβεια	371
ΙΣΤ.5.6.	Ανθεκτικότητα (Ruggedness)	371
ΙΣΤ.6.	Καρβεδιλόλη -Προσαρμογή αναλυτικής χρωματογραφικής διάταξης σε LC-ESI-MS	377
ΙΣΤ.6.1.	Εισαγωγή	377
ΙΣΤ.6.2.	Επιλογή συνθηκών – Προσαρμογή ΧΜ4	377
ΙΣΤ.6.3.	Χρόνοι ανάλυσης-Μάζες παρακολούθησης	379
ΙΣΤ.6.4.	Γραμμικότητα	383
ΙΣΤ.6.5.	Πιστότητα	385
ΙΣΤ.7.	Καρβεδιλόλη -Ημιπαρασκευαστική μέθοδος	387
ΙΣΤ.8.	Μετρονιδαζόλη – Αξιολόγηση μεθόδου ελέγχου φωτοσταθερότητας	390
ΙΣΤ.8.1.	Εκλεκτικότητα	390
ΙΣΤ.8.2.	Γραμμικότητα	392
ΙΣΤ.8.3.	Πιστότητα	392
ΙΣΤ.8.4.	Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα	394
ΙΣΤ.8.5.	Ακρίβεια	395
ΙΣΤ.8.6.	Σταθερότητα διαλυμάτων	396
	Περίληψη –Συμπεράσματα	399
	Summary	403
	Βιβλιογραφία	407

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΕΚΔΟΧΑ^{1,2,3,4,5,6,7}

Έκδοχα είναι οι ουσίες που απαιτούνται στη μορφοποίηση των φαρμακευτικών σκευασμάτων και τους προσδίδουν κάποιες ιδιότητες ή χαρακτηριστικά. Αναλόγως της λειτουργίας τους, κατηγοριοποιούνται σε αραιωτικά, αποσαθρωτικά, προσροφητικά, συνδετικά, λιπαντικά-βελτιωτικά ροής, χρωστικές, βελτιωτικά οσμής και γεύσης, συντηρητικά, ωσμωτικά, επιφανειοδραστικά, ρυθμιστικά ή σε πιο εξελιγμένες περιπτώσεις ως φορείς του δραστικού συστατικού.

A.1. Έκδοχα και δραστικές^{8,9}

Αν και τα έκδοχα χαρακτηρίζονται ως φαρμακολογικά αδρανή, δηλαδή χωρίς θεραπευτική δράση, μπορούν να συμμετέχουν, να προχωρήσουν ή ακόμα και να ξεκινήσουν φυσικές ή χημικές αλληλεπιδράσεις τόσο μεταξύ τους όσο και με το δραστικό συστατικό, μειώνοντας έτσι την ποιότητα ή την αποδοτικότητα του σκευάσματος. Η χημική αυτή αλληλεπίδραση μπορεί να αποτελεί προϋπόθεση της δράσης του εκδόχου, όπως στις περιπτώσεις εκδόχων φορέων ή εκδόχων που προστατεύουν τη δομή. Είναι πιθανό όμως, η αλληλεπίδραση να οδηγήσει στην αποικοδόμηση του δραστικού συστατικού αλλάζοντας την αποτελεσματικότητα και πιθανώς την ασφάλεια του σκευάσματος.

Σε φυσικές αλληλεπιδράσεις εκδόχων και δραστικών μπορεί να οφείλονται η αλλαγή του ρυθμού αποδέσμευσης, η ομοιομορφία των δόσεων ή και η ευκολία στη χορήγηση του σκευάσματος.

Πολύ σημαντικές όμως είναι και οι χημικές αλληλεπιδράσεις. Τα έκδοχα, όπως όλες οι χημικές ενώσεις έχουν χαρακτηριστικές ομάδες που μπορούν να αλληλεπιδράσουν άμεσα με τα δραστικά φαρμακευτικά συστατικά. Η καθαρότητα των εκδόχων, σαν πρώτες ύλες, δεν είναι πάντα εξασφαλισμένη. Ακόμα και στις περιπτώσεις που υφίστανται όλους τους ελέγχους καθαρότητας, μπορεί να περιέχουν προσμίξεις ή υπολείμματα σύνθεσης με ισχυρή δράση πάνω στο δραστικό

συστατικό, ή ακόμα περισσότερο να σχηματίζουν με τον χρόνο προϊόντα διάσπασης που στη συνέχεια να αλλοιώνουν το σκεύασμα.

Επίσης, τα έκδοχα μπορούν να είναι πηγή μικροβιολογικού φορτίου ή να μπορούν να τροφοδοτήσουν με θρεπτικά συστατικά μικροοργανισμούς, με άμεσες συνέπειες στην ασφάλεια και την ποιότητα του φαρμακευτικού σκευάσματος.

A.1.1. Τρόποι αποικοδόμησης φαρμάκων ⁸

Όλες οι ουσίες με φαρμακευτικές ιδιότητες είτε διαθέτουν κατάλληλη τρισδιάστατη δομή είτε χαρακτηρίζονται από λειτουργικές ομάδες που μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τους υποδοχείς του οργανισμού είτε μεταβολίζονται σε πιο δραστικές μορφές. Οι ομάδες αυτές όμως στις οποίες αποδίδεται η φαρμακολογική δράση μπορούν να αλληλεπιδράσουν με άλλα υλικά, να υποστούν αλλαγές που μειώνουν την ισχύ τους.

Οι πιο συνηθισμένες περιπτώσεις αποικοδόμησης των δραστικών φαρμακευτικών ουσιών, αναφέρονται παρακάτω.

Υδρόλυση

Φάρμακα με χαρακτηριστικές ομάδες εστέρες, αμίδια, λακτόνες ή λακτάμες εμφανίζουν υδρολυτική αποικοδόμηση. Πρόκειται για την πιο συνηθισμένη αντίδραση διάσπασης λόγω της επικράτησης των ομάδων αυτών στα περισσότερα μόρια αλλά και λόγω της παρουσίας και αφθονίας του νερού. Το περιεχόμενο ή προσροφούμενο νερό ευνοεί κάποιες αλληλεπιδράσεις ή τροφοδοτεί το μικροβιολογικό φορτίο.

Οξείδωση

Η οξειδωτική αποικοδόμηση είναι μάλλον η δεύτερη σε συχνότητα, μετά την υδρόλυση, αντίδραση αλλοίωσης φαρμακευτικών σκευασμάτων. Σε αντίθεση όμως με την υδρόλυση, ο μηχανισμός της οξείδωσης είναι πιο σύνθετος, περιλαμβάνοντας την αφαίρεση κάποιου ηλεκτροθετικού τμήματος, ρίζας ή ηλεκτρονίου, ή αντίθετα την προσθήκη ενός ηλεκτραρνητικού τμήματος. Οι αντιδράσεις του μηχανισμού της

οξειδωσης μπορούν να καταλυθούν από οξυγόνο, βαρέα μέταλλα και το φως, οδηγώντας στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών που υποκινούν και συνεχίζουν την αλυσίδα των αντιδράσεων. Αλδεΐδες, αλκοόλες, φαινόλες, αλκαλοειδή και ακόρεστα έλαια και λίπη μπορούν να συμμετέχουν σε οξειδωτικές αντιδράσεις.

Ισομερίωση

Η μετατροπή ενός χημικού συστατικού στο οπτικό ή γεωμετρικό ισομερές του στις περισσότερες περιπτώσεις συνοδεύεται από αλλαγή στην φαρμακολογική του δράση ή στην αύξηση της τοξικότητας. Αυτό οφείλεται στις διαφορετικές ιδιότητες που μπορούν να έχουν τα ισομερή, για παράδειγμα η L- αδρεναλίνη είναι 15-20 φορές πιο δραστική από την D- μορφή της.

Πολυμερισμός

Με μικρή συχνότητα συναντώνται σε σκευάσματα και μετά από αρκετό χρόνο παραμονής τους, διαμοριακές αλληλεπιδράσεις που μπορούν να οδηγήσουν σε διμερή ή άλλα, μεγαλύτερου μοριακού βάρους συσσωματώματα.

Φωτόλυση

Αντιδράσεις όπως οξείδωση-αναγωγή, αλλαγή δακτυλίου (ring alteration) και πολυμερισμός, μπορούν να καταλυθούν από το φως. Η απορρόφηση ενέργειας είναι μεγαλύτερη στα χαμηλά μήκη κύματος και δεδομένου ότι πολλά φαρμακευτικά μόρια απορροφούν στην περιοχή του υπεριώδους, η αποικοδόμησή τους από ακτινοβολία υψηλής συχνότητας (lower wavelength) είναι πολύ συνηθισμένη. Γενικότερα η έκθεση στο φως σχεδόν πάντα οδηγεί στον αποχρωματισμό των σκευασμάτων, ακόμα κι αν οποιαδήποτε άλλη χημική επίδραση είναι μη αξιολογήσιμη ή απλά ανύπαρκτη.

Οι παραπάνω αντιδράσεις αποικοδόμησης των φαρμακευτικών μορίων συνήθως διευκολύνονται ή και προωθούνται από έκδοχα με τις κατάλληλες δραστικές ομάδες. Στις περιπτώσεις που τα έκδοχα περιέχουν προσμίξεις ή μπορούν να υποστούν και αυτά αλλαγές, τότε οι πιθανότητες γενικότερης αποικοδόμησης

αυξάνονται. Είναι πιθανό κάποιο από τα προϊόντα αλλαγής των εκδόχων να έχει την κατάλληλη δομή και να είναι δραστικότερο ή καταλυτικό στην αλλοίωση του δραστικού συστατικού.

A.1.2. Άμεσες αλληλεπιδράσεις μεταξύ εκδόχων και δραστικών⁸

Τα έκδοχα, οργανικής ή ανόργανης φύσης, συνθετικής, ζωικής ή φυτικής προέλευσης, διαθέτουν τις δικές τους λειτουργικές και δραστικές ομάδες και μπορούν να χρησιμοποιούνται ως σταθεροποιητικά ασταθών φαρμακευτικών μορίων. Στις περισσότερες όμως περιπτώσεις οι ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις οδηγούν στη μείωση της ποιότητας του φαρμακευτικού σκευάσματος.

Οι αντιδράσεις που θα μπορούσαν να γίνουν μεταξύ δυο ουσιών, με βάση τη χημεία των χαρακτηριστικών τους ομάδων, έχουν διαφορετικές πιθανότητες πραγματοποίησης ιδίως όταν και οι δυο ουσίες βρίσκονται σε στερεά κατάσταση. Άμεσες αλληλεπιδράσεις εκδόχων και δραστικών εμφανίζονται πιο συχνά και εντονότερα όταν και τα δυο μέρη είναι σε υγρή κατάσταση, σε υδατικά συστήματα. Αλλά και η απορρόφηση υγρασίας μπορεί να αυξήσει την ελαστικότητα και κινητικότητα των μορίων ευνοώντας τις αλληλεπιδράσεις σε συστήματα στερεής κατάστασης. Ως αποτέλεσμα, μελέτες σε υγρά συστήματα μπορεί να είναι ενδεικτικές της συμπεριφοράς των ουσιών και πιθανών αλληλεπιδράσεων τους, αλλά πιθανόν και να δώσουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

Παρακάτω αναφέρονται περιπτώσεις αλληλεπιδράσεων εκδόχων με δραστικά συστατικά, όταν συνυπάρχουν στα φαρμακευτικά σκευάσματα.

Αλληλεπιδράσεις φορτίων

Ευδιάλυτα και ιονιζόμενα έκδοχα μπορούν να ελευθερώσουν σημαντικό αριθμό ιόντων που αλληλεπιδρούν με ιονίσιμες δραστικές ουσίες προς το σχηματισμό αδιάλυτων προϊόντων. Έκδοχα όπως είναι το αλγινικό νάτριο και η νατριούχος καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη, διαλυόμενα στο νερό σχηματίζουν μεγάλα ανιόντα. Η παρουσία τους σε υδατικής βάσης φαρμακευτικά σκευάσματα της

νεομυκίνης και της πολυμυξίνης, τα μόρια των οποίων είναι κατιοντικά και μεγάλου μοριακού βάρους, οδηγούν σε καταβύθισή τους.

Μπορεί η συμπεριφορά των ιόντων να είναι προβλέψιμη σε εργαστηριακή κλίμακα (ιονισμός, άλατα, καταβυθίσεις), είναι απρόβλεπτη όμως η συμπεριφορά τους μετά τη χορήγησή τους, ιδίως την έκχυση και την ύγρανσή τους στο γαστρεντερικό σύστημα.

Αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου

Η πολυβινυλπυρρολιδόνη μπορεί να αντιδράσει με συστατικά που περιέχουν χαρακτηριστικές ομάδες με ευκίνητα υδρογόνα. Για παράδειγμα, η ασυμβατότητά της με την λανσοπραζόλη και την ατενολόλη είναι ενδεικτικές της συμμετοχής της καρβονυλικής της ομάδας σε αντιδράσεις αποικοδόμησης.

Αλληλεπιδράσεις με λακτόζη

Η ιδιαίτερη μνεία στην λακτόζη οφείλεται στο εύρος των εφαρμογών και τη συχνότητα της χρήσης της. Η λακτόζη μπορεί να αντιδράσει με ουσίες που περιέχουν πρωτοταγείς ή δευτεροταγείς αμίνες. Η δραστηριότητά της σε σκευάσματα στερεής κατάστασης έχει αναφερθεί πως εξαρτάται από το ποσοστό της άμορφης λακτόζης, καθότι δεν έχει τη σταθερότητα που προσφέρει το κρυσταλλικό πλέγμα. Η άμορφη λακτόζη χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη υγροσκοπικότητα, συγκρινόμενη με την κρυσταλλική, αυξάνοντας τις πιθανότητες των υποβοηθουμένων από την υγρασία αντιδράσεων.

Αλληλεπιδράσεις με διοξείδιο του πυριτίου

Το διοξείδιο του πυριτίου μπορεί να δράσει σαν οξύ κατά Lewis, σαν δέκτης δηλαδή ζεύγους ηλεκτρονίων, σε άνυδρες συνθήκες, ευνοώντας έτσι αντιδράσεις όπως η αφυδάτωση, η υδρόλυση, ο επιμερισμός, η κυκλοποίηση και η μετεστεροποίηση ή αλκοολόλυση.

Φυσικές αλληλεπιδράσεις εκδόχων και δραστικών συστατικών

Κάποια έκδοχα έχουν την ικανότητα να απορροφούν στην επιφάνειά τους τα δραστικά συστατικά και αυτό έχει χρησιμοποιηθεί για την βελτίωση του ρυθμού της αποδέσμευσης του φαρμάκου. Εάν όμως οι δυνάμεις που συμμετέχουν είναι αρκετά ισχυρές, η αποδέσμευση μπορεί να καθυστερήσει ή να μην είναι πλήρης.

Η απορρόφηση, ως διαδικασία στην οποία υποβάλλεται το δραστικό, μπορεί να προκαλέσει τη χημική διάσπαση. Αναφέρεται για το κολλώδες διοξείδιο του πυριτίου, πως καταλύει την αποικοδόμηση των δισκίων της νιτραζεπάμης, ευνοώντας έτσι την προσβολή του από υδρολυτικές ουσίες.

A.1.3. Αποτελέσματα αλληλεπίδρασης μεταξύ εκδόχων και δραστικών σε στερεές φαρμακευτικές μορφές στη βιοδιαθεσιμότητα φαρμάκων¹⁰

Η φαρμακοκινητική ενός φαρμακευτικού σκευάσματος αφορά τον ρυθμό και την έκταση που το δραστικό συστατικό βρίσκεται στην κυκλοφορία του αίματος του λήπτη. Στα φαρμακευτικά σκευάσματα με χορήγηση μέσω της στοματικής οδού, σημαντική παράμετρος είναι η ταχύτητα διαλυτοποίησης της δραστικής ουσίας και η διαπερατότητά της από τις βιολογικές μεμβράνες. Παράμετροι όπως η διαλυτότητα του δραστικού συστατικού, η σταθερότητα και η υδροφιλικότητα/υδροφοβικότητα επηρεάζουν άμεσα την φαρμακοκινητική του και η επιλογή των εκδόχων γίνεται με σκοπό την βελτίωσή της.

Το μέγεθος των σωματιδίων του δραστικού συστατικού, η συνολική επιφάνεια που διαθέτει για αλληλεπιδράσεις, η πολυμορφικότητα και ο σχηματισμός αλάτων αποτελούν σημαντικές παραμέτρους που επηρεάζουν την φαρμακοκινητική ενός στερεού φαρμακευτικού σκευάσματος.

Σε κάθε περίπτωση, η παρουσία ή η προσθήκη των κατάλληλων εκδόχων μπορεί να μειώσει τον σχηματισμό συσσωμάτων, κρατώντας το μέγεθος των σωματιδίων μικρό και την συνολική επιφάνεια υψηλή, αλλά και να σταθεροποιήσει τη μορφή του δραστικού με την καταλληλότερη δραστικότητα.

Στα χαρακτηριστικά που επηρεάζονται από τα έκδοχα είναι η αποσάθρωση του φαρμακευτικού σκευάσματος, η διαλυτοποίηση του δραστικού συστατικού, το pH στο μικροπεριβάλλον που δρα και η παρουσία του στο σημείο απορρόφησής του. Η καλή γνώση των παραμέτρων αυτών και η επιλογή των κατάλληλων εκδόχων συμβάλει σημαντικά στο σχεδιασμό ενός βέλτιστου φαρμακευτικού σκευάσματος.

Στην φαρμακοκινητική ενός δραστικού συστατικού σημαντική είναι και η λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος που εξαρτάται από πολλές παραμέτρους και οι δυνατότητές του μπορούν να διαφοροποιούνται από λήπτη σε λήπτη. Έκδοχα που μειώνουν την διακύμανση του περιβάλλοντος κατά τη χορήγηση, επιλέγονται για τη βελτίωση της αποδοτικότητας του σκευάσματος.

Οι φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις σε φαρμακευτικά σκευάσματα αφορούν κυρίως αλληλεπιδράσεις δραστικού συστατικού με κάποιο από τα έκδοχα και δευτερευόντως αλληλεπιδράσεις μεταξύ των εκδόχων. Και οι δυο περιπτώσεις μπορούν να αλλοιώνουν την ποιότητα του σκευάσματος αλλά μπορεί η χρήση των συγκεκριμένων εκδόχων να αποσκοπεί στις συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις. Αλληλεπιδράσεις με έκδοχα ή μεταξύ εκδόχων μπορεί να βελτιώσουν έμμεσα κάποια από τις παραμέτρους αποδέσμευσης, απορρόφησης ή σταθερότητας του σκευάσματος ενώ η αλληλεπίδραση εκδόχου με την δραστική μπορεί να αποσκοπεί σε άλλο μηχανισμό αλληλεπίδρασης και στην άμεση βελτίωση του σκευάσματος.

Η επιλογή των κατάλληλων εκδόχων για τον έλεγχο της βιοδιαθεσιμότητας είναι κομμάτι της ανάπτυξης ενός φαρμακευτικού σκευάσματος, αφού ελεγχθεί η χημική συμβατότητα των εκδόχων με το φαρμακευτικό μόριο.

A.1.4. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ εκδόχων και δραστικών συστατικών σε στερεές φαρμακευτικές μορφές που επηρεάζουν τη φαρμακοκινητική¹⁰

Ο σχεδιασμός και η παρασκευή φαρμακευτικού σκευάσματος για παρεντερική χορήγηση έχουν τις δικές τους απαιτήσεις σε έκδοχα. Τόσο ο τρόπος

παρασκευής όσο και οι ιδιότητες του δραστικού συστατικού είναι οι παράμετροι που λαμβάνονται υπόψη στην επιλογή των εκδόχων. Είναι σημαντικό να μελετώνται τόσο η συνεργατική όσο και η ανταγωνιστική αλληλεπίδραση των εκδόχων. Στη συγκεκριμένη κατηγορία φαρμακευτικών σκευασμάτων είναι σημαντική και η επιλογή του πρωτογενούς περιέκτη ο οποίος λαμβάνεται υπόψη στις μελέτες καταλληλότητας και πιθανών αλληλεπιδράσεων. Για παράδειγμα, η διαδικασία της λυοφιλοποίησης καθώς και η διαδικασία της αποστείρωσης ενός παρεντερικού σκευάσματος πραγματοποιούνται μέσα στον πρωτογενή περιέκτη, οπότε είναι σημαντική η συμβολή του στην ποιότητα του σκευάσματος.

Η κυριότερη δράση των εκδόχων σε παρεντερικά σκευάσματα είναι η διαλυτοποίηση, η σταθεροποίηση, η συντήρηση και η διευκόλυνση της *in vivo* μεταφοράς του δραστικού συστατικού. Σε μη κατάλληλα έκδοχα μπορεί να οφείλονται προβλήματα κατά τη χορήγηση όπως αιμόλυση, καταβύθιση του δραστικού συστατικού, φλεβίτιδα ή και πόνος. Αρκετά έκδοχα έχουν περισσότερες από μια δράσεις, όπως η πολυβινυλοπυρρολιδόνη που μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο ως παράγοντας συμπλοκοποίησης όσο και ως έκδοχο διάλυσης πριν τη λυοφιλοποίηση.

Τα περισσότερα έκδοχα των παρεντερικών σκευασμάτων ενισχύουν τη διαλυτότητα του δραστικού συστατικού, ακολουθώντας διαφορετικό μηχανισμό το καθένα: δημιουργία αλάτων, ρύθμιση του pH, χρήση συνδυασμού διαλυτών, χρήση επιφανειοτασικών συστατικών, συμπλοκοποίηση, δημιουργία συστήματος διασποράς της δραστικής, υδρόφοβο περιβάλλον, σχηματισμό μικροσωματιδίων που δεσμεύουν τη δραστική.

Για τη σταθερότητα του σκευάσματος χρησιμοποιούνται έκδοχα με σημαντική αντιοξειδωτική δράση και σε κάποιες περιπτώσεις έκδοχα με αντιμικροβιακή δράση.

Για την καλύτερη χορήγηση του σκευάσματος χρησιμοποιούνται έκδοχα που ρυθμίζουν την τονικότητα του σκευάσματος, το pH του χορηγούμενου διαλύματος.

Πληροφορίες για τις ιδιότητες των εκδόχων μπορούν να ληφθούν και από τη διεθνή βιβλιογραφία για τα έκδοχα που η χρήση τους στα φαρμακευτικά σκευάσματα είναι αποδεκτή.¹¹

A.1.5. Καταλληλότητα εκδόχων σε φαρμακευτικά σκευάσματα⁸

Η επιλογή των εκδόχων κατά την ανάπτυξη κάποιου φαρμακευτικού σκευάσματος ξεκινάει με τη διερεύνηση της χημικής συμβατότητάς τους με τα δραστικά φαρμακευτικά συστατικά.

Παρασκευάζονται μίγματα του κάθε εκδόχου με το δραστικό συστατικό και αποθηκεύονται για ένα μικρό χρονικό διάστημα σε κανονικές συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας καθώς και σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και υγρασίας, προκειμένου να επιταχυνθεί ο μηχανισμός της πιθανής αλληλεπίδρασής τους. Στο τέλος του χρονικού αυτού διαστήματος ελέγχονται τα μίγματα τόσο οπτικά όσο και χημικά, συνήθως με κατάλληλη χρωματογραφική τεχνική. Απορρίπτονται από την ανάπτυξη του σκευάσματος έκδοχα τα οποία προκαλούν μείωση στη περιεκτικότητα του δραστικού συστατικού.

Υπάρχει η δυνατότητα της αξιολόγησης της συμβατότητας εκδόχου και δραστικής και με πιο γρήγορες αναλυτικές τεχνικές, όπως είναι η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC), η θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης και η φασματοσκοπία FT-IR. Τα αποτελέσματα είναι ενδεικτικά και είναι πιθανό κάποια από αυτά να είναι ψευδώς θετικά.

A.2. Πολυμερή Έκδοχα

Η χρήση των πολυμερών υλικών στη φαρμακευτική βιομηχανία έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια. Το κοινό χαρακτηριστικό των υλικών αυτών είναι το μεγάλο μοριακό τους βάρος που οφείλεται στην επανάληψη της ίδιας απλής μονάδας (μονομερές) ή την εναλλαγή 2-3 διαφορετικών μονομερών (συμπολυμερή). Αναλόγως της δομής τους διακρίνονται σε γραμμικά και διακλαδισμένα, δικτυωτά, κρυσταλλικά ή μη κρυσταλλικά.

Η επιλογή τους στη μορφοποίηση των φαρμακευτικών σκευασμάτων γίνεται με βάση τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά τους και διακρίνονται

- σε υδατοδιαλυτά και μη,
- σε υδρόφιλα και υδρόφοβα,
- σε διογκώμενα,
- σε βιοδιασπώμενα και μη βιοδιασπώμενα.

Τα περισσότερα πολυμερή όταν έρθουν σε επαφή με το νερό διογκώνονται, με τα διαλυτά πολυμερή να εμφανίζουν μεγαλύτερη διόγκωση και να διαλύονται μετά από κάποιο χρονικό διάστημα. Στην κατηγορία των ευδιάλυτων ανήκουν οι κυτταρίνες, τα κόμια, οι κυτταρικοί εστέρες και αιθέρες. Συνήθως δρουν ως συνδετικά, διογκωτικά και αποσπαστικά μέσα, ενώ σημαντική είναι και η χρήση τους σε προϊόντα ελεγχόμενης αποδέσμευσης.

Στα αδιάλυτα πολυμερή, που χρησιμοποιούνται για το διαπερατό φράγμα που σχηματίζουν, ανήκουν πολυμερή όπως το πολυ-υδροξυαιθυλομεθακρυλικό, η πολυ-βινυλαλκοόλη, το πολυ-αιθυλενοξειδίο, η πολυβινυλοπυρρολιδόνη.

Τα βιοδιασπώμενα πολυμερή διαλύονται επιφανειακά ή ολοκληρωτικά με υδρολυτικές, οξειδωτικές ή ενζυματικές αντιδράσεις, ιδιότητα που επιτρέπει τη χρήση τους σε προϊόντα ελεγχόμενης αποδέσμευσης ή σε πιο σύνθετες και συνδυαστικές μορφές φαρμακευτικών σκευασμάτων. Στα βιοδιασπώμενα πολυμερή περιλαμβάνονται το κολλαγόνο, τα αλγινικά παράγωγα και οι δεξτράνες.

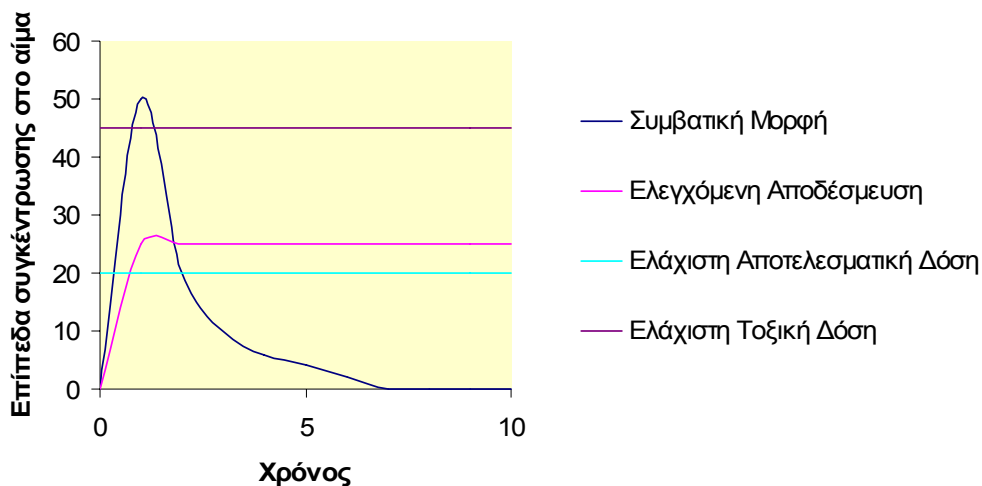
A.2.1. Σκευάσματα με πολυμερή ¹²

Η ποικιλία των φυσικών και χημικών ιδιοτήτων των πολυμερών τα καθιστά πολύ σημαντικά στη σύγχρονη φαρμακευτική βιομηχανία και ιδιαίτερα στις πιο εξελιγμένες μορφές σκευασμάτων.

(α) Τα πολυμερή σαν φορείς φαρμάκων ¹³

Τα τελευταία χρόνια, οι νέες τεχνολογίες, όπως η συνδυαστική χημεία, καθώς και οι σύγχρονες τεχνικές εκτίμησης και πρόβλεψης της φαρμακολογικής δράσης έχουν οδηγήσει στη σύνθεση πολύ δραστικότερων φαρμακευτικών μορίων, αλλά μικρής διαλυτότητας. Η ανάγκη χορήγησης των συστατικών αυτών προσανατόλισε το επιστημονικό ενδιαφέρον στην ανάπτυξη νέων τεχνικών μορφών, πιο εξελιγμένων και αποτελεσματικών.

Συμβατική και Ιδεατή αποδέσμευση φαρμάκων



Σχήμα A.2.1. Συμβατική και Ιδεατή αποδέσμευση φαρμάκων

Όπως παραστατικά εμφανίζονται στο σχήμα A.2.1, οι συμβατικές μορφές χορήγησης, κατάποση ή ενδοφλέβια χορήγηση, δεν έχουν ικανοποιητική

φαρμακοκινητική απόκριση, ιδίως για φάρμακα με μεγάλη τοξικότητα ή και με περιορισμένη θεραπευτική συγκέντρωση. Για τις περιπτώσεις αυτές, η ιδανική απόκριση θα ήταν αυτή που θα παρείχε σταθερή, δηλαδή με μικρές διακυμάνσεις, συγκέντρωση της θεραπευτικής δόσης για όσο το δυνατό μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, μέχρι δηλαδή το θεραπευτικό αποτέλεσμα. Το ιδανικό σκεύασμα θα περιείχε τη φαρμακευτική δόση σε μικρο-σωμάτια αδρανούς υλικού και ο μηχανισμός αποδέσμευσής του θα εξασφάλιζε τα σταθερά της επίπεδα.

Η τεχνολογία των πολυμερών ως φορείς φαρμάκων έχει εξελιχθεί αρκετά και τα βασικά πλεονεκτήματα των συστημάτων αυτών μπορούν να συνοψισθούν στα εξής:

1. *Τοπική απελευθέρωση του δραστικού.* Το σκεύασμα μπορεί να τοποθετηθεί άμεσα ή να καταλήξει στην περιοχή όπου το φάρμακο πρέπει να δράσει, μειώνοντας έτσι τη συστηματική έκθεσή του σε αλλοιωτικούς παράγοντες. Η παράμετρος αυτή είναι ιδιαίτερα σοβαρή για τις τοξικές ουσίες που συνδέονται με έκδηλες παρενέργειες. Ως παράδειγμα αναφέρεται η παρασκευή πειραματικού σκευάσματος ιντερλευκίνης-6 που συνδέεται με πολυ-βινυλοπυρρολιδόνη με ομοιοπολικούς δεσμούς των αμινομάδων των 14 λυσίνων της αλυσίδας της, με τις καρβοξυλομάδες του πολυμερούς, σε ποσοστό 60 %. Η χορήγηση του σκευάσματος αυτού σε μύες, έδωσε 50 φορές μεγαλύτερη δραστηριότητα από την απλή ιντερλευκίνη-6, δίχως την εμφάνιση παρενεργειών, μειώνοντας σημαντικά τις αλλοιώσεις ή τον μεταβολισμό της μέχρι το σημείο δράσης της και καθιστώντας έτσι σημαντική τη χρήση του PVP ως φορέα και άλλων κυτοκίνων.¹⁴

2. *Σταθερή χορήγηση του δραστικού.* Το περικλειόμενο φάρμακο μπορεί να αποδεσμεύεται για μεγάλο χρονικό διάστημα, εξαλείφοντας έτσι την ανάγκη για επανάληψη της χορήγησης. Η ιδιότητα αυτή είναι ιδιαίτερος σημαντική για φάρμακα χρόνιας χορήγησης που θα απαιτούσαν πιο συχνές δοσολογίες, όπως είναι η περίπτωση της ινσουλίνης στον διαβήτη και άλλες περιπτώσεις ανεπάρκειας πρωτεϊνών.

3. *Σταθεροποίηση του φαρμάκου.* Το πολυμερές μπορεί να προστατεύσει το δραστικό συστατικό και να βελτιώσει τη σταθερότητά του στον

οργανισμό. Η ανάγκη χορήγησης ευαίσθητων φαρμάκων, όπως πρωτεΐνες και πεπτίδια, καθιστά την τεχνολογία αυτή αρκετά ενδιαφέρουσα^{15, 16}

Πολυμερή που έχουν μελετηθεί πειραματικά με σκοπό την απώτερη χρήση τους ως φορείς φαρμάκων είναι:

- του *N,N*-διαιθυλονικοτιναμιδίου (μικύλλια –φορείς πακλιταξέλης)¹⁷
- διακλαδισμένου πολυ(L-γλουταμικού οξέος)¹⁸
- της πολυβινυλαλκοόλης¹⁹
- διακλαδισμένοι πολυεστέρες (πολυβινυλαλκοόλη με αλυσίδες πολυ-λακτο-*c*ο-γλυκολικού οξέος)²⁰
- πολυ(L-λακτιδίου)²¹
- σφαιρίδια πολυαιθυλενογλυκόλης²²
- πολυ-ορθο-εστέρες²³
- πολυανυδρίτες^{24,25,26}
- πολυφωσφοεστέρες²⁷
- νέες προσεγγίσεις με πολυφωσφαζίνες²⁸

*(β) Σκευάσματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης*²⁹

Τα σκευάσματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης είναι αποτέλεσμα της προσπάθειας για φαρμακευτικές μορφές που ελέγχουν την απελευθέρωση του δραστικού αναλόγως τις ανάγκες του οργανισμού ή την προστατεύουν μέχρι να βρεθεί στην περιοχή δράσης της. Η χρονική διάρκεια που τα συστήματα αυτά επιτυγχάνουν να διατηρούν σταθερά τα επίπεδα της αποδεσμευόμενης ουσίας, μπορεί να φτάσει, σε κάποιες περιπτώσεις, τους τρεις μήνες από τη χορήγησή τους.³⁰ Οι ουσίες που χρησιμοποιούνται στα παραπάνω σκευάσματα σχηματίζουν ημιπερατές μεμβράνες ή πλέγματα που περικλείουν το δραστικό συστατικό μέχρι να ενεργοποιηθούν από το περιβάλλον τους, δηλαδή το pH ή ιόντα ή άλλα εξωτερικά ερεθίσματα (μαγνητικά πεδία, θερμότητα, υπέρηχοι) και να ξεκινήσει η διαδικασία αποδέσμευσης.

Τα πολυμερή έχουν μεγάλη εφαρμογή στα συστήματα αυτά. Οι τρισδιάστατες αλυσίδες των πολυμερών διογκώνονται εξ' αιτίας της ενυδάτωσής τους, αλλά παραμένουν αδιάλυτες λόγω των μεταξύ τους συνδέσεων. Η διόγκωση εξαρτάται από την κρυσταλλική δομή του πολυμερούς, την αλληλεπίδρασή του με τον διαλύτη, τη θερμοκρασία³¹ και την πίεση καθώς και από την εφαρμογή της όποιας ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Ευαίσθητα στο pH πολυμερή, που περιέχουν ασθενείς όξινες ή βασικές ομάδες, διογκώνονται ή συρρικνώνονται αναλόγως του pH και του ιονισμού τους στο διάλυμα, συνδέοντας έτσι το ρυθμό αποδέσμευσης του φαρμάκου από το pH.³² Μπορούν δηλαδή να χρησιμοποιηθούν για την απελευθέρωση του δραστικού προκαλώντας τη διόγκωση του πλέγματος όταν το σκεύασμα βρεθεί στο έντερο, αποφεύγοντας τη διάσπασή του από τα γαστρικά υγρά.

Στη μεταβολή του pH του διαλύματος βασίζεται και η αποδέσμευση της ινσουλίνης χρησιμοποιώντας σύστημα πολυμερούς που χρησιμοποιεί την αλληλεπίδραση ενζύμου-υποστρώματος. Η ινσουλίνη έχει μελετηθεί αρκετά και λόγω της σπουδαιότητας και της ευρείας εφαρμογής της οι προσπάθειες που έχουν γίνει για αποτελεσματικότερη και ελεγχόμενη χορήγηση δεν είναι λίγες.³³ Η μεγάλη διαλυτότητα στο νερό, η ανάγκη για ακριβείς δόσεις και η σοβαρότητα της παθολογικής κατάστασης που απαιτεί τη χορήγησή της είναι οι παράμετροι που συνοδεύουν τις μελέτες της.

Οι μηχανισμοί ελεγχόμενης αποδέσμευσης στα σκευάσματα που προαναφέρθηκαν, μπορούν να χωριστούν σε 3 βασικές ομάδες. Στα σκευάσματα όπου ο τρόπος και ο ρυθμός αποδέσμευσης είναι *προγραμματισμένα* από τον τρόπο παρασκευής τους, σε αυτά που αποκρίνονται σε αλλαγές του περιβάλλοντος και σε αυτά που προκαλούν τις αλλαγές του περιβάλλοντος.²⁹

(γ) Αποδέσμευση φαρμάκων από σκευάσματα πολυμερών / πολυμερικά υποστρώματα

Η αποδέσμευση του δραστικού συστατικού από το σώμα του πολυμερούς-φορέα μπορεί να γίνει είτε με έκχυσή του, είτε με αποικοδόμηση του πολυμερούς

είτε βέβαια και με συνδυασμό των δυο. Η αποικοδόμηση του πλέγματος ή της επιφάνειας του πολυμερούς, αναλόγως της τεχνολογίας του σκευάσματος, μπορεί να οφείλεται σε ενζυμική-καταλυτική αποικοδόμησή του ή και σε απλή υδρόλυσή του. Για κάθε όμως σκευάσμα, η κινητική της απελευθέρωσης του δραστικού εξαρτάται από το είδος του πολυμερούς, την μορφολογία του καθώς και από την παρουσία στο περιβάλλον του άλλων εκδόχων παράμετροι που θα εξηγηθούν παρακάτω.

- *Είδος πολυμερούς*

Αν και ο φορέας μπορεί να είναι μη αποικοδομήσιμος, ιδανικές θεωρούνται οι περιπτώσεις που το πολυμερές είναι βιοδιασπώμενο και τα προϊόντα αποικοδόμησής του απομακρύνονται φυσικά, δίχως κάποια σωματική ταλαιπωρία όπως θα ήταν μια χειρουργική επέμβαση. Εξίσου απαραίτητη είναι η έλλειψη τοξικότητας από τα προϊόντα διάσπασης ή μεταβολισμού του πολυμερούς στον οργανισμό. Η αποικοδόμηση των υδρολυτικά διασπώμενων πολυμερών εξαρτάται:

α. από τη χημική του σύσταση, με το ρυθμό διάσπασης να μειώνεται με τη σειρά: ανυδρίτες, εστέρες, αμίδια.

β. από την κρυσταλλικότητα, όσο υψηλότερη τόσο μικρότερος ο βαθμός διάλυσης του πολυμερούς.

γ. από την υδροφιλικότητα, που όσο αυξάνεται μεγαλώνουν και οι πιθανότητες διάσπασης του πολυμερούς.

- *Μορφολογία πολυμερούς*

Η μορφολογία του πολυμερικού υποστρώματος είναι κυρίαρχη στα χαρακτηριστικά αποδέσμευσης του δεσμευμένου συστατικού. Το πολυμερικό υπόστρωμα μπορεί να έχει τη μορφή μικρο- ή νανοσφαιριδίων, γέλης, υμενίου ή άλλου σχήματος που να ευνοεί την απομάκρυνση της δραστικής. Τα μικροσφαιρίδια είναι η προτιμώμενη μορφή τόσο για την ευκολία στη χορήγησή της όσο και για τις διαφορετικές τεχνικές παρασκευής τους, που επιτρέπουν ποικιλία ως προς το πορώδες, την κατανομή μεγέθους και την μορφολογία της επιφάνειας.

- *Παρουσία εκδόχων*

Κατά την παρασκευή των πολυμερών-φορέων η παρουσία διαφόρων εκδόχων μπορεί να τροποποιήσει την κινητική απελευθέρωσης του δραστικού ή διάσπασης πολυμερούς, π.χ. η παρουσία βασικών αλάτων μπορεί να βελτιώσει τη σταθερότητα συνθετικής πρωτεΐνης αλλά και να ελαττώσει τη διάσπαση του πολυμερούς. Αυξημένη απόδοση στη δράση της υδροχλωρικής βουσπιρόνης σε διαδερμικές γέλες καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης και υδροξυλπροπυλομεθυλκυτταρίνης παρατηρήθηκε με την παρουσία τερπενίων³⁴.

(δ) Βιοπροσκολλητικά-Διαδερμικά Συστήματα Ελεγχόμενης Αποδέσμευσης

Το ενδιαφέρον των συστημάτων έγκειται στο γεγονός πως προσκολλώνται στις βιολογικές επιφάνειες για συγκεκριμένη χρονική περίοδο με σκοπό την επίτευξη του θεραπευτικού αποτελέσματος, μειώνοντας στο ελάχιστο δυνατό την πορεία και τον χρόνο του δραστικού συστατικού μέχρι να βρει τους ιστούς ή τους υποδοχείς για τους οποίους προορίζεται. Η βιοπροσκόλληση βασίζεται στην αλληλεπίδραση δυο υλικών οπότε και διατηρούνται σε στενή επαφή μεταξύ τους για μεγάλο χρονικό διάστημα. Τα μεγαλομόρια, όπως είναι τα πολυμερή υλικά, έχουν την ικανότητα να προσροφώνται, να αλληλοδιαχέονται ή και να συνδέονται μηχανικά με άλλα μεγαλομόρια, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των συστημάτων αυτών, και να δημιουργείται μια διεπιφάνεια με τους ιστούς που έρχονται σε επαφή. Οι δυνάμεις που μπορούν να συγκρατήσουν τα υλικά αυτά μπορεί να είναι ετεροπολικό ή ομοιοπολικό δεσμοί χαρακτηριστικών ομάδων των πολυμερών με τις πρωτεΐνες των βιολογικών ιστών, δεσμοί τύπου van der Waals, δεσμοί υδρογόνου που συνεισφέρουν και ενδυναμώνουν τις αλληλοεπιδράσεις, ή φυσικοί και μηχανικοί δεσμοί που δημιουργούνται του συγκολλητικού υλικού σε εσοχές.

Στα βιοπροσκολλητικά συστήματα αποδέσμευσης ανήκουν και τα συστήματα που διοχετεύουν δίχως να λύσουν τη συνέχεια του δέρματος (*διαδερμικά*) το δραστικό ώστε τα επίπεδά του να φθάνουν τη συστηματική κυκλοφορία άμεσα. Στα προτερήματα των συστημάτων αυτών συμπεριλαμβάνονται η εξάλειψη των προβλημάτων της γαστρεντερικής απορρόφησης και του μεταβολισμού πρώτης

διόδου, η μείωση της χορηγούμενης δόσης και της συχνότητας χορήγησης, η προβλεπόμενη και διαρκής δραστικότητα, η φιλική για τον ασθενή μορφή με δυνατότητα αυτο-χορήγησης καθώς και ο γρήγορος τερματισμός της χορήγησης με απλή αποκόλληση του συστήματος από την επιφάνεια του δέρματος.

Τα πρώτα φάρμακα στα οποία εφαρμόστηκε η διαδερμική χορήγηση με βιοπροσκολλητικά συστήματα περιλαμβάνουν την σκοπολαμίνη, νιτρογλυκερίνη, δινιτρικό ισοσορβίτη, κλονιδίνη, εστραδιόλη, νικοτίνη και τεστοστερόνη.³⁵

A.3. Εφαρμογές Εύγρηστων Πολυμερών

A.3.1. Κιτοσάνη³⁶

Η κιτοσάνη, [(1→4)-2-αμινο-2-δεοξυ-β-D-γλουκάνη] / πολυσακχαρίτης συμπολυμερών της γλυκοσαμίνης και *N*-ακετυλογλυκοσαμίνης, συγκεντρώνει μεγάλο ενδιαφέρον και χρησιμοποιείται σε εφαρμογές ως βιοϋλικό και ως σύστημα ελεγχόμενης αποδέσμευσης. Είναι αδιάλυτη σε ουδέτερο και αλκαλικό περιβάλλον, ενώ σχηματίζει άλατα με ανόργανα και οργανικά οξέα, όπως γλουταμικό, υδροχλωρικό, λακτικό και οξεϊκό. Γενικότερα θεωρείται βιοσυμβατό υλικό, αργής βιοαποικοδόμησης και φυσικής προέλευσης πολυμερές, με πρώτες του εφαρμογές στην μεταφορά πεπτιδικών φαρμάκων.

Ο μηχανισμός δράσης της κιτοσάνης θεωρείται συνδυασμός προσκολλητικών ιδιοτήτων και δυνατότητας διεύρυνσης των στενών συνδέσμων της μεμβράνης. Σε διαλύματα πρωτονιώνεται και μπορεί να αλληλεπιδράσει με τους στενούς συνδέσμους των κυτταρικών επιφανειών προκαλώντας το άνοιγμά τους και επιτρέποντας την εισαγωγή στο κύτταρο υδρόφιλων μακρομοριακών φαρμάκων.

Η συμπεριφορά της όμως σε ουδέτερο και αλκαλικό περιβάλλον δεν αντισταθμίζεται από την ικανότητά της για πεπτιδική μεταφορά και αποδέσμευση. Παράγωγα της αμινικής της ομάδας, όπως το χλωρίδιο της *N,N,N*-τριμέθυλ κιτοσάνης ή η μονο-καρβοξυλομεθυλική κιτοσάνη χαρακτηρίζονται από διαλυτότητα σε μεγαλύτερο εύρος pH, διατηρώντας τα βασικά προτερήματα του

μητρικού υλικού, βιοσυμβατότητα, έλλειψη κυτοτοξικότητας και παντελής έλλειψη επιθηλιακών ζημιών.³⁷

A.3.2. Μικύλλια³⁸

Τα μικύλλια είναι σφαιρίδια πολυμερών με διάμετρο μικρότερη των 100 nm που σχηματίζονται από αμφιφιλικά πολυμερή όταν βρεθούν σε υδατικό περιβάλλον. Η κύρια εφαρμογή τους είναι ο εγκλωβισμός στο υδρόφοβο εσωτερικό τους περιβάλλον δυσδιάλυτων στο νερό μορίων, ή τοξικών μορφών τους, και η μεταφορά τους, με τη μορφή αυτή, από τα υγρά του οργανισμού στους ιστούς της περιοχής δράσης τους. Τα πολυμερικά μικύλλια, στα οποία και γίνεται αναφορά, χαρακτηρίζονται από αυξημένη σταθερότητα σε σχέση με τα μικύλλια που σχηματίζονται συμβατικά. Η υψηλή αυτή σταθερότητά τους εξασφαλίζει την αντοχή του σκευάσματος και την ακέραιη άφιξή του στον τελικό ιστό.

Μεταξύ των αμφιφιλικών μονομερών των μικυλλίων μπορούν να συνδυαστούν και μεμονωμένα μονομερή με διαφορετική υδροφιλικότητα, ενώ στην υδρόφιλη αλυσίδα του πολυμερούς μπορούν να προστεθούν υδρόφοβες ομάδες. Το βασικότερο όμως πλεονέκτημα των μικυλλίων έγκειται στη δυνατότητα που παρέχουν της εξειδίκευσής τους στον ιστό ή στο όργανο που είναι να δράσουν. Αυτό επιτυγχάνεται είτε από τα φυσικά χαρακτηριστικά των μικυλλίων που δεν επιτρέπουν την κατακράτησή τους ή τη διαπερατότητά τους από όλους τους ιστούς είτε από την προσθήκη δεικτών στην επιφάνειά τους, όπως αντισώματα, πεπτίδια, λεκτίνες, σακχαρίνες, ορμόνες ή άλλα μικρού μοριακού βάρους μόρια με χαρακτηριστική εκλεκτικότητα στις περιοχές δράσης και ενδιαφέροντος.

Τα πιο εύχρηστα μικύλλια είναι πολυμερή πολυαιθυλενογλυκόλης-φωσφατιδιλαιθανολαμίνης (polyethylene glycol-phosphatidylethanolamine) που αρχικά προέκυψαν τυχαία, κατά την προσπάθεια παρασκευής λιποσωμάτων σε υδατικό διάλυμα. Ως μορφή μειώνουν την ελεύθερη ενέργεια του συστήματος απομακρύνοντας τις υδρόφοβες ομάδες από το υδατικό περιβάλλον και αποκαθιστώντας τους δεσμούς υδρογόνου του διαλύματος. Είναι αρκετά σταθερές μορφές, χωρίς όμως να φθάνουν το χρόνο ζωής των φυσικών λιποσωμάτων, αλλά

μπορούν λόγω της ομοιότητάς τους να κυκλοφορούν για μεγάλο χρονικό διάστημα στον οργανισμό.

Εφαρμογές μικυλλίων ως φορείς φαρμάκων αφορούν τη βιταμίνη K3, την πακλιταξέλη, το δεκαλίνιο και την ταμοξιφαίνη. Μικύλλια παρασκευασμένα από λιπαρά οξέα συνδεδεμένα με Fab-κομμάτια αντισωμάτων εξειδικευμένα για τα αντιγόνα των εγκεφαλικών γαγγλιο-κυττάρων, μικύλλια από πολυαιθυλενογλυκόλη-πολυ(DL-λακτίδιο) με υδατάνθρακες στην επιφάνειά τους, μικύλλια από πολυ-(L-ιστιδίνη)- πολυ-αιθυλενογλυκόλη ή πολυ-(L-λακτικό οξύ)-πολυ-αιθυλενογλυκόλη που να φέρουν φολικά υπολείμματα είναι παραδείγματα εξειδικευμένων υποστρωμάτων, με στόχο τους κύτταρα συγκεκριμένου οργανικού ιστού.

Παρόμοιες εφαρμογές με την πολυαιθυλενογλυκόλη, στην παρασκευή μικυλλίων, έχει τα τελευταία χρόνια και η πολυβινυλοπυρρολιδόνη. Τα προϊόντα του με προσθήκη υπολειμμάτων στεατικού και παλμιτικού χαρακτηρίζονται από σταθερότητα και μικρή κατανομή μεγέθους, και μπορούν να γίνουν και αυτά φορείς φαρμάκων, διευρύνοντας την εφαρμογή των πολυμερικών μικυλλίων.

A.3.3. Κολλαγόνο³⁹

Το κολλαγόνο, πολυμερές υλικό φυσικής προέλευσης, είναι αρκετά σημαντικό ως φορέας φαρμάκων στον ανθρώπινο οργανισμό. Η μοναδικότητα της δομής του καθώς και η δυνατότητά του να συνδέεται με υποκαταστατάτες με ενδο- αλλά και διαμοριακές αλληλεπιδράσεις, του επιτρέπει το σχηματισμό μορφών με ιδιαίτερη μηχανική σταθερότητα και άλλα φυσικά χαρακτηριστικά. Βιοϋλικά με βάση τους το κολλαγόνο, χαρακτηρίζονται από βιοσυμβατότητα, από έλλειψη τοξικότητας και έχουν αρκετή ερευνητική βιβλιογραφία που να αναφέρει δομικά, φυσικά, χημικά, βιολογικά και τα ανοσοποιητικά χαρακτηριστικά τους.

Η πιο συνήθης πηγή κολλαγόνου είναι βόειοι ή χοίρειοι ιστοί που υφίστανται αρχικά επεξεργασία, καθαρισμό, πιθανώς και ενζυμική αποικοδόμηση και ακολούθως πολυμερισμό ακόμα και σε δομές μεγαλύτερης τάξης από τις φυσικές, πριν την οποιαδήποτε βιολογική ή φαρμακευτική χρήση τους.

Οι αιτίες που οδήγησαν στη χρήση του κολλαγόνου ως φορέα αντιβιοτικών φαρμάκων στην χειρουργική και νοσηλευτική ήταν:

- η ανάγκη για τοπική χρήση αντιβιοτικών, με μεγάλη κυτταρική και μη εκλεκτική απορροφητικότητα ή με σημαντική οργανική τοξικότητα,
- η ανεπαρκής τροφοδοσία του αντιβιοτικού στην περιοχή του τραύματος εξαιτίας της μικρής κυκλοφορίας αίματος,
- η δυνατότητά του να δίνει υψηλά επίπεδα τοπικής συγκέντρωσης του φαρμάκου χωρίς όμως να φτάνει στο μέγιστο του συστήματος
- και το γεγονός πως είναι βιοσυμβατό και βιοαποικοδομήσιμο.

Στα οφέλη της τοπικής εφαρμογής του αντιβιοτικού περιλαμβάνονται η μείωση των αλλεργικών αντιδράσεων, η σταθεροποίηση της θερμοκρασίας του σώματος, η συμβατότητα με τους ιστούς, η βακτηριοκτόνος δράση και η μικρή τους αντίσταση, η δυνατότητα ευρύτερης δράσης του, η μη παρεμπόδισή του από την παρουσία βιολογικών ιών ή το πύον. Στις εφαρμογές της χορήγησης αυτής περιλαμβάνεται η χορήγηση γενταμικίνης και τομπραμυκίνης, ενώ έχουν γίνει μελέτες με μινοκυκλίνη, τετρακυκλίνη, τεϊκοπλανίνη και συλβακταμική σεφοπεραζόνη.

A.3.4. Κυκλοδεξτρίνες

Οι κυκλοδεξτρίνες δεν θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν πολυμερή, όπως οι κίτοσάνες ή το κολλαγόνο, είναι όμως ολιγομερή, συγκεκριμένου μοριακού βάρους που χρησιμοποιούνται πολύ συχνά ως φορείς φαρμάκων. Οι κυκλοδεξτρίνες είναι κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες αποτελούμενοι από μόρια α-D- γλυκοπυρανόζης που συνδέονται με α -1→4 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Κάθε μονάδα γλυκοπυρανόζης έχει τρεις υδροξυλομάδες, η πρωτοταγής βρίσκεται στον άνθρακα C6 και οι δυο δευτεροταγείς στους άνθρακες C2 και C3. Οι υδροξυλομάδες βρίσκονται στην εξωτερική τους επιφάνεια και διευκολύνουν την διαλυτότητά τους στο νερό. Το εσωτερικό των κυκλοδεξτρινών είναι υδρόφοβο λόγω της παρουσίας των αιθερικών δεσμών -O- του οξυγόνου. Η ιδιαιτερότητα, λοιπόν, των κυκλοδεξτρινών είναι στο σχήμα τους (επιφάνεια κόλουρου κώνου) και στην ιδιότητά τους να εγκλωβίζουν στην κοιλότητά τους όλο ή τμήμα του υδρόφοβου μέρους ενός δυσδιάλυτου μορίου, αυξάνοντας τη διαλυτότητα της μορφής και την ποσότητα του φαρμάκου που φθάνει στην περιοχή δράσης του.

Σε πολλά φαρμακευτικά μόρια, η δυσδιαλυτότητα των ουσιών αντιμετωπίζεται με τη χρήση κυκλοδεξτρινών, που εγκλωβίζουν στην κοιλότητά τους το υδρόφοβο κομμάτι του μορίου και αυξάνουν τη διαλυτότητά του. Η χρήση όμως κυκλοδεξτρινών στα φαρμακευτικά σκευάσματα είναι περιορισμένη λόγω των προβλημάτων μορφοποίησης του σκευάσματος ή και της πιθανής τοξικότητας που η περίσσειά της μπορεί να προκαλέσει. Πρόσφατα, η έκταση της συμπλοκοποίησης και η διαλυτότητα των κυκλοδεξτρινών σε υδατικά διαλύματα έχουν αυξηθεί με την προσθήκη υδατοδιαλυτών πολυμερών όπως η πολυβινυλοπυρρολιδόνη. Η στρατηγική αυτή κίνηση μπορεί να οδηγήσει στη μείωση του απαιτούμενου ποσού της κυκλοδεξτρίνης αλλά και την αύξηση της χρησιμότητάς της. Ως παράδειγμα αναφέρεται παράγωγο της ναφθοκινόνης⁴⁰. Οι μελέτες στο τελευταίο απέδειξαν τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με το καρβονύλιο του PVP σε μεγαλύτερη ένταση και λιγότερο στο άζωτο λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης.

Στην περίπτωση της ναπροξένης, η συμπλοκοποίηση με HP-β-CD περιορίζει τις παρενέργειές της στο γαστρεντερικό σύστημα. Ο σχηματισμός του συμπλόκου δείχνει να ευνοείται από την παρουσία PVP⁴¹. Η βινποκετίνη, δυσδιάλυτο φάρμακο, συμπλέκεται με β-κυκλοδεξτρίνη, για την αύξηση της διαλυτότητάς της, και μορφοποιείται σε δισκία με υδροξυπροπυλομεθυλοκυτταρίνη για την επιβράδυνση της αποδέσμευσής της.⁴² Βελτίωση επίσης στη διαλυτότητά τους παρουσιάζουν η βρομαζεπάμη⁴³, η σπαραφλοξασίνη⁴⁴ παρουσία β-κυκλοδεξτρινών.

Η συμπλοκοποίηση με τις κυκλοδεξτρίνες, και κυρίως η στοιχειομετρία του συμπλόκου που προκύπτει μπορεί να επιβεβαιωθεί με διάφορες μεθόδους (π.χ. Job plot). Στις περισσότερες περιπτώσεις περιλαμβάνει παρασκευή μιγμάτων του υπό μελέτη συνδυασμού κυκλοδεξτρίνης - δραστικού συστατικού και παρακολούθηση κάποιας φυσικής ιδιότητας του μίγματος που επηρεάζεται από την συμπλοκοποίηση (διαλυτότητα, απορρόφηση στο UV). Υπάρχει η δυνατότητα να παρακολουθηθεί και με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού καταγράφοντας το μέγεθος της μεταβολής στη θωράκιση των εσωτερικών πρωτονίων της κυκλοδεξτρίνης ενώ με φασματοσκοπία δυο διαστάσεων μπορούν να προκύψουν πληροφορίες για τη μορφή του συμπλόκου (δομικά για τον τρόπο εγκλωβισμού του δραστικού συστατικού στην κοιλότητα).

A.3.5. Πολυβινυλοπυρρολιδονη (PVP)

Αρκετά είναι τα φαρμακευτικά μόρια που έχουν μελετηθεί για την ικανότητά τους να συμπολοκοποιούνται με το PVP, σε υμένα πολυμερούς, και να δίνουν σταθερές μορφές. Παράδειγμα είναι η περίπτωση της ιμπουπροφένης⁴⁵ που χρησιμοποιώντας CO₂, σε υπερκρίσιμη κατάσταση, αλληλεπιδρά με τις καρβονυλικές ομάδες του πολυμερούς και σταθεροποιείται.

Άλλα παραδείγματα, διασποράς στερεών σε PVP, που έχουν μελετηθεί είναι η πιροξικάμη, η οξεϊκή υδροκορτιζόνη, η ινδομεθακίνη, η καρβαμαζεπίνη και η νιφεδιπίνη.

A.4. Σκευάσματα πολυμερών και αλληλεπιδράσεις⁴⁶

A.4.1. Σκευάσματα διασποράς στερεών (SOLID DISPERSION)

Ο όρος «σκευάσματα διασποράς στερεών» χρησιμοποιείται για να περιγράψει τα φαρμακευτικά σκευάσματα όπου το φαρμακευτικό μόριο διασπείρεται σε κάποιο βιολογικά συμβατό υλικό με σκοπό τη βελτίωση της φαρμακοκινητικής του. Το υλικό του φορέα παραδοσιακά ήταν κάποιο υδατοδιαλυτό ή αναμίξιμο με το νερό πολυμερές όπως η προπυλενογλυκόλη (PEG), η πολυβινυλοπυρρολιδόνη (PVP) ή μικρού μοριακού βάρους υλικά όπως τα σάκχαρα. Η εξέλιξη όμως της έρευνας όπως αυτή μπορεί να παρακολουθηθεί από το πλήθος των επιστημονικών άρθρων, οδήγησε σε διεύρυνση των χρησιμοποιούμενων υλικών ώστε σε αυτά να περιλαμβάνονται και μη υδατοδιαλυτά υλικά όπως Gelucires και Eudragits που μπορούν να συμβάλλουν στην αργή ή γρήγορη απελευθέρωση και απορρόφηση του φαρμάκου.

Γίνονται πολλές αναφορές στη βιβλιογραφία για προσπάθειες παρασκευής των στερεών συστημάτων διασποράς και μελέτης τους ενώ σε αρκετές από τις τελευταίες μελέτες αναφέρεται η χρήση επιφανειακά ενεργών φορέων και η εφαρμογή της εκβολής τήξης (melt extrusion) των διασπορών σε PVP για την παρασκευή ενεσίμων μορφών της τεχνολογίας αυτής.

A.4.2. Προβλήματα σκευασμάτων διασποράς στερεών

Το γεγονός πως τα σκευάσματα στερεής διασποράς απαιτούν μόνο το δραστικό φάρμακο και τον φορέα του καθώς και το γεγονός πως βελτιώνουν το ρυθμό διαλυτοποίησης και τη φαρμακοκινητική τους δεν είναι αρκετό για την επέκταση της βιομηχανικής παραγωγής τους. Η προβλεψιμότητα της συμπεριφοράς των σκευασμάτων διασποράς στερεού-στερεού είναι μικρή, λόγω της αδυναμίας κατανόησης των βασικών τους χαρακτηριστικών τους.

- Η δομή του σκευάσματος, η κατανομή δηλαδή του φαρμάκου στο υπόστρωμα, για τις περισσότερες περιπτώσεις δεν είναι σαφής. Αν και τεχνικές όπως DSC, XRD και μικροσκοπία ζεστής στοιβάδας (hot stage microscopy) έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί, η ερώτηση για τη μοριακή μορφή του φαρμάκου, κρυσταλλική ή άμορφη, συχνά μένει αναπάντητη. Η σύγχρονη χρήση νέων τεχνικών, όπως φασματοσκοπία FT-IR, Raman φασματοσκοπία και NMR στερεής κατάστασης, έχει βοηθήσει αρκετά το χαρακτηρισμό των σκευασμάτων

- Ο μηχανισμός που ακολουθείται προκαλώντας την αύξηση της διαλυτοποίησης δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητός.

- Η αστάθεια που παρουσιάζουν τα σκευάσματα διασποράς κατά την αποθήκευσή τους / παραμονή τους δεν έχει κατανοηθεί ακόμα και ο μηχανισμός δεν έχει αποκαλυφθεί.

- Η αδυναμία να συσχετισθεί η *in vivo* με την *in vitro* συμπεριφορά τους.

B. ΠΟΛΥ-ΒΙΝΥΛΟΠΥΡΡΟΛΙΔΟΝΗ (PVP) ⁴⁷

Η πολυ-βινυλοπυρρολιδόνη, με τον συνήθη συμβολισμό PVP ως πολυμερές, είναι ένα αρκετά σημαντικό βιοσυμβατό πολυμερές και είχε χρησιμοποιηθεί τόσο σαν υποκατάστατο του αίματος όσο και σαν διογκωτικό του. Οι ενδοφλέβιες εφαρμογές του είναι πλέον περιορισμένες διότι δεν μεταβολίζεται ούτε διασπάται με αποτέλεσμα τμήματα μεγάλου μοριακού βάρους να δεσμεύονται μέσα στον οργανισμό. Επειδή όμως δεν εμφανίζει κάποια δραστηριότητα, χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό σε φαρμακευτικά σκευάσματα και τρόφιμα. Μίγματα πολυμερών με PVP έχουν μεγάλη ποικιλία εφαρμογών από συνθετικές μεμβράνες ως εμφυτεύματα εναπόθεσης φαρμακευτικών μορίων, π.χ. συμπολυμερές του PVP χρησιμοποιείται ως υλικό μεμβράνης για την αιμοδιάλυση. Σύγχρονες έρευνες έχουν παρουσιάσει ενδιαφέρον για το τροποποιημένο PVP που μπορεί να αντιδράσει με άλλα υλικά και να σχηματίσει χρήσιμα βιο-υλικά.

Το PVP παρουσιάζει ενδιαφέρον ως υλικό από επιστημονικής άποψης. Εμφανίζει αμφιφιλική συμπεριφορά αφού επαναλαμβάνεται στη δομή του η εξαιρετικά πολική αμιδομάδα που ευθύνεται για την υδροφιλικότητα και την πολικότητα, αλλά και οι άπολες μεθυλεν- και μεθυνο-ομάδες στη ραχοκοκαλιά της αλυσίδας που συμβάλλουν στις υδροφοβικές του ιδιότητες. Αυτές οι δομικές ιδιαιτερότητες επιτρέπουν στο PVP να αλληλεπιδρά με μια μεγάλη ποικιλία μορίων με δεσμούς υδρογόνου, αλλά και με μη πολικές χαρακτηριστικές ομάδες όπως αυτό παρατηρείται από την ικανότητά του να δεσμεύει μικρά μόρια όπως το ιώδιο, β -καροτένιο, τολβουταμίδιο, γρισεοφουλβίνη και ρεζερπίνη.

Από τη βιβλιογραφία, το φάσμα ^1H 2 διαστάσεων (2D-NOESY ^1H NMR) για το PVP 29K αποκαλύπτει τις ενδο-αλληλεπιδράσεις που συντελούν στη δομή του πολυμερούς.

Η σύνδεση του PVP με ανιοντικές μορφές μορίων ή πολυμερών εξηγείται βάσει της μετατροπής της δομής της πυρρολιδόνης που αφορά τη θετική φόρτιση του αζώτου και την αρνητική του οξυγόνου του καρβονυλίου.⁴⁸

B.1.Αναλυτικές τεχνικές - πολυμερή

Η πιο συνηθισμένη τεχνική για την εύρεση του μοριακού βάρους των πολυμερών είναι η χρωματογραφία διαπέρασης γέλης (ή χρωματογραφία διείσδυσης πηκτής).

Οι συνθήκες που αναφέρουν οι Zeng & Martin⁴⁹ περιλαμβάνουν διαλυτοποίηση του πολυμερούς σε διμεθυλφορμαμίδιο, διάλυμα 0,2 % w/w, ανάλυσή του με στήλη PLgel 2 × mixed bed-B, 30 cm μήκος και 10 μm μέγεθος σωματιδίων, στους 80 °C και κινητή φάση 0,1 % (w/v) οξικού αμμωνίου σε διμεθυλφορμαμίδιο στο 1 ml/min. Ο χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής είναι δείκτη διάθλασης.

*(α)Συνδυαστικές τεχνικές (hyphenated techniques)*⁵⁰

Τα συνθετικά πολυμερή είναι, εξορισμού, ετερογενή και πολύπλοκα υλικά. Γενικά η δομή ενός μακρομορίου περιγράφεται από το μέγεθος, τη χημική δομή του και την αρχιτεκτονική του. Για την πλήρη περιγραφή του, είναι απαραίτητη η γνώση τόσο του κορμού του μακρομορίου όσο και των ομάδων στα άκρα της αλυσίδας. Η δομική ετερομορφία των πολυμερών οφείλεται στη δυνατότητα που έχουν τμήματα αλυσίδας στη δομή του να περιστρέφονται γύρω από απλούς δεσμούς και να αλλάζουν την ενεργειακή κατάσταση του ίδιου μακρομορίου.

Η χρήση των παραδοσιακών μεθόδων ανάλυσης, όπως φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού ή πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) επιτρέπει τον προσδιορισμό της επαναλαμβανόμενης δομικής μονάδας (μονομερούς) ή των χαρακτηριστικών ομάδων στην αλυσίδα. Η προσέγγιση όμως των τελικών ομάδων δεν είναι εύκολη, ιδίως για τις μεγαλύτερες αλυσίδες, λόγω της πολύ μικρής τους συγκέντρωσης. Ο καλύτερος τρόπος πλήρους ανάλυσης σύνθετων πολυμερών είναι η εφαρμογή 2 διαστάσεων, αναλυτικών τεχνικών.

Η αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτή μάζας, έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση πολυμερών, αλλά σε μικρή κλίμακα, λόγω της μειωμένης πτητικότητας των μεγαλομορίων. Ο συνδυασμός της με πυρόλυση όμως λύνει το πρόβλημα της πτητικότητας. Η χρήση χρωματογραφικών τεχνικών, όπως χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους και χρωματογραφία στο κρίσιμο σημείο της προσρόφησης, επιτρέπει την κατηγοριοποίηση των πολυμερών βάση διαφόρων παραμέτρων της ανομοιογένειάς τους, όπως μοριακή μάζα, λειτουργικότητα αλλά και χημική σύσταση.

(β) Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (XAM)

Ο μηχανισμός διαχωρισμού της XAM στηρίζεται στον μοριακό υδροδυναμικό όγκο. Για ομογενή πολυμερή, υπάρχει μία συσχέτιση μεταξύ χρόνου έκλουσης και μοριακής μάζας. Για το λόγο αυτό και χημικά παρόμοια πολυμερή γνωστής μοριακής μάζας μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπα ανάλυσης.

Στην περίπτωση όμως τυχαίων και διακλαδισμένων πολυμερών και συμπολυμερών, η αναλογία αυτή δεν ισχύει και η ανάλυσή τους βελτιώνεται με τη χρήση εκλεκτικών φασματοσκοπικών τεχνικών. Συνήθως επιλέγονται ανιχνευτές ευαίσθητοι στη μοριακή μάζα, αλλά επειδή η απόκρισή τους συνήθως είναι ανάλογη και της συγκέντρωσης συνδυάζονται με ανιχνευτές που να αποκρίνονται στη μεταβολή της συγκέντρωσης και μόνο, όπως είναι ο ανιχνευτής διαφορικού ιξώδους, ο ανιχνευτής σκέδασης ακτίνας laser μικρής γωνίας και ο ανιχνευτής σκέδασης ακτίνας laser πολλαπλής γωνίας.

Μια άλλη προσέγγιση αφορά το συνδυασμό XAM με ανιχνευτές πολλαπλών συγκεντρώσεων. Συνηθέστερος συνδυασμός είναι ανιχνευτής υπεριώδους και γωνίας διάθλασης.

(γ) Χρωματογραφία δυο διαστάσεων

Με τη χρήση των διαφόρων μορφών υγρής χρωματογραφίας, είναι δυνατός ο εκλεκτικός διαχωρισμός πολυμερών βάση του υδροδυναμικού τους όγκου, της χημικής τους σύστασης ή της λειτουργικότητάς τους. Συνδυάζοντας δυο διαφορετικές χρωματογραφίες ή χρησιμοποιώντας έναν εκλεκτικό ανιχνευτή

εξάγονται πληροφορίες δυο διαστάσεων πάνω σε διαφορετικές πλευρές της μοριακής ετερογένειας.

(δ) Υγρή Χρωματογραφία στο κρίσιμο σημείο προσρόφησης

Η χρωματογραφία στο κρίσιμο σημείο της προσρόφησης (LC-CC, «*at the critical point of adsorption*») συνδέεται με τη χρωματογραφική κατάσταση όπου οι αλληλεπιδράσεις των μακρομορίων και του υλικού της στήλης ισορροπούν μεταξύ τους. Η κατανομή του δείγματος δεν εξαρτάται από το μέγεθος του μακρομορίου και όλα τα μακρομόρια με την ίδια χημική δομή εκλούνται από τη χρωματογραφική στήλη ως μια κορυφή και η χρωματογραφική συμπεριφορά εξαρτάται από τη χημική δομή.

Αν και η υγρή χρωματογραφία 2 διαστάσεων είναι πειραματικά πολύ απαιτητική από τις άλλες χρωματογραφικές τεχνικές, ο πλήρης χαρακτηρισμός του δείγματος δίνει πολλές ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες ενώ τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με έναν αρκετά απλό τρόπο.

(ε) Συνδυασμός της υγρής χρωματογραφίας με φασματοσκοπικές τεχνικές

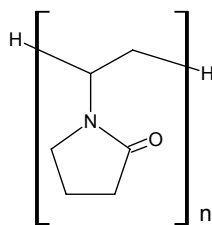
Τα δεδομένα που λαμβάνονται από φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού κατά Fourier, φασματοσκοπία μάζας (MS) ή πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) μπορούν να δώσουν αρκετές δομικές πληροφορίες για το δείγμα. Είναι όμως πολύ δύσκολο να αποδοθούν οι πληροφορίες αυτές σε ένα πολυμερές ή σε 2 συμπολυμερή, κάνοντας αναγκαία μια προ-επεξεργασία του δείγματος που να προωθεί έναν πρώτο διαχωρισμό. Για το λόγο αυτό, τα παραπάνω συστήματα φασματοσκοπίας είναι συνδεδεμένα με XAM, HPLC ή LC-CC.

B.2. Χαρακτηριστικά PVP - Ιδιότητες (T_g, δίκτυο πολυμερούς, φορέας)

Το PVP είναι ένα από τα πιο εύχρηστα έκδοχα στη φαρμακευτική βιομηχανία, και όπως όλα τα υλικά που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή των φαρμακευτικών σκευασμάτων υφίσταται μια σειρά αναλυτικών ελέγχων. Το μοριακό βάρος, η διαλυτότητα, η κρυσταλλικότητα, το ιξώδες και η διόγκωση που

εμφανίζει επηρεάζουν σημαντικά τη συμπεριφορά και τις εφαρμογές του, όπως συμβαίνει στα περισσότερα πολυμερή. Για να χρησιμοποιηθεί στη μορφοποίηση κάποιου φαρμακευτικού σκευάσματος θα πρέπει να έχει το κατάλληλο μοριακό βάρος, κατάλληλη μεταβατική θερμοκρασία (T_g) από την υαλώδη στην άμορφη κατάσταση, οι χαρακτηριστικές του ομάδες να μην αντιδρούν με τη δραστική ουσία, τα προϊόντα διάσπασής του να μην εμφανίζουν τοξικότητα.

Στην περίπτωση του PVP οι δοκιμασίες στις οποίες πρέπει να υποβληθεί, ορίζονται, για τις ελληνικές φαρμακοβιομηχανίες από την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία.⁵¹ Μια σύντομη αναφορά στις δοκιμασίες αυτές αποκαλύπτει τα χαρακτηριστικά του πολυμερούς που έχουν αξιολογηθεί από τη μέχρι στιγμής έρευνα και εργαστηριακή εμπειρία ως σημαντικά.



Σχήμα Β.2.2. Επαναλαμβανόμενη μονάδα πολυβινυλοπυρρολιδόνης

Το PVP είναι πολυμερές οπότε δεν διαθέτει συγκεκριμένο μοριακό βάρος αλλά αλυσίδες επαναλαμβανομένων πυρρολιδονών, μοριακού βάρους 111,11. Αντί μοριακού λοιπόν βάρους, χαρακτηριστικό του είναι το % του αζώτου που δίνεται ως προς άνυδρη ουσία και κυμαίνεται από 11,5 έως 12,8 %. Η τιμή της στοιχειακής αυτής ανάλυσης εκφράζει την παρουσία των πυρρολιδονών σε όλη την αλυσίδα του πολυμερούς. Πιθανή απόσπαση των υποκαταστατών της αλυσίδας θα είχε ως αποτέλεσμα το έλλειμμα αζώτου στο σύνολο της μάζας του PVP προς όφελος του ποσοστού του C αλλά και του H, στα αποτελέσματα της στοιχειακής ανάλυσης.

Το μήκος της αλυσίδας του πολυμερούς δεν μπορεί να είναι γνωστό με ακρίβεια, διότι το αποτέλεσμα της συνθετικής διαδικασίας είναι μόρια πολυμερούς ενός εύρους μοριακών βαρών. Η αναπαράσταση του μοριακού βάρους ενός PVP, όπως και άλλων πολυμερών, είναι μια καμπανοειδής καμπύλη, που το μέγιστό της

αποτελεί το χαρακτηριστικό αλλά φαινομενικό μέσο μοριακό βάρος και διαφέρει από τον μέσο όρο όλων των τιμών. Η τιμή αυτή δεν είναι από τις πιο εύκολες πειραματικές μετρήσεις, οπότε αντί αυτής ως χαρακτηριστικό του πολυμερισμού χρησιμοποιείται η τιμή K του πολυμερούς.

Η τιμή K των πολυμερών αποτελεί μια έκφραση του ιξώδους του πολυμερούς η (σχετικό ιξώδες ως προς το ιξώδες του νερού) όταν αυτό μετράται σε διάλυμα πολυμερούς συγκέντρωσης c (g/100ml) και δίνεται από τη σχέση

$$K = \frac{1,5 \log \eta - 1}{0,15 + 0,003c} + \frac{\sqrt{300c \log \eta + (c + 1,5 \log \eta)^2}}{0,15 + 0,003c^2} \quad \text{Εξίσωση B.1.}$$

Τα βασικά λοιπόν χαρακτηριστικά του PVP είναι η τιμή K και το % N. Σημειώνεται πως στη βιβλιογραφία, η τιμή K του PVP παρουσιάζεται να υπολογίζεται και γρήγορα με φασματοσκοπία NIR χρησιμοποιώντας στατιστικό μοντέλο PCA.⁵²

Οι υπόλοιποι έλεγχοι του PVP είναι μια σειρά δοκιμασιών ταυτοποίησης και καθαρότητας, τόσο γενικές όσο και ειδικές για το πολυμερές. Στους ελέγχους ταυτοποίησης συγκαταλέγονται η φασματοσκοπία υπεριώδους, οι χρωματικές αντιδράσεις και η διαλυτότητα σε νερό, αλκοόλη, μεθανόλη και ακετόνη. Στους ελέγχους καθαρότητας ανήκουν η οπτική καθαρότητα και το pH υδατικού διαλύματος, η παρουσία αλδεϋδών, υπεροξειδίων και υδραζίνης, η παρουσία αποσπασμένης πυρρολιδόνης και υπολειμμάτων βινυλοπυρρολιδόνης από τη συνθετική διαδικασία.

Στη βιβλιογραφία, για την T_g του PVP δίνονται διάφορες τιμές, από 86 °C έως 175 °C, αναλόγως την περιεχόμενη υγρασία του. Πιο σωστή απόδοση της T_g είναι περιγράφοντας την προεργασία ξήρανσης του PVP, ώστε να εκτιμάται η υγρασία του, καθώς και τα στοιχεία της πειραματικής τεχνικής που χρησιμοποιήθηκε. Για παράδειγμα, PVP K29 που ξηράνθηκε σε κλίβανο κενού,

στους 60°C πάνω από P₂O₅ για 1 εβδομάδα, έδωσε ευρεία T_g από 143 °C έως 263 °C και με μέση τιμή (δηλαδή T_g) 216 °C.⁴⁷

B.3. Παρασκευή μακρομοριακών συστημάτων – σύνδεση με μη ομοιοπολικούς δεσμούς⁴⁷

Η παρασκευή συστημάτων μακρομορίων βρίσκει εφαρμογές στη μεταφορά και αποδέσμευση φαρμάκων καθώς και στην μηχανική ιστών. Συστήματα όπου η σύνδεση γίνεται με μη ομοιοπολικούς δεσμούς παρασκευάζονται με εξάτμιση υδατικών διαλυμάτων ή με υπερφυγοκέντρωση. Στην πρώτη περίπτωση τα συστατικά αλληλεπιδρούν με διαμοριακές δυνάμεις όσο η απόσταση μεταξύ τους μειώνεται λόγω εξάτμισης του διαλύτη. Η φυγόκεντρος δύναμη που αναπτύσσεται στη δεύτερη τεχνική είναι υπεύθυνη για την προσέγγιση των διαφορετικών συστατικών. Από τους *Pemawansa & Khan*⁴⁷ έχει αναπτυχθεί και μια ακόμα μέθοδος που αφορά την αφυδάτωση αντιστρόφων μικυλλίων.

Στην περίπτωση του PVP και του πολυ-α,L-γλουταμικού νατρίου η δομή του συμπολυμερούς που προκύπτει εξαρτάται από την τεχνική παρασκευής του υπερμοριακού συστήματος. Εάν η επεξεργασία των συστατικών κατά την παρασκευή του συμπολυμερούς αλλάζει την εσωτερική δομή τους, το πιο πιθανό είναι αυτή να έχει διαφοροποιηθεί, και στο τελικό προϊόν στα δυο πολυμερή να έχουν αποκατασταθεί δομές που να ευνοούν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους (π.χ. η αλυσίδα του ενός να εισχωρεί στο πλέγμα του άλλου).

Θερμιδομετρία και T_g

Η διαφορική θερμιδομετρία χρησιμοποιείται διότι αποκαλύπτει εάν ένας συνδυασμός πολυμερούς και φαρμάκου είναι απλό μίγμα ή εάν υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. Στην περίπτωση που οι δυο ουσίες απλά συνυπάρχουν, τότε στη σάρωση του θερμιδομέτρου θα ληφθούν δυο ενδόθερμες κορυφές, μια για την κάθε ουσία, ελαφρά όμως μετατοπισμένες από αυτές των καθαρών ουσιών, όπως ακριβώς συμβαίνει από την παρουσία προσμίξεων. Μετατρέπόμενο όμως το μίγμα φαρμακευτικής ουσίας και πολυμερούς σε άμορφη

μάζα, η θερμοδομετρική σάρωση δίνει μια ενδόθερμη κορυφή, που βρίσκεται μεταξύ των τιμών των δυο συστατικών, και αυτή είναι η T_g του μίγματος. Πέραν όμως της πειραματικά μετρούμενης τιμής, η T_g του μίγματος υπολογίζεται και θεωρητικά από την εξίσωση Gordon-Taylor (Εξίσωση B.2.) που βασίζεται στη προσθήκη ελευθέρων όγκων μεμονωμένα από το κάθε συστατικό, χαρακτηριστικό των ιδεατών μιγμάτων.

$$T_{g12} = w_1 T_{g1} + K w_2 T_{g2} / w_1 + K w_2 \quad \text{Εξίσωση B.2.}$$

όπου T_{g12} είναι η θερμοκρασία μετάπτωσης στην υαλώδη κατάσταση του μίγματος, w_1 , w_2 , είναι το ποσοστό μάζας και T_{g1} και T_{g2} η θερμοκρασία μετάπτωσης του κάθε συστατικού του μίγματος. Η σταθερά K που είναι μια ένδειξη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συστατικών, μπορεί να υπολογιστεί από τη σχέση

$$K = \rho_1 T_{g1} / \rho_2 T_{g2} \quad \text{Εξίσωση B.3.}$$

όπου ρ_1 και ρ_2 είναι οι πραγματικές πυκνότητες των συστατικών.

Η απόκλιση της πειραματικής από την υπολογίσιμη τιμή για την T_g μπορεί να εξηγηθεί από τη διαφορά στο είδος των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μεμονωμένων συστατικών και αυτών στο μίγμα. Εάν το πολυμερές και η φαρμακευτική ουσία συνδέονται ισχυρά μεταξύ τους, τότε η πειραματική T_g θα είναι μεγαλύτερη της προβλεπόμενης, διότι ισχυρότερη σύνδεση σημαίνει μείωση της κινητικότητας της αλυσίδας. Αντιθέτως, όταν η σύνδεση είναι πιο ασθενής από την προβλεπόμενη, τότε η T_g είναι μικρότερη της αναμενόμενης.⁵³

Μια άλλη σχέση που δίνει την T_g είναι αυτή του Fox, με την τροποποιημένη του μορφή ώστε να περιλαμβάνει και την αλληλεπίδραση του πλαστικοποιητή

$$\frac{1}{T_g} = \frac{w_{PVP}}{T_{gPVP}} + \frac{w_{H_2O}}{T_{gH_2O}} + \frac{w_{pl}}{T_{gpl}} \quad \text{Εξίσωση B.4.}$$

με T_g τη θερμοκρασία πλαστικοποίησης και w το ποσοστό μάζας για το PVP, το νερό και τον πλαστικοποιητή αντιστοίχως.

Οι αναφερόμενες παραπάνω σχέσεις, μερικές φορές συμπληρώνονται από παραμέτρους, όπως το ποσοστό του αδέσμευτου συστατικού μέσα στο μίγμα, με σκοπό την εξήγηση και την αλγοριθμική απόδοση των αποκλίσεων από τις πειραματικές τιμές.

Αρκετές είναι οι σχέσεις που έχουν προταθεί για να εκφράσουν την εξάρτηση της T_g από τη σύσταση των μιγμάτων πολυμερών και των πλαστικοποιημένων συστημάτων. Η γενικότερη παρατήρηση είναι πως η T_g μεταβάλλεται αναλογικά με την σύσταση του μίγματος και η όποια απόκλιση από τις μετρούμενες τιμές συνήθως θεωρείται ως ένδειξη της δύναμης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων των συστατικών. Όταν τα μίγματα περιλαμβάνουν ισχυρά αλληλεπιδρόμενα ζευγάρια, συγκεκριμένοι δεσμοί γεφυρώνουν της μεγάλες αλυσίδες από επαναλαμβανόμενες μονάδες, μειώνοντας τον ελεύθερο χώρο ανάμεσά τους και αυξάνοντας την πυκνότητα και την συνοχή του υλικού.

Επίσης, ενδείξεις για την ύπαρξη αλληλεπιδράσεων μεταξύ δυο συνυπαρχόντων ουσιών, λαμβάνονται και με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού. Το είδος των κορυφών, θετικές ή αρνητικές, καθώς και η μετατόπισή τους μπορούν εύκολα να μεταφραστούν σε οργανωμένη ή ανοργάνωτη δομή, καθώς και σε μεταβολή της.

B.4. PVP, T_g , και μίγματά του

B.4.1. Πολυ-αιθυλενογλυκόλη ^{54,55,56,57}

Μίγματα της πολυβινυλοπυρρολιδόνης με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) έχουν μελετηθεί αρκετά από την ομάδα των Feldstein & Shangryuk, κυρίως για τις ιδιότητες και την επίδρασή τους στην T_g .

Η συμβατότητα των μιγμάτων PVP-PEG έχει αποδειχθεί από FTIR φασματοσκοπία πως οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις των υδρογόνων των τελικών ομάδων της αλυσίδας του PEG με τα ηλεκτραρνητικά οξυγόνα της καρβονυλομάδας του μονομερούς στη μεγάλη αλυσίδα του PVP. Οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται από την PEG στις επαναλαμβανόμενες μονάδες της PVP οδηγεί στην καλύτερη ταξινόμηση των μακρομορίων του PEG στο μίγμα των πολυμερών, όπως αυτό έχει φανεί από στοιχειομετρικές και δομικές μελέτες των πολυμερών. Οι παρατηρούμενες, λοιπόν, αποκλίσεις στις τιμές T_g από τις εξισώσεις των Fox και Gordon-Taylor, αποδίδονται σε διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου και συμπλέγματα κατιόντων-ανιόντων.

B.4.2.Σουκρόζη

Δεν είναι μόνο το μοριακό βάρος του πλαστικοποιητή που επηρεάζει την T_g αλλά, όπως είναι λογικό, και το μοριακό βάρος του ίδιου του PVP. Η προσέγγιση της παραμέτρου αυτής έγινε στα πλαίσια της μελέτης του πολυμερούς με συν-λυοφιλοποιημένη σουκρόζη, και με προοπτική χρήσης τους σε σταθερότερα σκευάσματα πρωτεϊνών και πεπτιδίων⁴⁹. Τα PVP με διαφορετικά μοριακά βάρη εξετάστηκαν ως προς τις T_g και T_c (θερμοκρασία κρυσταλλοποίησης), με διαφορεική θερμιδομετρία σάρωσης, και ως προς την προσροφητική τους ικανότητα. Αρχικά, παρατηρήθηκε πως διαφορετικά μίγματα PVP – σουκρόζης έδωσαν διαφορετικές ισόθερμες προσρόφησης νερού, αποκαλύπτοντας μια διαφορετική συμπεριφορά τους.

Γενικότερα παρατηρήθηκε αύξηση της T_g του πολυμερούς όσο αυξανόταν το μοριακό του βάρος, το οποίο επεκτείνεται και σαν παρατήρηση στα περισσότερα μίγματά του με την σουκρόζη. Εξαιρούνται από τη γενίκευση αυτή τα μίγματα με πολύ μικρή περιεκτικότητα PVP (~2,5 %) όπου για την περιοχή μοριακού βάρους από 10 έως 300 K, οι τιμές της T_g δεν διαφοροποιήθηκαν σημαντικά.

B.4.3.Πολυακρυλικό οξύ

Τα μίγματα PVP με πολυακρυλικό οξύ (PAA) ανήκουν στις περιπτώσεις μιγμάτων που σχηματίζουν έντονα δεσμούς υδρογόνου. Η δομή των συμπλόκων

αυτών είναι πολύ περίπλοκη λόγω των πολλών δυνατοτήτων, αλλά όπως αναφέρουν στο σχετικό τους άρθρο οι *Kaczmarek et al.*⁴⁸ δεν μπορεί να αποκλειστεί καμία από τις πιθανές μορφές τους.

Η πιο ωφέλιμη χημική ιδιότητα του PVP είναι η αλληλεπίδρασή του με ουσίες μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους σε υδατικά διαλύματα όπως είναι τα ανόργανα ανιόντα, οργανικές ουσίες (αζίδια και φαινόλες), αμίνες, επιφανειοδραστικά, πολυμερή, πρωτεΐνες και φαρμακολογικά δραστικές ουσίες. Για τον λόγο αυτό PVP διαφορετικών μοριακών βαρών έχουν εφαρμογές σε βιομηχανικές παραγωγές φαρμάκων, καλλυντικών και τροφίμων. Σημειώνεται πως η απορρόφηση και κάθαρση των πολυμερών από τα νεφρά εξαρτάται από το μοριακό τους βάρος.⁵⁸

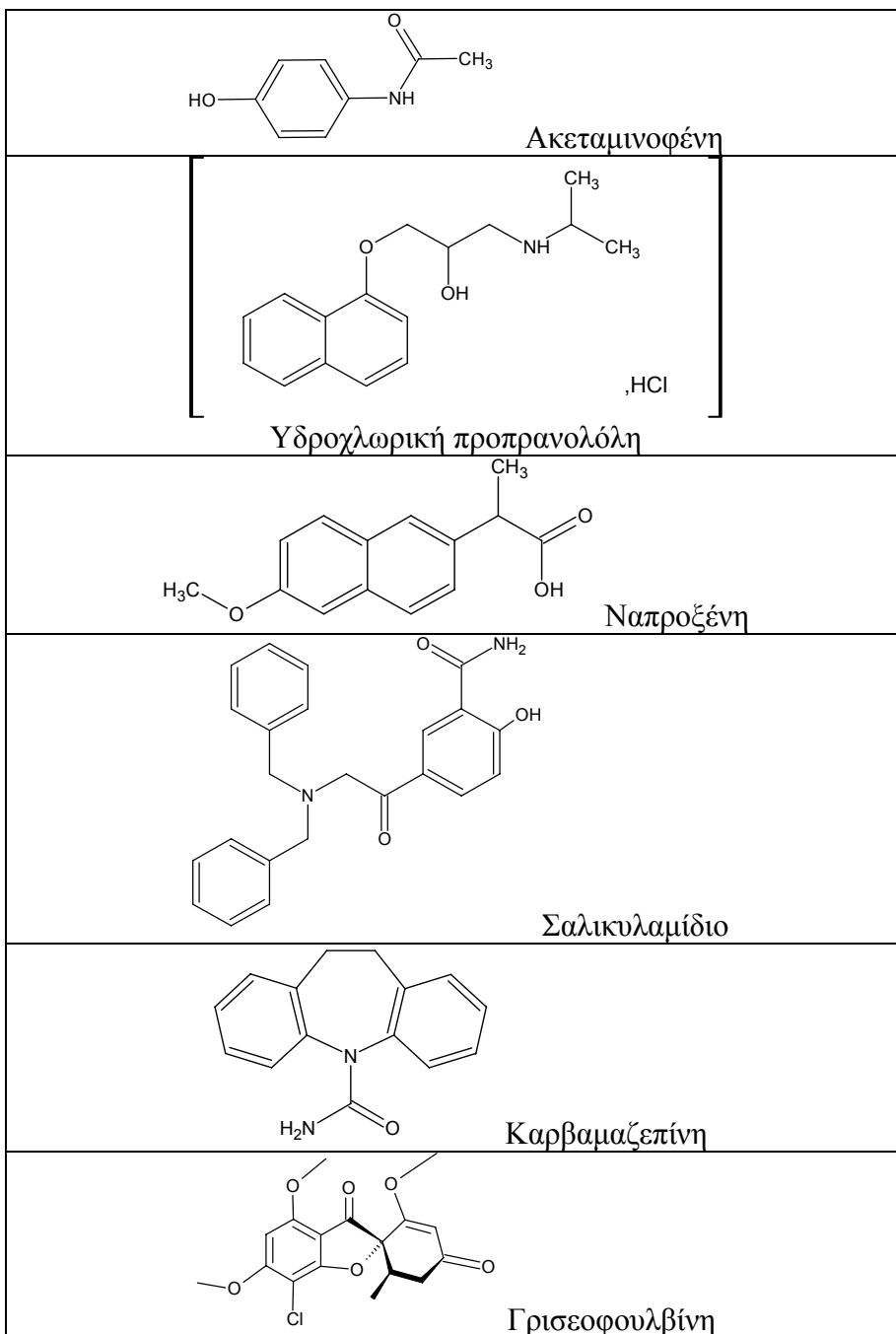
Η μελέτη της θερμικής αποικοδόμησης του PVP, σε θερμοκρασίες άνω των 200 °C, έδειξε έναν κύριο μηχανισμό αποικοδόμησης, όπως αυτός αναλύθηκε με φασματοσκοπία IR. Τα δεδομένα της φασματικής μελέτης απέδειξαν την διάσπαση της αλυσίδας, δίνοντας κορυφές απορρόφησης στις περιοχές που συνδέονται με τη –NH₂ αμινομάδα. Ο πιθανός σχηματισμός της αμμωνίας εξαρτάται από την παρουσία των –NH₂ ομάδων, που πιθανώς να έχουν σχηματιστεί από την πρωτονίωση των ατόμων N στη δομή του PVP. Η πρωτονίωση των αζώτων εξαρτάται άμεσα από το ποσοστό διάσπασης των δεσμών N-C, φασματοσκοπικά δεδομένα επιβεβαιώνουν το γεγονός στους 480 °C του πειράματος, με τον σχηματισμό προϊόντων που επηρεάζουν τόσο τις CH ομάδες όσο και την ακορεστότητα της αλκυλοαλυσίδας.⁵⁹

Σε πρώιμες μελέτες της αλληλεπίδρασης του PVP με την κετοπροφένη, τη νιμεσουλίδη και την πιροξικάμη συζητήθηκε η επίδραση της πίεσης και της θερμοκρασίας κατά την παρασκευή σκευασμάτων πολυμερούς-φαρμάκου. Στις περιπτώσεις όμως αυτές δεν μελετήθηκε η μοριακή κατάσταση του εγκλωβισμένου φαρμάκου, η οποία καθορίζει και την αποδέσμευσή του.

Προσπάθειες παρασκευής και φασματοσκοπικού χαρακτηρισμού μιγμάτων διασποράς περιλαμβάνουν ιμπουπροφένη-πολυαιθυλενογλυκόλη, ιμπουπροφένη-PVP, οξαζεπάμη – PEG, πιροξικάμη-PVP, οξική υδροκορτιζόνη-PVP, ινδομεθακίνη-PVP, νιφεδιπίνη-PVP.^{45,53}

B.5. Αλληλεπιδράσεις PVP με δραστικές ουσίες ⁶⁰

Χρησιμοποιώντας FTIR και διάθλαση ακτίνων X, μπόρεσαν να χαρακτηριστούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του PVP και διάφορων φαρμάκων (σχήμα B.5.1).



Σχήμα B.5.1: Δομές που δημιουργούν έντονους δεσμούς υδρογόνου σε μίγματα PVP και πολυακρυλικού οξέως, σύμφωνα με *Kaczmarek et al.*

Η αξιολόγηση της κρυσταλλικότητας των φαρμάκων με τις ακτίνες X, βασίστηκε στην εμφάνιση οξείων κορυφών που απουσίαζαν στην άμορφη κατάσταση. Από τα φάσματα που προέκυψαν, αποκαλύφθηκε πως μόνο η γκριζεοφουλβίνη διατήρησε την κρυσταλλικότητά της σε όλα της τα μίγματα με το PVP, ένδειξη πως δεν υπάρχει κάποια αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Στο ίδιο συμπέρασμα οδηγεί και η αξιολόγηση των φασμάτων FTIR, όπου δεν παρατηρείται καμία μετατόπιση για την γκριζεοφουλβίνη παρουσία PVP. Οι καρβονυλομάδες δηλαδή της γκριζεοφουλβίνης δεν διαθέτουν την ελευθερία και ευκινησία των υπολοίπων φαρμάκων για την αλληλεπίδραση με το PVP.

Πιο αναλυτικά για τα υπόλοιπα φάρμακα, από τα φάσματα υπεριώδους αποκαλύφθηκαν οι παρακάτω αλληλεπιδράσεις:

- της καρβονυλομάδας του PVP και της αμιδομάδας της ακεταμινοφαίνης
- της καρβονυλομάδας του PVP και της υδροξυλομάδας της υδροχλωρικής προπρανολόλης
- της καρβονυλομάδας του PVP και της υδροξυλομάδας της ναπροξένης
- της καρβονυλομάδας του PVP και της αμιδομάδας του σακκυλαμιδίου
- της καρβονυλομάδας του PVP και της πρωτοταγούς αμινομάδας στην αμιδομάδα της καρβαμαζεπίνης, αλλά για περιεκτικότητες του PVP από 80 % w/w και άνω.

Τα μίγματα των ουσιών του σχήματος 3 με PVP ελέχθησαν ως προς την T_g και τα θερμικά αποτελέσματα έδειξαν συμφωνία με τα φασματικά δεδομένα. Η μη αλληλεπίδραση της γκριζεοφουλβίνης με το PVP δίνει μια μείωση της T_g του PVP που δεν μεταβάλλεται από τη σύσταση του μίγματος φαρμάκου-πολυμερούς. Στις υπόλοιπες πέντε ουσίες η μεταβολή της T_g είναι ανάλογη της σύστασης του μίγματος, επιβεβαιώνοντας τις φασματοσκοπικές παρατηρήσεις για αλληλεπιδράσεις, δεσμούς υδρογόνου, μεταξύ φαρμάκων και πολυμερούς. Για την περίπτωση μάλιστα της καρβαμαζεπίνης, που η αλληλεπίδραση είναι περιορισμένη, η μεταβολή της T_g είναι η μικρότερη που παρατηρείται.

Διαλυτοποίηση-Αποδέσμευση

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης των φαρμάκων με τα έκδοχα, πολυμερή ή σάκχαρα, δεν θα είχε νόημα εάν δεν επηρέαζε τα φαρμακολογικά χαρακτηριστικά του σκευάσματος, την βιοδιαθεσιμότητα και αποδέσμευσή του στον ανθρώπινο οργανισμό. Η συνύπαρξη και αλληλεπίδραση του φαρμάκου με κάποιο από τα έκδοχα του σκευάσματος ή ακόμα και με μια άλλη δραστική ουσία, μπορεί να επηρεάσει τα φυσικά αλλά και χημικά χαρακτηριστικά του, πιθανώς μεταβάλλοντας έτσι και τη δραστικότητά του.

Το πιο απλό ενδεχόμενο της συζητούμενης αλληλεπίδρασης είναι η μείωση της δραστικότητας του φαρμακευτικού σκευάσματος λόγω μετατροπών στη χημική δομή του δραστικού μορίου. Η διάσπαση του φαρμάκου ή η αντίδρασή του προς το σχηματισμό σταθερότερης ουσίας είναι δυο ενδεχόμενα καθόλου απίθανα, τα οποία όμως μπορούν με μεγάλες πιθανότητες να εντοπιστούν κατά τις διάφορες εργαστηριακές και χημικές μελέτες που συνοδεύουν το σχεδιασμό ενός φαρμακευτικού σκευάσματος. Εξίσου πιθανή είναι η μειωμένη δραστικότητα του φαρμακευτικού σκευάσματος λόγω «προσωρινά μη διαθέσιμου» δραστικού συστατικού. Αν και οι χημικοί έλεγχοι αξιολογούν το φαρμακευτικό σκεύασμα και μπορούν να δώσουν την παρουσία του δραστικού σε αυτό ποσοτικά, ανεπηρέαστοι από αλληλεπιδράσεις, αδυνατούν να το αξιολογήσουν ως προς την αποτελεσματικότητα στη χορήγησή του. Είναι πιθανό, η αλληλεπίδραση να μειώνει τη διαθεσιμότητα των δραστικών κέντρων του φαρμάκου στον οργανισμό και να ελαττώνει έτσι τη δραστικότητα του σκευάσματος ή να αλλάζει τη διαλυτότητά του επηρεάζοντας έτσι την απορρόφηση και προσέγγιση της περιοχής δράσης.

Η συμπεριφορά της ναπροξένης τόσο στην εργαστηριακή δοκιμασία όσο και στην χορήγησή του σε πειραματόζωα, έχει μελετηθεί για την κιτοσάνη καθώς και για το PVP.⁶¹ Τα αποτελέσματα μελετών διαλυτοποίησης του σκευάσματος σε εργαστηριακή κλίμακα, έδειξαν πως η παρουσία κάποιου από τα δυο έκδοχα αυξάνει τη διαλυτοποίηση της ναπροξένης, πάντα συγκρίνοντας με τις αντίστοιχες τιμές απουσία της κιτοσάνης και του PVP. Ενώ η αύξηση ήταν της τάξης του 30 % για το PVP, η διαλυτότητα της ναπροξένης αυξήθηκε κατά 40 % παρουσία κιτοσάνης, ενώ

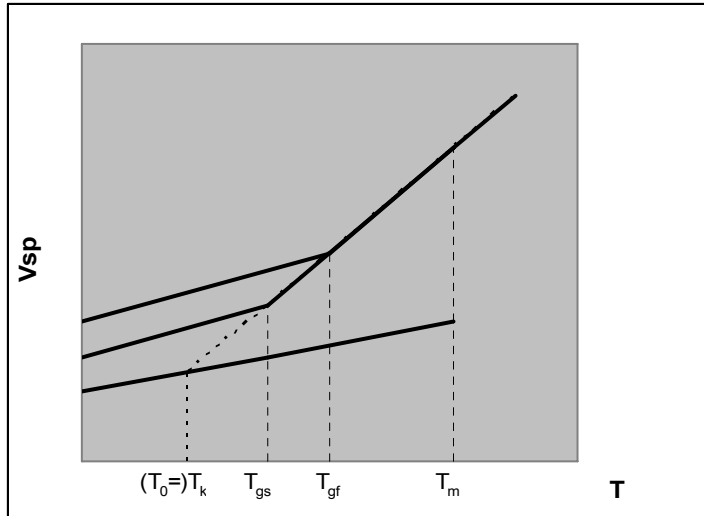
οι τιμές αυτές αφορούν σε σκευάσματα που προετοιμάστηκαν με απλή ανάμιξη των εκδόχων.

Η επίδραση του PVP στην διαλυτοποίηση της πιροξικάμης χρησιμοποιήθηκε από τους *Albertini et al.*⁶² για τη σύγκριση δυο διαφορετικών τεχνικών υγρής κοκκοποίησης. Στα αποτελέσματα συμπεριλήφθηκαν οι τιμές που πήραν για μίγματα δραστικού με PVP K12 και PVP K90, πολυβινυλοπυρρολιδόνες με διαφορετικό μέσο μοριακό βάρος, και συγκρίθηκαν με αυτά μιγμάτων β-λακτόζης. Από τα δεδομένα της δημοσίευσης, παρατηρείται πως ο ρυθμός διαλυτοποίησης της πιροξικάμης, που δεν ξεπερνάει το 40 % στα 10 λεπτά για την καθαρή ουσία, γίνεται σχεδόν 90 % στο ίδιο χρονικό διάστημα για μίγμα της με β-λακτόζη. Στην περίπτωση των PVP K12 και K90, φαίνεται πως τη διαλυτοποίηση επηρεάζει πέραν του μοριακού βάρους του πολυμερούς και η μέθοδος παρασκευής του μίγματος, με αποτέλεσμα το μεγάλο μοριακό βάρος του PVP K90 και η φυσική ανάμιξή του με την πιροξικάμη να παρεμποδίζουν τη διαλυτοποίηση της τελευταίας.

B.6. Θερμοκρασία Μετάβασης στην Υαλώδη από την Άμορφη Κατάσταση⁶³

Η θερμοκρασία μετάβασης στην υαλώδη κατάσταση ανιχνεύεται εύκολα με διάφορες πειραματικές τεχνικές όπως είναι η ογκομετρία, η θερμική ανάλυση, η μηχανική ή διηλεκτρική διασπορά και οι φασματοσκοπικές μέθοδοι.

Παραστατική απεικόνιση των όγκων ενός υλικού που περνάει στην υαλώδη κατάσταση δίνεται στο σχήμα B.6.1.



Σχήμα Β.6.1: Παραστατική απεικόνιση του όγκου ενός υλικού που περά από την άμορφη στην υαλώδη κατάσταση.

Όταν ένα υλικό που μπορεί να περιέλθει στην υαλώδη κατάσταση ψύχεται, ξεκινώντας από υψηλές θερμοκρασίες, μεγαλύτερες από τη θερμοκρασία τήξης, T_m , εύκολα μεταβαίνει σε κατάσταση υπερ-ψύξης χωρίς όμως σημαντικές αλλαγές στην T_m . Η ιδανική διαδικασία ψύξης οδηγεί σε μείωση της κινητικότητας και σε τακτοποίηση των μορίων στο κατάλληλο κρυσταλλικό πλέγμα, στη θερμοκρασία κρυσταλλοποίησης T_c , ενώ περαιτέρω μείωση της θερμοκρασίας ελαττώνει τη δονητική ενέργεια των δομικών μονάδων των κρυστάλλων.

Στην πραγματικότητα, σε μη ιδανικές συνθήκες, η μείωση της θερμοκρασίας σε υλικό που βρίσκεται στην υγρή κατάσταση, οδηγεί στην αλλαγή της θερμικής κατάστασης των μορίων. Η θερμοκρασία αυτή καλείται *θερμοκρασία μετάβασης στην υαλώδη από την άμορφη κατάσταση*, T_g . Αναλόγως του ρυθμού ψύξης η τιμή της T_g αλλάζει και απαραίτητη είναι η συμπλήρωσή της ως παραμέτρου με τις συνθήκες στις οποίες αυτή μετρήθηκε. Ο μεγάλος ρυθμός μείωσης της θερμοκρασίας δεν επιτρέπει χρονικά στα μόρια να προσανατολιστούν και να σχηματίσουν το ιδανικό πλέγμα της ουσίας που περιγράφει τη στερεή κατάσταση, οπότε διατηρούν την τυχαία διάταξη και απλά μειώνεται η κινητικότητά τους. Η μετάβαση στην υαλώδη κατάσταση θεωρείται μια διαδικασία χαλάρωσης ή δυναμικής αλλαγής και όσο πιο μικρός είναι ο ρυθμός μείωσης της θερμοκρασίας

τόσο ελέγχεται ο σχηματισμός δομών χαμηλής ενέργειας στη στερεή κατάσταση αλλά όχι κρυστάλλων.

Η υγρή κατάσταση χαρακτηρίζεται από τυχαία κίνηση και τυχαίο προσανατολισμό των μορίων ενώ τα ίδια χαρακτηριστικά διέπουν και την άμορφη, αν και στερεή, κατάσταση. Στην υαλώδη κατάσταση, δεν υπάρχει κάποια τακτικότητα των μορίων και είναι καλύτερη η προσέγγισή της σαν μια ακόμα υγρή φάση. Πρόκειται όμως για μια θερμοδυναμικά αρκετά ασταθή κατάσταση, που κατά την παραμονή τους τα άμορφα υλικά έχουν την τάση να σχηματίζουν κρυστάλλους. Ο χρόνος αυτός μπορεί να ποικίλει από δευτερόλεπτα έως και χρόνια, παράμετρος σημαντική για την φαρμακευτική βιομηχανία. Ο έλεγχος της κρυσταλλικής κατάστασης είναι ένα από τα βασικά προβλήματα της σταθερότητας των φαρμακευτικών σκευασμάτων διότι το κρυσταλλικό πλέγμα, πέραν της πλεονάζουσας ενέργειας που χρειάζεται *in vitro* και ιδίως *in vivo* για τη διάσπασή του, επηρεάζει τις φαρμακοτεχνικές ιδιότητες και τη φαρμακοκινητική του φαρμάκου.

Στην περίπτωση των πολυμερών υλικών, οι ιδιαίτερες και μοναδικές παράμετροι που αφορούν την υαλώδη κατάσταση είναι η αλλαγή της δομής της αλυσίδας κοντά στην T_g .

Το νερό είναι ένα μικρό μόριο με μεγάλη κινητικότητα και δυνατότητα δημιουργίας δεσμών υδρογόνου που σε συνδυασμό με χαμηλή T_g επιδρά στις φυσικές ιδιότητες και στα χαρακτηριστικά των φάσεων υδροφιλικών πολυμερών σε στερεή κατάσταση. Η σπουδαιότητα του περιεχόμενου νερού οφείλεται στα εξής: (1) η ποσότητα του απορροφούμενου νερού συνδέεται με τις αλληλεπιδράσεις του μίγματος (2) η εξάτμιση του νερού από το μίγμα δίνει σημαντικές πληροφορίες για την φάση και τη μορφολογία του πολυμερούς (3) οι αλληλεπιδράσεις νερού- πολυμερούς συχνά είναι ωφέλιμες ή καταστρεπτικές για τα εμπορικά πολυμερή.

Μελέτες των *Zografí et Oksanen*⁶⁴ έδειξαν πως συγκεκριμένος αριθμός μορίων απορροφούμενου νερού είναι *σφιχτά δεμένα* (tightly bound) με τη στερεή φάση ενώ τα πλεονάζοντα απορροφούμενα μόρια έχουν έναν χαρακτήρα διαλύτη. Οι

αλλαγές στις ιδιότητες του νερού και του πολυμερούς μπορούν να ερμηνευθούν καλύτερα εάν γίνει αντιληπτή η δράση του νερού στη μάζα του άμορφου πολυμερούς σαν πλαστικοποιητής που ταπεινώνει την T_g . Επειδή οι ιδιότητες του ιξώδους και της ελαστικότητας του πολυμερούς διαφοροποιούνται σημαντικά κάτω και πάνω από την T_g , είναι πολύ πιθανό οι αλλαγές στις ιδιότητες του απορροφούμενου νερού να προέρχονται από την αλλαγή της φυσικής κατάστασης του πολυμερούς κατά την πλαστικοποίηση. Έτσι, το σφιχτά δεμένο νερό μπορεί απλά να είναι η ακινητοποίηση του νερού από την υψηλή πυκνότητα της υαλώδους κατάστασης, ενώ ο χαρακτηρισμός του νερού-διαλύτη απεικονίζει το χαμηλότερο ιξώδες της πλαστικοποιημένης κατάστασης του πολυμερούς πάνω από την T_g .

B.7. Πολυ-βινυλοπυρρολιδόνη ως παράγοντας σταθεροποίησης

Σε πολλά φαρμακευτικά μόρια, η δυσδιαλυτότητα στο νερό των δραστικών ουσιών αντιμετωπίζεται με τη χρήση κυκλοδεξτρινών, που εγκλωβίζουν στην κοιλότητά τους το υδρόφοβο τμήμα του μορίου και αυξάνουν τη διαλυτότητά του. Η χρήση όμως κυκλοδεξτρινών στα φαρμακευτικά σκευάσματα είναι περιορισμένη λόγω των προβλημάτων μορφοποίησης του σκευάσματος ή και της πιθανής τοξικότητας που μπορεί να προκαλέσει η περίσσεια κυκλοδεξτρίνης. Πρόσφατα, η αποτελεσματικότητα της συμπλοκοποίησης και η διαλυτότητα των κυκλοδεξτρινών σε υδατικά διαλύματα έχουν αυξηθεί με την προσθήκη υδατοδιαλυτών πολυμερών όπως η πολυ-βινυλοπυρρολιδόνη. Η στρατηγική αυτή κίνηση μπορεί να οδηγήσει στη μείωση του απαιτούμενου ποσού της κυκλοδεξτρίνης άρα και την αύξηση της χρησιμότητάς της. Ως παράδειγμα αναφέρεται παράγωγο της ναφθοκινόνης⁴⁰.

Άλλο παράδειγμα σταθεροποίησης παρουσία PVP είναι η απαμίδωση⁶⁵ εξαπεπτιδίου Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Ala που παρατηρείται τρεις φορές μεγαλύτερη παρουσία PVA σε σχέση με το PVP, σε συνθήκες κάτω από την T_g ενώ στη θερμοκρασία T_g οι κινητικές εξισώνονται. Η κινητικότητα του πεπτιδίου επηρεάζει την απαμίδωση, ενώ το νερό μπορεί να επηρεάσει τόσο ως διαλύτης όσο και σαν φορέας πρωτονίων.

Τα υπολείμματα υγρασίας μπορούν να μειώσουν χρονικά τη σταθερότητα των λυοφιλοποιημένων πρωτεϊνών προωθώντας αντιδράσεις χημικής αποικοδόμησης όπως η απομάκρυνση της αμινομάδας της ασπαραγίνης. Η ταχύτητα της αντίδρασης εξαρτάται από τη θερμοκρασία και αλλάζει σημαντικά όταν αυτή είναι μεγαλύτερη από την T_g του μίγματος.

Ένα ακόμα παράδειγμα της σταθεροποιητικής δράσης του PVP είναι η περίπτωση της ιμπουπροφένης⁶⁶. Χρησιμοποιώντας CO_2 , σε υπερκρίσιμη κατάσταση, αλληλεπιδρά με τις καρβονυλικές ομάδες του πολυμερούς και σταθεροποιείται.

Η καρβαμαζεπίνη είναι αντιεπιληπτικό φάρμακο με διάφορες κρυσταλλικές μορφές ποικίλης διαλυτότητας που οδηγούν σε ακανόνιστη ή καθυστερημένη απορρόφηση του δραστικού. Η χρήση του PVP στα σκευάσματα της καρβαμαζεπίνης και συγκεκριμένα η στερεή της διασπορά στο πολυμερές⁶⁷ προλαμβάνει την κρυστάλλωσή της. Η ιδιότητα αυτή του PVP οφείλεται σε δυο φαινόμενα: (1) αλληλεπιδράσεις, όπως δεσμοί υδρογόνου μεταξύ του φαρμάκου και του πολυμερούς και (2) τον εγκλωβισμό των μορίων του φαρμάκου στο πολυμερικό υπόστρωμα κατά την εξάτμιση του διαλύτη. Η εξάτμιση του διαλύτη, στην παρασκευή σκευασμάτων διασποράς, προκαλεί γρήγορη αύξηση του ιξώδους μειώνοντας έτσι την κινητικότητα του φαρμάκου και στο τέλος «παγώνουν» μέσα στο πολυμερές. Κρυσταλλικό πλέγμα δεν προλαβαίνει να σχηματιστεί και τα μόρια του φαρμάκου διατηρούν την τυχαία διάταξή τους. Φασματικές μελέτες FTIR απέδειξαν το σχηματισμό υδρογόνου μεταξύ της αμινομάδας της καρβαμαζεπίνης και της καρβονυλομάδας του PVP.

Η ινδομεθακίνη, που έχει ομοιότητες με την ιμπουπροφένη, σχηματίζει τον ίδιο δεσμό υδρογόνου με το PVP, που στην πραγματικότητα ανταγωνίζεται την ιδιότητα του μορίου να σχηματίζει διμερή.⁶⁸ Η στερεή διασπορά της ινδομεθακίνης σε PVP βελτίωσε σημαντικά τον ρυθμό διαλυτοποίησής της, σε διάφορα μέσα.⁶⁹ Ο ρυθμός διαλυτοποίησης έδειξε να εξαρτάται από το μοριακό βάρος του πολυμερούς,

με το PVP 90 να δίνει λίγο χαμηλότερο ρυθμό σε σχέση με τα συστήματα του PVP 17, πιθανώς λόγω του αυξημένου ιξώδους της επιφάνειας διάχυσης.

Μελέτη αλληλεπιδράσεων της ινδομεθακίνης και της νιφεδιπίνης σε μίγματα με PVP που παρασκευάστηκαν με τήξη (melt extrusion) απεκάλυψε σημαντικά στοιχεία για τη συμβολή του πολυμερούς στη σταθερότητα των φαρμακευτικών σκευασμάτων αλλά και την σπουδαιότητα του περιεχόμενου νερού. Ο δε ρυθμός διαλυτοποίησης του φαρμάκου στα σκευάσματα αυτά συγκρίθηκε με την κρυσταλλική μορφή του δραστικού συστατικού για να αποδειχθεί μεγαλύτερη παρουσία PVP.

Μετά από οκτώ εβδομάδες παραμονής των μιγμάτων σε 25 °C / 75 % RH, τα μίγματα της ινδομεθακίνης και της νιφεδιπίνης προσρόφησαν 3 ½ και 5 φορές την αρχική ποσότητα υγρασίας αντίστοιχα. Ως αποτέλεσμα η T_g , που αρχικά ήταν και για τις δυο περιπτώσεις μιγμάτων στους 78 °C περίπου, μειώθηκε σημαντικά, στο μισό για την ινδομεθακίνη και στο 1/3 για τη νιφεδιπίνη, δικαιολογώντας την επίδραση του νερού στην ταπείνωση της τιμής της T_g .

Η διαλυτοποίηση της πυροξικάμης, μικρής διαλυτότητας (αρκετά δραστικό φάρμακο), βελτιώνεται σημαντικά όταν βρίσκεται σε διασπορά σε PVP.⁷⁰ Από τα φασματοσκοπικά δεδομένα της ομάδας, η πυροξικάμη σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το PVP, δίχως όμως να είναι σίγουρο εάν συμμετέχει σε αυτόν η αμινομάδα ή η υδροξυλομάδα.

Αν και αναφέρεται συχνά η αποφυγή της κρυσταλλικής κατάστασης των φαρμακευτικών μορίων χάρη στην παρουσία PVP, δεν είναι γενική ιδιότητά του. Αντιθέτως αναφέρεται η διατήρηση της κρυσταλλικότητας της παρακεταμόλης παρόλη την προσθήκη PVP κατά τον σχηματισμό των κρυστάλλων της.⁷¹ Το προστιθέμενο PVP δεσμεύεται από τους αυξανόμενους σε μέγεθος κρυστάλλους του φαρμάκου και η τελική μορφή του προϊόντος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή ικανοποιητικής ποιότητας δισκίων. Η κρυσταλλικότητα της παρακεταμόλης επιβεβαιώθηκε με XPD (X-ray powder diffraction), αν και ο

σχηματισμός δεσμών υδρογόνου με το PVP είναι δεδομένος και η μόνη επίδραση που παρατηρήθηκε ήταν η αύξηση της διαλυτότητά της με το μοριακό βάρος του πολυμερούς.

Επίσης, ισχυρός δεσμός υδρογόνου δημιουργείται μεταξύ του PVP και της σουλφοναμιδικής ομάδας των διουρητικών θειαζιδίων (βενδροφλουμεθειαζίδη, υδροφλουμεθειαζίδη, υδροχλωροθειαζίδη) και προκαλεί μείωση στην T_g του συστήματος. Σημειώνεται πως στην περίπτωση της βενδροφλουμεθειαζίδης ήταν εμφανής και μια αλληλεπίδραση της φαινυλομάδας με τον δακτύλιο του PVP

Ο δεσμός υδρογόνου που μπορεί να σχηματίσει με κάποιο μόριο το PVP εξαρτάται επίσης, πέραν της παρουσίας της κατάλληλης ομάδας και από τη διαθεσιμότητά της. Ως παράδειγμα αναφέρεται η μελέτη των Mooter *et al.* για τα συστήματα διάχυσης του λοπεραμιδίου και δυο ακόμα μορίων συγγενούς μορφής.⁷²

Γ. ΦΩΤΟΧΗΜΙΚΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ

Γ.1. Εισαγωγή – Φωτεινή ενέργεια

Το φως είναι έντονο, είναι ζωογόνον, συμμετέχει στη φωτοσύνθεση, ουσιαστικά όμως είναι μια μορφή ενέργειας. Είναι η μορφή με την οποία η ενέργεια μεταφέρεται στο σύμπαν, ο τρόπος με τον οποίο η ενέργεια αυτή φθάνει στη γη. Το φως είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία και ένα μέρος του είναι το ορατό φως που γίνεται αντιληπτό από τα μάτια.

Το ηλιακό φως είναι μια συνεχής φασματική κατανομή με διαφορετικές εντάσεις και αποδίδει το σύνολο, ποιοτικά και ποσοτικά, της ενέργειας που μεταφέρει. Σύμφωνα με ένα τρόπο περιγραφής του φωτός, η ενέργεια αυτή μεταφέρεται από τα φωτόνια και είναι διαφορετική για φωτόνια του ορατού και του υπεριώδους. Η ενέργεια του κάθε φωτονίου χαρακτηρίζεται από τη συχνότητα και περιγράφεται από μια κυματοσυνάρτηση. Σε κάθε περίπτωση και όπως ισχύει για κάθε μορφή ενέργειας, το φως δεν χάνεται είτε σκεδάζεται είτε απορροφάται και αλλάζει μορφή.

Από τη φωτεινή ακτινοβολία, οι ακτίνες γ, που δύνανται να προκαλέσουν σημαντικές καταστροφές σε μοριακό επίπεδο, μέχρι και μέρος του υπεριώδους φωτός (όλη η ακτινοβολία UVC: 100-279 nm και η περισσότερη της UVB: 280-314 nm), απορροφούνται από την ανώτερη ατμόσφαιρα και δε φθάνουν στην επιφάνεια της γης. Το ίδιο συμβαίνει με την υπέρυθη ακτινοβολία που έχει κυρίως θερμαντικά αποτελέσματα και μέρος της απορροφάται από τα αέρια της ατμόσφαιρας.

Η ενέργεια του ορατού φωτός μετατρέπεται συνήθως σε δονητική ενέργεια που είναι ικανή να προκαλέσει σχάση χημικού δεσμού ενώ το μέρος του υπεριώδους φωτός που φθάνει στη γη δεν φιλτράρεται (UVA: 315-399 nm) και είναι υπεύθυνο για τις περισσότερες φωτοχημικές αλλοιώσεις. Η υπεριώδης ακτινοβολία⁷³ έχει μικρότερο μήκος κύματος και μεγαλύτερη ενέργεια από το ορατό φως και ακόμα και το τμήμα της που φθάνει στη γη, επηρεάζει σημαντικά το ανθρώπινο σώμα και

μπορεί να προκαλέσει καρκίνο του δέρματος, καταρράκτη, εξασθένηση του ανοσοποιητικού συστήματος, πρόωρη γήρανση του δέρματος⁷⁴.

Η φωτοαποικοδόμηση μπορεί να οριστεί ως η αποικοδόμηση που υφίσταται ένα υλικό, μια ουσία, ως αποτέλεσμα της εκπεμπόμενης ενέργειας που λαμβάνει. Κατά την IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) φωτοαποικοδόμηση είναι η φωτοχημική μετατροπή ενός μορίου σε θραύσματα μικρότερου μοριακού βάρους, συνήθως μέσω μηχανισμού οξειδωσις, και ο ορισμός αυτός χρησιμοποιείται στην καταστροφή ρύπων μέσω UV ακτινοβολίας.

Η μελέτη και παρακολούθηση της φωτοχημικής αποικοδόμησης είναι ένα μέρος της παγκόσμιας έρευνας για αρκετά χρόνια, με βασικό στόχο τη γνώση που θα βοηθήσει την ασφάλεια στα σκευάσματα που περιβάλλουν, χρησιμοποιούνται, καταναλώνονται από τον άνθρωπο. Η φωτοχημική αποικοδόμηση του αμύλου μελετήθηκε για πρώτη φορά το 1948⁷⁵ ενώ αρκετά χρόνια μας χωρίζουν από τις πρώτες μελέτες του μηχανισμού και της φύσης των προϊόντων διάσπασης της ριβοφλαβίνης⁷⁶ και άλλων φλαβινών⁷⁷. Οι αρχικές μελέτες αφορούσαν ουσίες με χρωμοφόρες περιοχές όπου οι μεταβολές⁷⁸ να παρατηρούνται πιο εύκολα και σήμερα φθάνουν να συγκρίνουν τους μηχανισμούς χημικής και φωτοχημικής⁷⁹ αποικοδόμησης.

Πρέπει να σημειωθεί πως το φως δεν δρα σε όλες τις περιπτώσεις καταστρεπτικά αλλά μπορεί να προκαλέσει αναστρέψιμες μεταβολές στη δομή μιας ουσίας. Η ιδιότητα αυτή μελετάται αρκετά με στόχο την αυτοματοποίηση και οργάνωση συστημάτων, ακόμα και *in vivo*, που να μεταβάλλονται με την επίδραση φωτός (φωτοδιακόπτες)^{80,81}.

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η φωτοχημική αποικοδόμηση ουσιών που είτε ως ρύποι είτε ως φυσικά προϊόντα βρίσκονται στη φύση και από την αποικοδόμησή τους επηρεάζεται άμεσα ή έμμεσα η άνθρωπος. Κάποιες από τις μελέτες αφορούν ενεργοποίηση πιθανών μηχανισμών φωτοτοξικότητας⁸² άλλες αφορούν ουσίες και υπολείμματα που επιβαρύνουν τον υδροφόρο ορίζοντα και μπορούν ή πρέπει να απομακρυνθούν.^{83,84}

Γ.2. Σκευάσματα –Φαρμακευτικές ουσίες και φωτοδιασπάσεις ^{85,86}

Ένα φαρμακευτικό συστατικό ή σκεύασμα μπορεί να εκτεθούν σε φυσικό ή τεχνητό φως κατά τη διάρκεια της παραγωγή, της αποθήκευσης, της χορήγησης ή της χρήσης. Η φωτεινή ακτινοβολία μπορεί να ενεργοποιήσει μηχανισμούς αντιδράσεων που να επηρεάσουν την ποιότητα του σκευάσματος και την ασφάλεια στη χορήγησή του.

Η πιο προφανής επίδραση της ακτινοβολίας σε ένα σκεύασμα κατά τη φύλαξή του είναι η μείωση της δραστηριότητας και του θεραπευτικού αποτελέσματος, ακόμα και αν τα προϊόντα που σχηματίζονται δεν παρουσιάζουν τοξικότητα. Η αλλοίωση κάποιου από τα υπόλοιπα συστατικά του σκευάσματος μπορεί να επηρεάσει την οργανοληπτική σταθερότητα του σκευάσματος ή είναι πιθανό να λειτουργήσει ως φωτοευαισθητοποιητής για το δραστικό συστατικό.

Στα παρεντερικά σκευάσματα, οι αντιδράσεις σε διαλύματα διαφέρουν από τις αντιδράσεις σε στερεά σκευάσματα διότι η επίδραση του φωτός είναι επιφανειακή. Παράμετροι όπως η κρυσταλλικότητα και η επιφάνεια των κρυστάλλων, η κινητικότητα των μορίων επηρεάζουν τη σταθερότητα του σκευάσματος. Στα σκευάσματα αυτά ενδείκνυται η χρήση εκδόχων που είτε αποδιεγείρουν με ασφάλεια τα διεγερμένα μόρια του δραστικού συστατικού είτε αντιδρούν με τις σχηματιζόμενες ελεύθερες ρίζες προστατεύοντας το δραστικό συστατικό από αυτές. Μια σύγχρονη τάση που αφορά στις συνθήκες νοσηλείας είναι η αξιοποίηση του φυσικού ηλιακού φωτός στην αρχιτεκτονική των νοσοκομειακών χώρων και μια άλλη αφορά στην κατ'οίκον νοσηλεία. Οι δυο αυτές συνθήκες αυξάνουν τις πιθανότητες έκθεσης των χορηγούμενων σκευασμάτων σε ηλιακό φως.

Στις παραμέτρους που επηρεάζουν τη φωτοσταθερότητα ενός σκευάσματος θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται και ο πρωτογενής περιέκτης.⁸⁷

Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις σκευασμάτων που για να ενεργοποιηθεί η δράση τους είναι απαραίτητη η φωτεινή ακτινοβολία (αντιμετώπιση ψωρίασης και μορφές καρκίνου).

Γ.3. Παράμετροι Φωτοχημικής Αποικοδόμησης

Η πορεία μιας φωτοχημικής αποικοδόμησης ξεκινά με το δείγμα και την υπό μελέτη ουσία να εκτίθενται σε φωτεινή ακτινοβολία. Κάποια από τα μόρια της ουσίας απορροφούν φωτόνια κατάλληλης ενέργειας και μεταβαίνουν σε διεγερμένη κατάσταση. Η διεγερμένη κατάσταση έχει κάποιο χρόνο ζωής αλλά δεν είναι σταθερή και τα διεγερμένα μόρια έχουν συγκεκριμένες δυνατότητες. Κάποια από αυτά αποδιεγείρονται στην αρχική κατάσταση από την χαμηλότερη ενεργειακά διεγερμένη κατάσταση αποβάλλοντας ενέργεια, φαινόμενο γνωστό ως φθορισμός. Ένα μέρος των διεγερμένων μορίων υφίσταται διασυστημική μετάβαση σε άλλη διεγερμένη αλλά χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση και η αποδιέγερση είναι γνωστή ως φωσφορισμός. Ένα μέρος των διεγερμένων μορίων δεν αποδιεγείρεται αλλά ακολουθεί κάποιον άλλο μηχανισμό που αλλάζει τη μοριακή δομή και αυτή είναι η πορεία της φωτοχημικής αποικοδόμησης.

Η απόδοση της φωτοχημικής αποικοδόμησης εκφράζεται ως ο λόγος των μορίων που αποικοδομούνται ως προς τον αριθμό των φωτονίων που έχουν απορροφηθεί. Η μέτρηση των φωτονίων είναι έμμεση και ισούται με τον αριθμό των μορίων που βρίσκονται στη διεγερμένη κατάσταση. Ως φυσικοχημικό φαινόμενο, ο λόγος αυτός εξαρτάται από την πυκνότητα και τη ροή των απορροφούμενων φωτονίων, την ένταση της πηγής, την FRET (Förster-resonance-energy transfer) μεταφορά ενέργειας μεταξύ διπόλων, την απόδοση της απορρόφησης και το φάσμα των διεγερμένων μορίων.

Η κατανομή των φωτονίων εξαρτάται από την πηγή του φωτός. Η ενέργεια που εκπέμπει το ηλιακό φως δεν είναι σταθερή και μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ημέρας, όσο αλλάζει η θέση του ήλιου ως προς την γη. Σημαντικές διαφοροποιήσεις στο ηλιακό φάσμα καταγράφονται σε διαφορετικές περιοχές του πλανήτη, αναλόγως την απόσταση από τον ισημερινό και αναλόγως το υψόμετρο. Η

χρήση τεχνητών πηγών εξασφαλίζει σταθερότερη κατανομή εκπεμπόμενων φωτονίων, η κάθε όμως πηγή μπορεί να έχει τη δική της φασματική κατανομή. Είναι σημαντική η γνώση της κατανομής του φάσματος της πηγής και η σταθερότητά της. Η σύγχρονη τάση είναι να χρησιμοποιούνται λυχνίες αλογόνων που προσομοιάζουν το ηλιακό φως και συγκεκριμένα λυχνία τόξου αερίου Ξένου.

Η ροή και η διεισδυτικότητα των φωτονίων, σε σταθερής συμπεριφοράς πηγή φωτός, επηρεάζονται από την επιφάνεια και τη φύση του δείγματος, αντίστοιχα. Μεγαλύτερη επιφάνεια αντιστοιχεί σε ροή μεγαλύτερου αριθμού φωτονίων ενώ δείγμα υψηλής πυκνότητας, όπως είναι τα στερεά, περιορίζει την διεισδυτικότητα των φωτονίων.

Στην περίπτωση των διαλυμάτων, το φάσμα των διεγερμένων μορίων αντιστοιχεί στο φάσμα απορρόφησης της ουσίας αλλά όσο η συγκέντρωση αυξάνει η κατανομή των διεγερμένων μορίων αλλάζει. Η παρουσία περισσότερων ή άλλων μορίων στο δείγμα επηρεάζει την απορρόφηση και αυτό καλείται ως φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου (inner filter effect).

Τα διαλύματα υψηλών συγκεντρώσεων αρχίζουν να προσομοιάζουν τη συμπεριφορά των στερεών, μειώνοντας τη διαπερατότητα της ακτινοβολίας (αρχή απείρου πάχους, infinite thickness law).

Γενικότερα, η παρουσία άλλων μορίων επηρεάζει την φωτοχημική αποικοδόμηση είτε άμεσα είτε έμμεσα. Η πιο συνήθης σκέψη αφορά στην παρεμπόδιση της απορρόφησης των φωτονίων ακόμα και ανταγωνιστικά, όμως η παρουσία άλλων μορίων μπορεί να λειτουργήσει και ευνοϊκά για την φωτοαποικοδόμηση. Υπάρχουν οι ουσίες που δρουν ως φωτοευαισθητοποιητές⁸⁸, που απορροφούν ενέργεια και κατά την αποδιέγερσή τους την μεταφέρουν στα μόρια της ουσίας. Υπάρχουν όμως και ουσίες που μεταβάλλοντας το περιβάλλον του κύριου δραστικού, να επηρεάζουν την απορροφητικότητά του σε φωτόνια, όπως μπορεί να είναι η παρουσία ιόντων, αλάτων⁸³, το pH του διαλύματος καθώς και ο ίδιος ο διαλύτης, και να επηρεάζουν τη φωτοαποικοδόμησή του. Σε κάποιες από τις

περιπτώσεις της παρουσίας άλλων μορίων και με τον κατάλληλο σχεδιασμό πειραμάτων, η επίδραση του εσωτερικού φίλτρου μπορεί να μετρηθεί ⁸⁹.

Γ.4. Φωτοπροστασία φαρμάκων ^{90,91}

Το δραστικό συστατικό υφίσταται ακτινοβολία και παρακολουθείται ο πιθανός μηχανισμός φωτοχημικής αποικοδόμησής του. Τα προϊόντα του μηχανισμού αυτού χρησιμοποιούνται μαζί με τα πιθανά προϊόντα οξείδωσης, υδρόλυσης και θερμικής αποικοδόμησης για την τεκμηρίωση της καταλληλότητας της αναλυτικής μεθόδου που θα παρακολουθεί τη σταθερότητα του τελικού σκευάσματος. Για το φαρμακευτικό σκεύασμα και όταν το δραστικό συστατικό έχει αποδειχθεί ευπαθές στην φωτεινή ακτινοβολία, θα πρέπει να προφυλάσσεται κατά την παραγωγική διαδικασία, και θα πρέπει να πραγματοποιηθούν έλεγχοι σε όλα τα στάδια της συσκευασίας του, δίχως και με τον πρωτογενή περιέκτη καθώς και με τον τελικό περιέκτη. Ο έλεγχος θα πρέπει να διαρκέσει όσο χρειάζεται για να τεκμηριωθεί η ασφαλής συσκευασία του σκευάσματος.

Στα παραπάνω πειράματα είναι σημαντική η τεκμηρίωση του χρόνου έκθεσης των δειγμάτων, η παρακολούθηση πιθανών αντιδράσεων που οφείλονται στη θερμοκρασία ή σε κάποιο παραπροϊόν που δρα καταλυτικά και συνεχίζονται παράλληλα την παύση της επίδρασης του φωτός, καθώς και η αντιπροσωπευτική παρασκευή των δειγμάτων για ανάλυση.

Γ.5. Ακτινομετρικό σύστημα – Διυδρική υδροχλωρική κινίνη

Η τεκμηρίωση της προσφερόμενης ενέργειας πραγματοποιείται, σύμφωνα με τις διεθνείς προδιαγραφές, με τη χρήση ενός ακτινομετρικού συστήματος. Ως χημικό ακτινομετρικό σύστημα περιγράφεται ένα χημικό σύστημα γνωστής απόδοσης, επαναλήψιμης φωτοχημικής συμπεριφοράς. Ένα παράδειγμα είναι το Οξαλικό Ουρανίλιο⁹² αλλά το προτεινόμενο διεθνώς σύστημα είναι αυτό της διυδρικής υδροχλωρικής κινίνης ⁹⁰.

Το σύστημα της διωδικής υδρογλωρικής κινίνης έχει μελετηθεί αρκετά και είναι γνωστή πλέον η σπουδαιότητα της συγκέντρωσης⁹³, της θερμοκρασίας και του χρόνου αποθήκευσης⁹⁴ στην παρακολούθηση μιας φωτοχημικής αποικοδόμησης. Παραμένει, παρόλα αυτά, ένα αρκετά εύχρηστο ακτινομετρικό σύστημα και αυτό οφείλεται στην απλή αναλυτική μέθοδο παρακολούθησης της ακτινοβολίας.

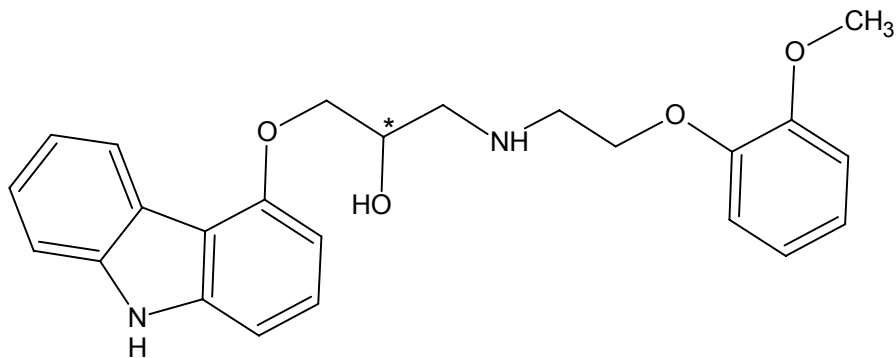
Έχει παρατηρηθεί πως οι θάλαμοι των συσκευών ή των οργάνων που χρησιμοποιούνται για τις μελέτες αυτές, δεν παρουσιάζουν την αναμενόμενη επιφανειακή ομοιομορφία⁹⁵ στην ακτινοβολούμενη ενέργεια και είναι σημαντικό να ελέγχονται πριν τη χρήση τους.

Δ. ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΩΝΤΑΙ

Δ.1. Καρβεδιλόλη

Δ.1.1. Καρβεδιλόλη: Δομή και φαρμακολογική δράση⁹⁶

Η καρβεδιλόλη είναι φαρμακευτική ουσία, με ένα χειρόμορφο κέντρο όπως φαίνεται στο σχήμα Δ.1.1.



Σχήμα Δ.1.1. Χημική δομή καρβεδιλόλης με επισήμανση στο ασύμμετρο άτομο άνθρακα.

Η καρβεδιλόλη, όπως αναμένεται μελετώντας τη δομή της, είναι α-αδρενεργικός αναστολέας, διότι διαθέτει μια κυκλική ομάδα (μεθοξυφαινόλη) και πλευρική αμινομάδα. Επειδή ο υποκαταστάτης, όμως, της αμινομάδας έχει κάποιο μέγεθος, η ανασταλτική δράση στους α-υποδοχείς δεν είναι έντονη με υποκαταστάτη μικρότερου μεγέθους. Ενώ και τα δυο επιμερή της καρβεδιλόλης δρουν ως α-αναστολείς, μόνο η S-καρβεδιλόλη έχει β-ανασταλτική δράση και μάλιστα μη εκλεκτική. Έτσι, η R-καρβεδιλόλη εμφανίζει περισσότερο αύξηση του συμπαθητικού τόνου, αποτέλεσμα της δράσης της στους α-υποδοχείς⁹⁷.

Η καρβαζολική ομάδα του μορίου, παρουσιάζει αντιοξειδωτικές ιδιότητες, οι οποίες αυξάνονται σημαντικά με την υδροξυλίωσή τους, καθιστώντας την καρβεδιλόλη αλλά και τα προϊόντα μεταβολισμού της πολύτιμα^{98,99}.

Δ.1.2. Δομή καρβεδιλόλης στο χώρο

Η αποκάλυψη των συνηθέστερων δομών της καρβεδιλόλης στον χώρο θα βοηθήσει στην εξαγωγή των μοριακών βάσεων των μηχανισμών δράσης της. Η σημερινή επιστημονική γνώση και τα δυνατά υπολογιστικά συστήματα επιτρέπουν την εκτίμηση των πιθανών δομών της καρβεδιλόλης στον χώρο. Οι πιο σταθερές μορφές για πρωτονιωμένη και μη μορφή, είναι το αποτέλεσμα της μελέτης των *Almeida et al.*¹⁰⁰.

Οι περισσότερες δομές ελάχιστης ενέργειας που προέκυψαν για την πρωτονιωμένη καρβεδιλόλη, με μαθηματικά μοντέλα, έχουν τετρακεντρική, σπειροειδή δομή. Η δομή αυτή βασίζεται στην πρωτονιωμένη κατάσταση του αλειφατικού αζώτου και περιλαμβάνει έναν εξαμελή δακτύλιο, που κλείνει με δεσμό υδρογόνου με το καρβαζολικό υδρογόνο, και έναν οκταμελή δακτύλιο, με το οξυγόνο της μεθοξυφαινολομάδας.

Οι δομές με τη χαμηλότερη ενέργεια, βέλτιστες καταστάσεις για την καρβεδιλόλη, σε αέρια κατάσταση και σε νερό, δίνονται στην εργασία των *Almeida et al.* με τίτλο «Resolution of Carvedilol's Conformational Surface via Gas and Solvent Phase Density Functional Theory Optimizations and NMR Spectroscopy» και περιλαμβάνουν δεσμούς υδρογόνου της πρωτονιωμένης αλειφατικής αμινομάδας.

Δ.1.3. Καρβεδιλόλη: Μεταβολισμός¹⁰¹

Ο μεταβολισμός της καρβεδιλόλης έχει μελετηθεί σε επίμυς, σκύλους και ποντίκια, πριν τις μελέτες στον ανθρώπινο οργανισμό και έχουν συνολικά καταγραφεί 29 μεταβολίτες.

Η δια στόματος χορηγούμενη καρβεδιλόλη απορροφάται αρκετά γρήγορα και στη συνέχεια υφίσταται εκτεταμένο μεταβολισμό στο ήπαρ, πρώτης και δεύτερης διόδου, που αφορά οξείδωση και σύζευξη αντίστοιχα. Η ρακεμική καρβεδιλόλη, εμφανίζει επίδραση πρώτης διόδου (first pass effect) και μάλιστα με στερεοεκλεκτικότητα για την S(-) εναντιομερή μορφή (επίπεδα R(+)) στο πλάσμα περίπου τριπλάσια της S(-))¹⁰². Οι *Oldham & Clarke* αναφέρουν ότι ο μεταβολισμός της S(-)-καρβεδιλόλης πραγματοποιείται ταχύτερα από την R(+) εναντιομερή μορφή της παρόλο που σε αυτόν συμμετέχουν τα ίδια ένζυμα του P450. Ο κύριος μεταβολισμός πραγματοποιείται στο ήπαρ με λιγότερο από το 2 % της δόσης να αποβάλλεται από τους νεφρούς, ως ανέπαφη καρβεδιλόλη ¹⁰³.

Κατά τη μελέτη του μεταβολισμού της καρβεδιλόλης στον άνθρωπο, από τους *Neugebauer & Neubert*¹⁰⁴ φάνηκε πως η έντονα λιποφιλική ουσία μετατρέπεται σε πολικά και κυρίως υδατοδιαλυτά συστατικά. Οι κύριοι μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν σε πλάσμα και ούρα ήταν η ανέπαφη (αμετάβλητη, unchanged) καρβεδιλόλη και το γλυκουρονίδιο της. Ο μεταβολίτης M2 είναι προϊόν Ο-απομεθυλίωσης (Ο-απαλκυλίωση), μεταβολίτης με β-ανασταλτική δράση και με κάποια αγγειοχαλαρωτική δράση (vasorelaxing activity). Είναι, όμως, απίθανη η συνεισφορά του στη φαρμακολογική δράση του φαρμάκου, διότι βρέθηκε σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση στο πλάσμα όπως και στα ούρα. Ο M3 είναι το γλυκουρονίδιο του M2, και βρίσκεται σε πλάσμα και ούρα σε μεγαλύτερη συγκέντρωση του M2. Οι πέντε μεταβολίτες προϊόντα οξειδωτικής σχάσης (oxidative cleavage) της αλειφατικής αλυσίδας του β-αναστολέα, μαζί με τα γλυκουρονίδια των δυο προηγούμενων μεταβολιτών βρέθηκαν σε σημαντικές συγκεντρώσεις στα ούρα. Τα προϊόντα υδροξυλίωσης της καρβεδιλόλης είναι οι δυο, που μαζί με τα προϊόντα θεικής σύζευξής τους βρέθηκαν και αυτοί στα ούρα. Τα προϊόντα υδροξυλίωσης και ο M2 (*Gehr et al.*¹⁰⁵), που ανιχνεύονται στο πλάσμα δεν ξεπερνούν το 10 % της συγκέντρωσης της καρβεδιλόλης. Οι δυο μεταβολίτες από αυτούς παρουσιάζουν β-ανασταλτική δράση 13 και 2,5 φορές μεγαλύτερη από την καρβεδιλόλη και δεδομένης της συγκέντρωσής τους στο πλάσμα, μόνο ο ένας μπορεί να συνεισφέρει στη συνολική δράση της καρβεδιλόλης, ενώ κανένας από τους τρεις δεν έχει αγγειοχαλαρωτικές ιδιότητες.

Η Ο-απομεθυλίωση της καρβεδιλόλης προς το M2 είναι αποτέλεσμα κυρίως της δράσης του ενζύμου CYP2C9 αλλά και του CYP2D6.

Η σύζευξη του μορίου της καρβεδιλόλης με γλυκουρονικό οξύ, στον ανθρώπινο οργανισμό, γίνεται από τα μικροσωμικά ένζυμα του ήπατος. Για τους β-αναστολείς μετοπρολόλη, βουφουραλόλη και προπρανολόλη, με εξαίρεση την τελευταία, δεν είναι γνωστές ποιές ισομορφές της ανθρώπινης UDP-γλυκουρονικής τρανσφεράσης συμμετέχουν στον σχηματισμό των γλυκουρονιδίων τους¹⁰³. Η καρβεδιλόλη έχει τρία πιθανά κέντρα σχηματισμού γλυκουρονιδίων, το αλειφατικό δευτεροταγές υδροξύλιο στο χειρόμορφο κέντρο, την αλειφατική δευτεροταγή αμινομάδα και το άζωτο στην καρβαζολική ομάδα. Στην *in vitro* μελέτη των *Ohno et al.* καταγράφεται ο σχηματισμός δυο γλυκουρονιδίων της καρβεδιλόλης, με τουλάχιστον τρεις ισομορφές της UDP να συμμετέχουν σε αυτόν, τις UGT1A1, UGT2B4 και UGT2B7, χωρίς να είναι σαφής η σχετική συνεισφορά του καθενός αφού εξαρτάται και από την εκφραστικότητα του στο ήπαρ. Η UGT1A1 συμμετέχει στον σχηματισμό του γλυκουρονιδίου της βιλιρουβίνης (bilirubin) και άλλων θεραπευτικών φαρμάκων, η UGT2B4 του χολικού και δεοξυχολικού οξέος, ενώ η UGT2B7 καταλύει τον σχηματισμό των γλυκουρονιδίων των οπιοειδών, όπως της μορφίνης και την ναλοξόνης. Αν και έχει παρατηρηθεί γενετικός πολυμορφισμός που επηρεάζει την ενζυματική δραστηριότητα, το ένα γλυκουρονίδιο της καρβεδιλόλης αποτελεί προϊόν δράσης των UGT2B4 και UGT2B7, ο σχηματισμός του άλλου καταλύεται από τα UGT2B4 και UGT1A1.

Δ.1.4. Δράση^{106,107}

Η καρβεδιλόλη είναι καρδιαγγειακό φάρμακο με πολλές θεραπευτικές δυνατότητες, το οποίο χορηγείται σε έντονη υπέρταση, χρόνια στηθάγχη και χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια. Δρα ως αντιοξειδωτικό σε ενεργά κέντρα οξυγόνου, μη εκλεκτικά σε όλους τους β-αδρενεργικούς υποδοχείς, εκλεκτικά στους α₁-υποδοχείς και σε κανάλια ιόντων (K⁺ και Ca²⁺).

Τα γνωστά αιμοδυναμικά οφέλη της καρβεδιλόλης οφείλονται στον συνδυασμό της αναστολής των αδρενεργών υποδοχέων, που προκαλεί τη μείωση της

καρδιακής καταπόνησης, και της περιφερειακής αγγειοδιαστολής (peripheral vasodilation), των αντιοξειδωτικών δυνατοτήτων της, της βελτίωσης του μεταβολισμού γλυκόζης / λιπιδίων στη ρύθμιση των νευροορμονολογικών και ηλεκτροφυσικών παραμέτρων της καρδιάς, προσφέροντας σημαντική αντισχαιμική δράση, προστασία έναντι της υπέρτασης και των αρρυθμιών. Πέραν της μείωσης των ποσοστών νοσηλείας και θνησιμότητας, στα οφέλη της καρβεδιλόλης στην καρδιακή ανεπάρκεια περιλαμβάνεται η θεαματική βελτίωση της λειτουργίας και δομής (όγκος/μάζα και σχήμα) της αριστερής κοιλίας και σε άλλες παραμέτρους καρδιακής αναδόμησης.

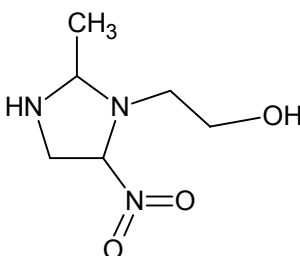
Πιο ειδικά για τη δράση της καρβεδιλόλης ισχύουν τα παρακάτω:

- Αντιαρρυθμική δράση: Αναστέλλει τα HERG κανάλια του K^+ (Ether-a-go-go K^+ channels) που παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση των καρδιακών αρρυθμιών και στην αιφνίδια καρδιακή ανακοπή.
- Λόγω της α_1 -αδρενεργικής ανασταλτικής δράσης της (υποδοχείς με σημαντική παρουσία στις αρτηρίες και στο συκώτι), η καρβεδιλόλη μπορεί να έχει προστατευτικό ρόλο στην αρτηριοσκλήρυνση πέραν της καρδιακής προστασίας.
- Σταθερότητα και αποτελεσματικότητα και ανεκτικότητα της καρβεδιλόλης σε ασθενείς και με πολλές ενδείξεις για τη βελτιστοποίηση των συμπτωμάτων και της λειτουργίας της αριστερής κοιλίας, αλλά και για τη μείωση των νοσοκομειακών εισαγωγών μαζί με σχετικά χαμηλά επίπεδα θνησιμότητας.

Δ.2. Μετρονιδαζόλη¹⁰⁸

Δ.2.1. Μετρονιδαζόλη: Δομή και φαρμακολογική δράση

Η μετρονιδαζόλη είναι νιτροϊμιδαζόλη με αντιβακτηριακή δράση που περιλαμβάνει διάφορα πρωτόζωα και κυρίως Gram-αρνητικά και Gram-θετικά αναερόβια βακτήρια.



Σχήμα Δ.2.1. Χημική δομή της μετρονιδαζόλης, [1-(2-υδροξυαιθυλ)-2-μεθυλ-5-νιτροϊμιδαζόλη].

Η μετρονιδαζόλη ανακαλύφθηκε το 1950 και χρησιμοποιείται για τη θεραπευτική της δράση περισσότερα από 30 χρόνια. Η αρχική της ένδειξη ήταν για την αντιμετώπιση της *Trichomonas vaginalis*, με τα χρόνια όμως έχει διαγνωσθεί ως αποτελεσματική στην αντιμετώπιση λοιμώξεων από πλήθος οργανισμών.

Από διάφορες μελέτες φαίνεται πως ο μηχανισμός δράσης της μετρονιδαζόλης περιλαμβάνει 4 στάδια: (1) είσοδο στο βακτηριακό κύτταρο, (2) αναγωγή της νιτροομάδας, (3) κυτταροτοξική δράση του αναγωγικού προϊόντος, (4) απελευθέρωση των τελικών προϊόντων που είναι αδρανή. Είναι ο σχηματισμός του ενδιάμεσου προϊόντος στον οποίον θεωρείται πως οφείλεται η αποτελεσματικότητα της μετρονιδαζόλης. Πιθανοί στόχοι του ενδιάμεσου προϊόντος είναι το RNA, DNA ή κάποιες από τις πρωτεΐνες του οργανισμού, που προκαλούν τη θανάτωσή του.

Δ.2.2. Μετρονιδαζόλη: Μεταβολισμός-Φαρμακοκινητική

Η φαρμακοκινητική της μετρονιδαζόλης έχει μελετηθεί αρκετά για κάθε χορηγούμενη μορφή.

Η απορρόφηση της μετρονιδαζόλης μετά από χορήγηση μέσω της στοματικής οδού είναι πολύ καλή, με τη βιοδιαθεσιμότητα να φθάνει το 90 % και για δόση 500 mg οι μέγιστες τιμές να επιτυγχάνονται μέσα σε 4 ώρες. Στην περίπτωση της ορθικής εναπόθεσης οι μέγιστες τιμές ποικίλουν στο 60-80 % και αναλόγως τη μορφή του σκευάσματος μπορούν να επιτευχθούν από 1 έως 8 ώρες. Στην περίπτωση της ενδοκολπικής εναπόθεσης η απορρόφηση είναι ακόμα πιο αργή και οι μέγιστες συγκεντρώσεις στο πλάσμα δεν φθάνουν τους άλλους δυο τρόπους χορήγησης. Σε περιπτώσεις εφαρμογής στην επιδερμίδα γέλης μετρονιδαζόλης στην επιδερμίδα η απορρόφηση είναι τόσο μικρή που μπορεί και να μην είναι ανιχνεύσιμη στο πλάσμα για 24 ώρες.

Η μετρονιδαζόλη μεταβολίζεται στο ήπαρ δίνοντας πέντε μεταβολίτες. Από τους δυο κύριους μεταβολίτες, ο όξινος μεταβολίτης δεν θεωρείται δραστικός (μέχρι 5 % της δράση του μητρικού μορίου). Ο δεύτερος, υδροξυμεταβολίτης είναι πολύ σημαντικός καθότι εμφανίζει την ίδια αντιμικροβιακή δράση με τη μετρονιδαζόλη αλλά σε λίγο μικρότερη έκταση.

Δ.2.3. Μετρονιδαζόλη: Δράση

Αναφέρεται ενδεικτικά η χρήση της στην αντιμετώπιση τριχομονάδων (*Trichomonas vaginalis*) και σε συνδυασμό με άλλα δραστικά μόρια σε κολπικές πολυμικροβιακές λοιμώξεις (πχ. *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides* spp), συνδυαστικά στο ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού καθώς και στην αντιμετώπιση της νόσου του Crohn.

Δ.2.4. Μετρονιδαζόλη: Άλλες αναφορές

Η μελέτη της μετρονιδαζόλης δεν περιορίζεται στη δράση της αλλά επεκτείνεται τόσο σε μελέτες νέων σκευασμάτων με προφάρμακα για εξειδικευμένη εναπόθεσή της¹⁰⁹ όσο και σε μελέτες αλληλεπιδράσεων¹¹⁰ και σταθερότητας νέων σκευασμάτων¹¹¹. Επίσης, μελετάται η παρασκευή παραγώγων με θειαζόλες ως αντιβακτηριδιακοί παράγοντες.¹¹²

Όπως τα περισσότερα φαρμακευτικά μόρια μελετώνται σε σχέση με το περιβάλλον, έτσι και στη μετρονιδαζόλη μελετώνται πιθανές τεχνικές απομάκρυνσης

της από τον υδροφόρο ορίζοντα¹¹³. Μια λιγότερο αναμενόμενη μελέτη της μετρονιδαζόλης αφορά στην χρήση της για προστασία ατσάλινων εξαρτημάτων που λειτουργούν σε όξινο περιβάλλον¹¹⁴.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ
ΜΕΡΟΣ

Ε. ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΟΣ ΚΑΡΒΕΔΙΛΟΛΗΣ

Ε.1. Εισαγωγή

Κάθε φαρμακευτικό σκεύασμα στο οποίο χορηγείται άδεια κυκλοφορίας στην αγορά, στο πλαίσιο του ελέγχου ποιότητας, έχει υποστεί έλεγχο χημικής σταθερότητας καθ'όλη τη διάρκεια του χρόνου ζωής του. Παρακολουθείται η σταθερότητα του δραστικού συστατικού και ελέγχονται τα προϊόντα διάσπασής του, ώστε να μην ξεπερνούν κάποια όρια ασφαλείας. Τα όρια αυτά εξαρτώνται από τη μέγιστη χορηγούμενη ημερήσια δόση του. Σύμφωνα με τις οδηγίες που προτείνονται διεθνώς για την παρακολούθηση και τεκμηρίωση της ποιότητας των φαρμάκων (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH), εάν παρατηρηθεί η εμφάνιση κάποιου προϊόντος διάσπασης σε σημαντικό ποσοστό, τότε καταγράφεται και παρακολουθείται, ενώ εάν ξεπερνά τα όρια ασφαλείας, τότε πρέπει να ταυτοποιηθεί και να ελεγχθεί η τοξικότητά του.

Ε.1.1. Χρησιμοποιούμενα μέσα

Αντιδραστήρια

Χρησιμοποιήθηκαν καρβεδιλόλη και προσμίξεις της προσφορά της ELPEN Pharm. Co., πολυ-βινυλοπυρρολιδόνη (PVP) K25 από τις BASF και ISP, υπερκάθαρο νερό από συσκευή Purelab Plus, μεθανόλη και ακετονιτρίλιο χρωματογραφικής καθαρότητας της LabScan, φωσφορικά άλατα της Carlo Erba, οξικός αιθυλεστέρας, διαιθυλεστέρας και μυρμικικό οξύ της Merck, δευτεριωμένοι διαλύτες (D₂O, DMSO-*d*₆, CDCl₃) της Aldrich.

Συσκευές

- Rotary Buchi
- Συσκευή λυοφιλοποίησης AI5 στα 0,5 mbar

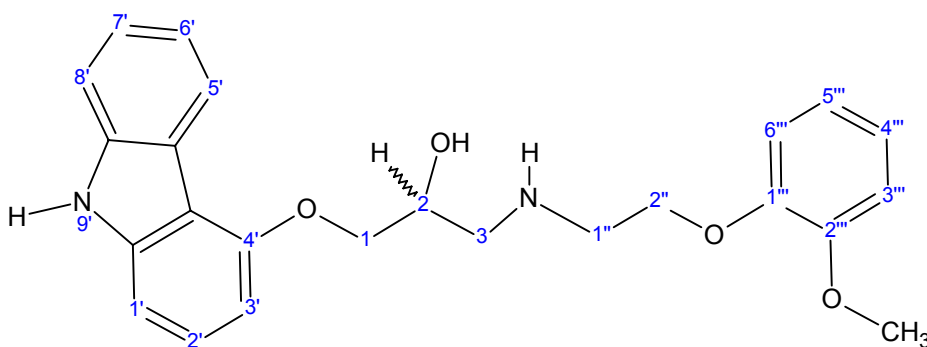
- Συσκευή υπερκαθάρου νερού Purelab Scan Plus
- Περιστροφικός αναδευτήρας πολλαπλών θέσεων της H+P Lab
- pH-meter model 350 της ORION
- HPLC-Alliance 2690 και ανιχνευτής PDA996 της Waters
- Αντλία 501 και ανιχνευτής LC481 της Waters για την ημιπαρασκευαστική χρωματογραφία
- Σύστημα LC-MS: ισοκρατική αντλία Spectraseries P100 της ThermoSeparation, εισαγωγή δείγματος Rheodyne 7725i και με ανιχνευτή μάζας Finnigan AQA και λογισμικό επεξεργασίας δεδομένων το Xcalibur IBM.
- NMR της Bruker, DRX-400 Avance με λειτουργία στα 400,13 MHz και 298 K,
- Θάλαμος σταθερών συνθηκών VC0057 της Vötsch ρυθμισμένος στους 30 °C και σε σχετική υγρασία 65 % της κεκορεσμένης κατάστασης (INT)
- Θάλαμος σταθερών συνθηκών 4301 της RUMED στους ρυθμισμένος στους 40 °C και σε σχετική υγρασία 75 % της κεκορεσμένης κατάστασης (ACC)
- Κλίβανος KA120P Hellenic Labware ρυθμισμένος στους 55 ± 5 °C
- Karl-Fischer τιτλοδότης, μετρητής υγρασίας, 701KF Titro της Metrohm
- Θάλαμος ξήρανσης υπό κενό, Vacuum Oven, της Gallen Kamp
- Magna IR 560 της Nicolet
- Συσκευή υπερήχων Branson 3510EMT
- Αναλυτικός ζυγός Mettler Toledo AG245

Αναλυτικές μέθοδοι

Οι αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται περιγράφονται στο κεφάλαιο ΙΣΤ και συνοδεύονται από τη επικύρωσή τους, όπου χρειάζεται.

- E.1.2. Καρβεδιλόλη

Η χημική ονομασία της καρβεδιλόλης (ΚΔ), όπως αυτή αναφέρεται στην τελευταία έκδοση της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας είναι (2RS)-1-(9H-Carvazol-4-yloxy)-3-{{2-(2-methoxyphenoxy)ethyl}amino} propan-2-ol και χρησιμοποιείται ως μίγμα ισομερών.



Σχήμα E.1.1. Συντακτικός τύπος με αρίθμηση της καρβεδιλόλης.

Πρόκειται για λευκή ή υπόλευκη κρυσταλλική σκόνη, αρκετά λιπόφιλη και σχετικά αδιάλυτη σε νερό και αραιά οξέα. Είναι ρακεμικό μίγμα, διαθέτει 1 ασύμμετρο κέντρο και εμφανίζει πολυμορφισμό. Στη βιβλιογραφία δίνονται για τη δευτεροταγή αμινομάδα της αλειφατικής αλυσίδας, οι τιμές $pK_a=7,9^{115}$ και $pK_a=8,25^{116}$.

Έλεγχος της καρβεδιλόλης

Ο έλεγχος της καθαρής δραστικής ουσίας, ρακεμικό μίγμα των δυο εναντιομερών, γίνεται σύμφωνα με τα όσα αναφέρονται στην Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία, έκδοση 8.0 (Ε.Φ. εκδ. 8.0). Στη βιβλιογραφία αναφέρονται περιπτώσεις παρακολούθησης των επιπέδων της στο πλάσμα, σε διάφορες χρονικές στιγμές μετά την χορήγηση, όπου έχει επιτευχθεί ο διαχωρισμός των εναντιομερών με ηλεκτροφορητικές τεχνικές^{117 118} και με χειρόμορφη χρωματογραφία.^{119 120}

Φαρμακευτικό σκεύασμα καρβεδιλόλης

Η παρακολούθηση του φαρμακευτικού σκευάσματος της καρβεδιλόλης δεν απαιτεί τον διαχωρισμό των S και R εναντιομερών της αλλά αναλυτική μέθοδο που να τη διαχωρίζει από τα έκδοχα, τα γνωστά προϊόντα διάσπασής της και τα υπολείμματα της σύνθεσης.

E.1.3. Διεθνείς οδηγίες

Κάθε φαρμακευτικό σκεύασμα για να του χορηγηθεί άδεια κυκλοφορίας στην αγορά, υφίσταται μεταξύ άλλων μία σειρά από ελέγχους που εκτιμούν τη σταθερότητά του και καθορίζουν τη διάρκεια του χρόνου ζωής του. Τις διεθνείς οδηγίες παρακολούθησης των νέων δραστικών ουσιών και των φαρμακευτικών προϊόντων¹²¹, που περιγράφουν τους ελέγχους αυτούς, ακολουθούν και οι εγχώριες βιομηχανίες. Μελετώνται και συλλέγονται αποδείξεις για τη μεταβολή της ποιότητας των φαρμακευτικών σκευασμάτων, συναρτήσει του χρόνου και κάτω από την επίδραση διαφορετικών περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως είναι η θερμοκρασία, η υγρασία και το φως. Τα αποτελέσματα που αξιολογούνται αφορούν σε συγκεκριμένες συνθήκες φύλαξης, δεδομένο χρονοδιάγραμμα επανελέγχων και έτσι καθορίζεται η διάρκεια του χρόνου ζωής.

Σύμφωνα με τις παραπάνω οδηγίες, για τον έλεγχο του φαρμακευτικού σκευάσματος, η αποθήκευσή του πρέπει να γίνεται στον τελικό περιέκτη. Οι συνθήκες αποθήκευσης που, όπως προαναφέρθηκε ορίζονται από τις διεθνείς οδηγίες, καλύπτουν κανονικές συνθήκες φύλαξης αλλά και έντονες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας.. Υπάρχουν τέσσερις κλιματικές ζώνες και αναλόγως σε ποιά ζώνη σχεδιάζεται και κυκλοφορεί ένα σκεύασμα, θα πρέπει να επιλέγονται και οι συνθήκες φύλαξης για την παρακολούθηση της σταθερότητάς του.

Ζώνη	Κλιματικός τύπος
Ζώνη I	Μέση ζώνη (μέση ετήσια θερμοκρασία $\leq 15^{\circ}\text{C}$)
Ζώνη II	Μεσογειακή/υποτροπική ζώνη
Ζώνη III	Ζεστή /Ξηρή ζώνη
Ζώνη IV	Ζεστή /Με υγρασία, τροπική ζώνη
Ζώνη IVb	ASEAN* – Ζεστή /Υψηλής υγρασίας ζώνη

*Association of South East Asian Nations

Συνθήκες κανονικής φύλαξης ανά ζώνη

Κλιματική ζώνη	Θερμοκρασία (°C)	Υγρασία (% RH)	Ελάχιστος χρόνος φύλαξης (μήνες)
I	25 ± 2	60 ± 5	12
II	25 ± 2	60 ± 5	12
III	30 ± 2	35 ± 5	12
IV	30 ± 2	65 ± 5	12
IVb	30 ± 2	75 ± 5	12

Συνθήκες επιταχυνόμενης και ενδιάμεσης φύλαξης

Συνθήκες	Θερμοκρασία (°C)	Υγρασία (% RH)	Ελάχιστος χρόνος φύλαξης (μήνες)
Επιταχυνόμενες για Ζώνες I-IV	40 ± 2	75 ± 5	6
Ενδιάμεσες Για Ζώνες I-II	30 ± 2	65 ± 5	6

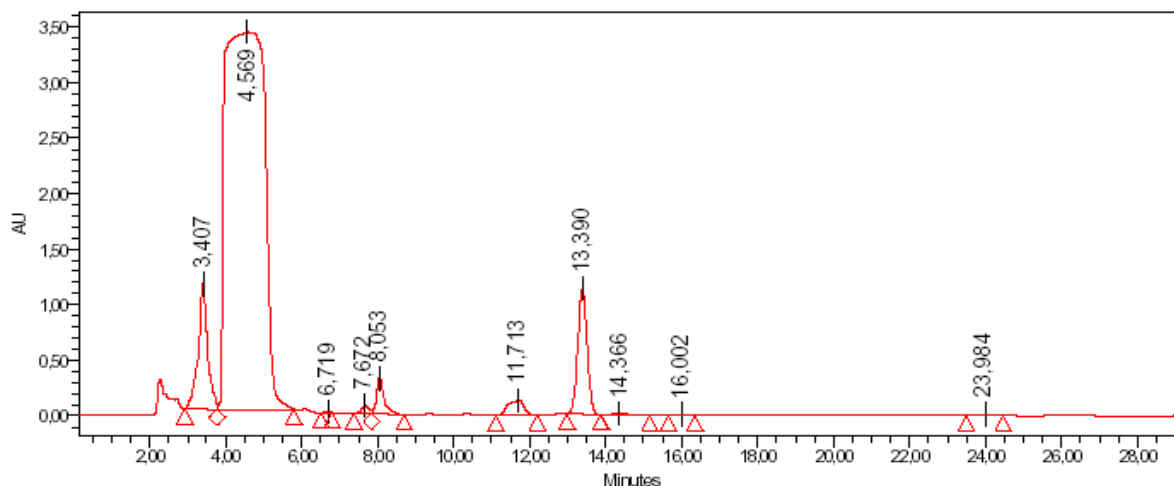
E.1.4. Παρακολούθηση δισκίων καρβεδιλόλης

Η παρακολούθηση των δισκίων καρβεδιλόλης γίνεται σύμφωνα με τις παραπάνω οδηγίες. Η μέγιστη ημερήσια χορηγούμενη δόση είναι τα 25 mg και σε σοβαρές περιπτώσεις τα 50 mg, δηλαδή δύο φορές η μέγιστη δοσολογία των 25 mg που κυκλοφορούν ως φαρμακευτικό σκεύασμα στην αγορά. Κατά τον έλεγχο σταθερότητας με τη μέθοδο της βιομηχανίας, XM0 (όπως αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο ΙΣΤ), παρατηρήθηκε η εμφάνιση ενός Αγνώστου Προϊόντος (ΑΠ) που ξεπερνούσε το όριο του 0,5 %. Η ποσότητα που εμφανίστηκε στους πρώτους τρεις μήνες ήταν σημαντική, ακόμα και σε δείγματα αποθηκευμένα σε ενδιάμεσες συνθήκες (INT). Ενδεικτικές τιμές παρατίθενται στον πίνακα E.1.1. Ακολουθώντας την οδηγία Q3B του ICH¹²² έγιναν προσπάθειες μελέτης του με σκοπό την ταυτοποίησή του.

Πίνακας E.1.1. Ενδεικτικές τιμές % συγκέντρωσης αγνώστου προϊόντος (ΑΠ) σε δισκία καρβεδιλόλης κατά τη φύλαξή τους σε διαφορετικές συνθήκες.

Συνθήκη	RT 25 °C / 60 % RH	INT 30 °C / 65 % RH	ACC 40 °C / 75 % RH
% σε 180 μέρες	0,1	0,6	δ.ε.ε.
% σε 90 μέρες	0,4	δ.ε.ε.	0,3

δ.ε.ε.: Δεν έγινε έλεγχος



Σχήμα E.1.2. Χρωματογράφημα εμφάνισης αγνώστου προϊόντος (13,4 min) που ξεπερνά το 0,5 % κατά τον έλεγχο χημικής σταθερότητας δισκίων καρβεδιλόλης με τη μέθοδο ΧΜ0.

Συμπέρασμα

Οι απαιτούμενες συνθήκες αύξησης του αγνώστου προϊόντος στα δείγματα, όπως φαίνονται στο προηγούμενο πείραμα, αποτελούν συνδυασμό υψηλής θερμοκρασίας και υγρασίας (συνθήκες ACC).

Ε.2. Προκαταρκτικά πειράματα για να διαπιστωθεί η προέλευση του αγνώστου προϊόντος

Ε.2.1. Διερεύνηση προέλευσης αγνώστου προϊόντος

Ένα άγνωστο προϊόν ελέγχου σταθερότητας μπορεί να προέρχεται, τόσο από τη δραστική ουσία, όσο και από κάποια αλληλεπίδραση της δραστικής ή και των εκδόχων. Πρώτη προσέγγιση είναι να βρεθεί η προέλευση του αγνώστου προϊόντος, εάν δηλαδή οφείλεται σε κάποιο από τα συστατικά του σκευάσματος ή σε κάποια αλληλεπίδραση συστατικών

Πείραμα 1

Παρασκευάζονται δυο δείγματα, ένα καθαρής καρβεδιλόλης και ένα εκδόχων όπως αυτά περιγράφονται στον πίνακα Ε.2.1.

Πίνακας Ε.2.1. Ποσότητες σε mg καρβεδιλόλης και εκδόχων στα δείγματα στο πείραμα 1.

<u>Συστατικό</u> <u>(Λειτουργία)</u>	<u>Δείγμα</u>							
	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>	<u>VI</u>	<u>VII</u>	<u>VII</u> <u>I</u>
Καρβεδιλόλη (δραστική ουσία)	100	-	50	50	50	50	50	50
Λακτόζη (αραιωτικό)	-	50	50	-	-	-	-	-
Σακχαρόζη (αραιωτικό με συνδετική δράση)	-	50	-	50	-	-	-	-
Πολυβινυλοπυρρολιδόνη, <i>PVP</i> (συνδετικό πολυμερές υγρής κοκκοποίησης)	-	50	-	-	50	-	-	-
Crospovidone, <i>διακλαδισμένη</i> <i>πολυ-βινυλοπυρρολιδόνη</i> (αποσαθρωτικό)	-	50	-	-	-	50	-	-
Aerosil <i>Διοξείδιο του πυριτίου</i> (κολλοειδές, άνυδρο) (προσροφητικό)	-	50	-	-	-	-	50	-
Στεατικό Μαγνήσιο (λιπαντικό)	-	50	-	-	-	-	-	50

Τα παραπάνω δείγματα (στερεές κόνεις) τοποθετούνται σε πλαστικούς περιέκτες των 50 mL και φυλάσσονται για 1 μήνα στον θάλαμο ACC (40 °C και 75 % RH). Στο τέλος του χρονικού διαστήματος παρασκευάζονται από το δείγμα 1 διάλυμα 1 % w/v (10 mg μίγματος σε 100 mL κινητής φάσης μεθόδου ΧΜ0) και από το δείγμα 2 διάλυμα 1 % w/v καρβεδιλόλης ($2,46 \cdot 10^{-2}$ M, 10 mg μίγματος σε 100 mL κινητής φάσης μεθόδου ΧΜ0), τα οποία ελέγχονται χρωματογραφικά.

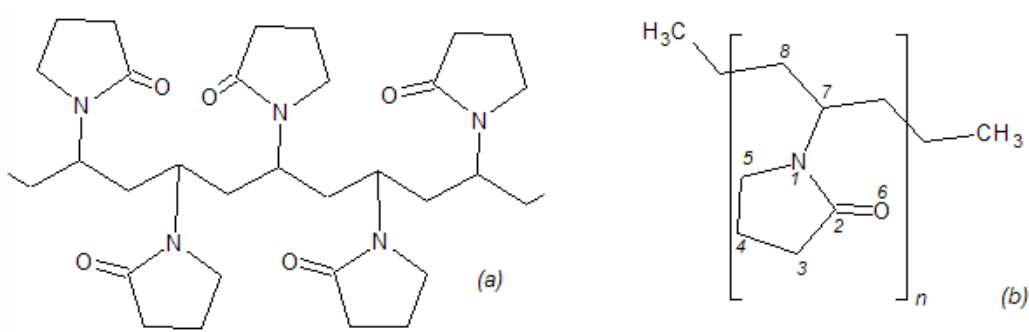
Αποτελέσματα - Συμπέρασμα

Η εμφάνιση του αγνώστου προϊόντος παρατηρείται μόνο στην περίπτωση του δείγματος V.

Η απουσία του αγνώστου προϊόντος από το μίγμα των εκδόχων, αλλά και από την καθαρή καρβεδιλόλη επιβεβαιώνει το συμπέρασμα ότι θα πρέπει να είναι αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης εκδόχου και δραστικής ουσίας. Το άγνωστο προϊόν είναι προϊόν αλληλεπίδρασης καρβεδιλόλης και πολυβινυλοπυρρολιδόνης. Το συμπέρασμα αυτό είναι αρκετό για να μην γίνει ο έλεγχος πιθανής αλληλεπίδρασής της με τον πρωτογενή περιέκτη.

Η εμφάνιση, όμως, του αγνώστου προϊόντος στο δείγμα V δεν αποκαλύπτει τη φύση της αλληλεπίδρασής τους. Μπορούν είτε να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους δίνοντας ένα νέο μόριο, είτε να δημιουργεί το ένα τις κατάλληλες συνθήκες για να υποστεί δομική μετατροπή το δεύτερο.

Στο πείραμα που ακολουθεί θα μελετηθεί η επίδραση της αναλογίας καρβεδιλόλης και πολυβινυλοπυρρολιδόνης στην εμφάνιση του αγνώστου προϊόντος.



Σχήμα Ε.2.1. Δομή πολυβινυλο-πυρρολιδόνης (a) και μονομερούς της (b).

Ε.2.2. Μελέτη της επίδρασης της αναλογίας καρβεδιλόλης και πολυβινυλο-πυρρολιδόνης στην εμφάνιση του αγνώστου προϊόντος

Πείραμα 2

Επιλέγονται δυο διαφορετικές παρτίδες PVP (του ίδιου παραγωγού με τα ίδια όμως χαρακτηριστικά, βάσει των προδιαγραφών τους) και παρασκευάζονται ενδεικτικά δυο σειρές μιγμάτων καρβεδιλόλης και PVP διαφορετικών αναλογιών, όπως αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας Ε.2.2. Δείγματα σε mg διαφορετικών αναλογιών καρβεδιλόλης (ΚΔ) και PVP 2 παρτίδων.

	ΚΔ	PVP-A	PVP-B
A1	50	1000	-
A2	50	250	-
A3	50	50	-
B1	50	-	1000
B2	50	-	250
B3	50	-	50

Οι ζυγίσεις του πίνακα Ε.2.2 πραγματοποιούνται σε πλαστικό περιέκτη και τα δείγματα αυτά αναδεύονται μηχανικά για περίπου 1 min με μεταλλική σπάτουλα και παραμένουν για 15 μέρες σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και υγρασίας. Στο τέλος του χρονικού διαστήματος παρασκευάζονται διαλύματα με περιεκτικότητα καρβεδιλόλης 1 % w/v ($2,45 \times 10^{-2}$ M), μεταφέροντας σε ογκομετρικές φιάλες των 100 ml, 210 mg από τα δείγματα A1 και B1, 60 mg από τα δείγματα A2 και B2 και

20 mg από τα δείγματα A3 και B3. Οι ποσότητες αυτές διαλύονται σε κινητή φάση της μεθόδου ΧΜ0, συμπληρώνονται οι φιάλες μέχρι όγκου και ελέγχονται χρωματογραφικά με την ΧΜ0 ως προς την εμφάνιση του αγνώστου προϊόντος.

Η εκατοστιαία αναλογία του αγνώστου προϊόντος προς καρβεδιλόλη σε κάθε δείγμα αναγράφεται στον πίνακα Ε.2.3 υπολογισμένη ως προς την περιεχόμενη καρβεδιλόλη.

Πίνακας Ε.2.3. % αγνώστου προϊόντος που προσδιορίστηκε ως προς καρβεδιλόλη, στις σειρές δειγμάτων Α και Β με τη μέθοδο ΧΜ0

ΚΔ:PVP	% ΑΠ στη σειρά Α		% ΑΠ στη σειρά Β	
1:20	A1	0,20	B1	0,32
1:5	A2	0,05	B2	0,02
1:1	A3	0,01	B3	0,01

Παρατηρήσεις-Συμπεράσματα

Η % περιεκτικότητα του αγνώστου προϊόντος εκφράζεται ως προς την περιεκτικότητα του μίγματος σε καρβεδιλόλη. Από τα αποτελέσματα μια πρώτη παρατήρηση είναι πως εμφανίζεται σαφώς μεγαλύτερη στα δείγματα με μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε PVP. Το γεγονός μας επιτρέπει να συμπεράνουμε άμεση εξάρτηση του σχηματισμού του από την αναλογία πολυμερούς/ καρβεδιλόλης.

Δεύτερη παρατήρηση είναι πως τα αποτελέσματα της σειράς Β έχουν διπλάσια περιεκτικότητα αγνώστου προϊόντος από τα αντίστοιχα της σειράς Α. Το γεγονός αυτό μας επιτρέπει να συμπεράνουμε ότι τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του PVP είναι σημαντική παράμετρος εμφάνισης του αγνώστου προϊόντος.

Εάν προσπαθήσουμε να αξιολογήσουμε τα αποτελέσματα μελετώντας τις διαφορετικές αναλογίες ΚΔ/PVP, παρατηρούμε πως η εμφάνιση του αγνώστου προϊόντος ευνοείται από μεγάλη αραίωση ή διασπορά της καρβεδιλόλης στο PVP. Αυτό μας οδηγεί στη σκέψη ότι ο τρόπος αλληλεπίδρασής τους είναι συγκεκριμένος και σε αυτόν συμμετέχουν ορισμένα δομικά χαρακτηριστικά του PVP. Η μεγάλη συγκέντρωση καρβεδιλόλης απλά δεν ευνοεί την αλληλεπίδραση.

Όπως παρουσιάστηκε στον πίνακα Ε.1.1, η αύξηση της θερμοκρασίας και της % σχετικής υγρασίας του χώρου αποθήκευσης προκαλούν αύξηση και στο

σχηματιζόμενο άγνωστο προϊόν, δεν γίνεται όμως σαφές ποια από τις δυο παραμέτρους είναι η πλέον σημαντική. Το επόμενο βήμα αφορά στη μελέτη μεμονωμένα των επιδράσεων των δυο παραμέτρων αυτών και την αξιολόγησή τους ως προς το σχηματιζόμενο άγνωστο προϊόν.

E.3. Πειράματα εκτίμησης συνθηκών εμφάνισης

E.3.1. Μελέτη συνθηκών σχηματισμού

Η σύγκριση της θερμοκρασίας και της % σχετικής υγρασίας ως προς την σημαντικότητά τους στην εμφάνιση του αγνώστου προϊόντος γίνεται με την απομόνωσή τους ως παραμέτρων σχηματισμού του. Δηλαδή επιλέγονται νέοι συνδυασμοί χαμηλών και υψηλών θερμοκρασιών και υγρασίας τοποθετώντας σε κάθε περίπτωση ίδια σειρά δειγμάτων.

Τα παραπάνω πειράματα γίνονται χρησιμοποιώντας παράλληλα τρία διαφορετικά PVP. Τα δυο προέρχονται από τον ίδιο παραγωγό, αλλά έχουν διαφορετικό κωδικό παραγωγής (παρτίδες) και το τρίτο από διαφορετικό παραγωγό.

Πείραμα 3

Η μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στα δείγματα γίνεται επιλέγοντας θάλαμο υψηλής θερμοκρασίας και παρουσία αφυγραντικού υλικού, ώστε να εξασφαλιστούν χαμηλά επίπεδα σχετικής υγρασίας στην ατμόσφαιρα. Για τη μελέτη της επίδρασης της υγρασίας στα δείγματα χρησιμοποιείται υάλινος θάλαμος με 5 % v/v νερό. Ο θάλαμος αυτός παραμένει ερμητικά σκεπασμένος από υάλινη επιφάνεια σε θερμοκρασία δωματίου για δυο μέρες πριν την έναρξη του πειράματος ώστε να αποκατασταθεί ισορροπία του νερού μεταξύ της υδατική και της αέριας φάσης, εξασφαλίζοντας την κεκορεσμένη σε υγρασία ατμόσφαιρα. Τέλος, για να μπορεί να γίνει η σύγκριση με τον συνδυασμό των δυο αυτών παραμέτρων και ως θετική κατάσταση, χρησιμοποιείται και ο κλίβανος ACC (40 °C και 75 % RH).

Οι παραπάνω περιπτώσεις συνθηκών συνοψίζονται σε :

A. Θάλαμο ελεγχόμενης υψηλής θερμοκρασίας (T~60 °C).

Β. Θάλαμο θερμοκρασίας δωματίου με κεκορεσμένη σε υγρασία ατμόσφαιρα (RH~100 %).

Γ. Θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών αποθήκευσης δειγμάτων ρυθμισμένο σε 40 °C και 75 % RH (ACC).

Προετοιμάζονται τα μίγματα 4-1, 4-2 και 4-3, ζυγίζοντας τις ποσότητες σε πλαστικό περιέκτη και αναμιγνύοντάς τα με μεταλλική σπάτουλα, ως εξής:

Μίγμα 4-1: 180 mg καρβεδιλόλης και 179 mg PVP1.

Μίγμα 4-2: 176 mg καρβεδιλόλης και 183 mg PVP2.

Μίγμα 4-3: 175 mg καρβεδιλόλης και 178 mg PVP3.

Τα μίγματα αυτά παρασκευάστηκαν ώστε μέρος τους να αποθηκευθεί στις συνθήκες φύλαξης Α, Β και Γ. Παράλληλα, ως τυφλά δείγματα για την κάθε συνθήκη, επιλέγονται να χρησιμοποιηθούν η καθαρή καρβεδιλόλη και το κάθε PVP σε καθαρή μορφή.

Στη συνέχεια ετοιμάζονται δείγματα με τις ποσότητες που αναφέρονται στον πίνακα Ε.3.1 και τοποθετούνται σε υάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες των 10 ml.

Πίνακας Ε.3.1. Ποσότητες καρβεδιλόλης και PVP σε mg των δειγμάτων που αποθηκεύονται σε διαφορετικές συνθήκες

	Ποσότητες σε mg		
	Συνθήκη Α (T~60 °C)	Συνθήκη Β (RH~100 %)	Συνθήκη Γ (40 °C / 75 % RH)
καρβεδιλόλη	58,6	55,3	52,7
PVP1	135,0	163,0	180,4
PVP2	63,0	67,0	62,8
PVP3	60,0	62,0	61,0
Μίγμα 4-1	130,0	93,0	107,0
Μίγμα 4-2	150,0	92,3	90,0
Μίγμα 4-3	95,0	150,0	92,3

Στην περίπτωση των συνθηκών Α ο κάθε δοκιμαστικός σωλήνας είναι σφραγισμένος. Στην περίπτωση Γ όλοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες δεν είναι σφραγισμένοι, αλλά απλώς σκεπασμένοι ώστε να αποτραπεί η εισαγωγή οποιουδήποτε ξένου σώματος παρά μόνο της υγρασίας του θαλάμου. Στη περίπτωση

Β οι δοκιμαστικοί σωλήνες αφήνονται ανοιχτοί για να αλληλεπιδράσουν τα δείγματα με την κεκορεσμένη σε υγρασία ατμόσφαιρα.

Τα δείγματα παραμένουν για χρονικό διάστημα 15 ημερών στις τρεις επιλεγμένες διαφορετικές συνθήκες.

Οπτικές παρατηρήσεις

Μετά την πάροδο του χρονικού διαστήματος των 15 ημερών συγκεντρώνονται τα δείγματα και καταγράφονται αρχικά οι οπτικές παρατηρήσεις:

▲ Στην περίπτωση Α κανένα δείγμα δεν δείχνει να έχει υποστεί κάποια αλλοίωση από την υψηλή θερμοκρασία.

▲ Στην περίπτωση Β, τα δείγματα δεν παρουσιάζουν μακροσκοπικά κάποια διαφορά από την αρχική τους κατάσταση. Με εξαίρεση το δείγμα της καρβεδιλόλης όλα τα άλλα εμφανίζονται περισσότερο κολλώδη, γεγονός που διαπιστώνεται κατά τη δειγματοληψία με σπάτουλα.

▲ Στην περίπτωση Γ όλα τα δείγματα που περιέχουν PVP, καθαρό ή ως μίγμα, έχουν χάσει την κοκκώδη μορφή τους, έχουν ξεπεράσει το κολλώδες στάδιο και βρίσκονται σε μια κατάσταση *πλαστικοποίησης*.

Από το περιεχόμενο του κάθε δοκιμαστικού σωλήνα απομακρύνονται περίπου 5 mg και μεταφέρονται σε ογκομετρικές φιάλες των 5,0 ml. Διαλύονται σε 4 mL κινητής φάσης και συμπληρώνονται μέχρι τον ονομαστικό όγκο.

Σημειώνεται πως στην περίπτωση των μιγμάτων στις συνθήκες Γ η απομάκρυνση κάποιας ποσότητας είναι δύσκολη λόγω της πλαστικοποιημένης μορφής των δειγμάτων. Για τον λόγο αυτό διαλυτοποιείται όλη η ποσότητα με προσθήκη περίπου 5 mL κινητής φάσης στον δοκιμαστικό σωλήνα και μεταφέρονται σε ογκομετρικές φιάλες των 10,0 ml. Συμπληρώνονται με τον ίδιο διαλύτη και στη συνέχεια 2,0 mL από το κάθε ένα αραιώνονται στα 20,0 mL σε κατάλληλη ογκομετρική φιάλη. Δεδομένης της αρχικής ζύγισης, τα τρία δείγματα έχουν την ίδια συγκέντρωση με τα αντίστοιχα των σειρών Α και Β.

Όλα τα παραπάνω δείγματα ελέγχονται ως προς την εμφάνιση του αγνώστου προϊόντος. Τα αποτελέσματα περιέχονται στον πίνακα Ε.3.2.

Πίνακας Ε.3.2. % εμφανιζόμενου αγνώστου προϊόντος ως προς την καρβεδιλόλη στο πείραμα 3

	ΚΔ	PVP1	PVP2	PVP3	Μίγμα 4-1	Μίγμα 4-2	Μίγμα 4-3
A ($T \sim 60^\circ\text{C}$)	-	-	-	-	-	-	-
B (RH~100 %)	-	-	-	-	-	-	0,08
Γ ($40^\circ\text{C} / 75\% \text{ RH}$)	-	-	-	-	0,11	0,18	0,37

Συμπέρασμα Οπτικών Παρατηρήσεων

Είναι γνωστό πως η θερμοκρασία μετάβασης στην υαλώδη κατάσταση (T_g) του PVP, όπως και των πολυμερών γενικότερα, είναι η θερμοκρασία στην οποία καταστρέφεται η δομή του πλέγματός τους και μεταβαίνουν σε υαλώδη κατάσταση. Η T_g των μιγμάτων εξαρτάται από την αναλογία τους και βρίσκεται ενδιάμεσα των τιμών των καθαρών συστατικών ενώ για το PVP η τιμή αυτή ταπεινώνεται σημαντικά και από την υγρασία του πολυμερούς.

Έτσι και στην περίπτωση Β, αν και η βιβλιογραφική T_g του PVP K-25 είναι περίπου στους 155°C , η συνύπαρξή του με την καρβεδιλόλη σε μίγμα καθώς και η υγρασία του περιβάλλοντος μειώνουν την T_g στα επίπεδα της θερμοκρασίας του πειράματος.

Σχόλια-Παρατηρήσεις

Από τα προηγούμενα πειράματα αναμενόταν η εμφάνιση του μελετώμενου αγνώστου προϊόντος σε όλα τα μίγματα ΚΔ/PVP στην περίπτωση Γ, καθώς και η εξάρτησή του από την ποιότητα του PVP, δηλαδή πιθανώς διαφορετικά αποτελέσματα για κάθε ένα.

Από το συγκεκριμένο πείραμα προκύπτει ότι η παρουσία του PVP3 προκαλεί παραγωγή διπλάσιας ποσότητας αγνώστου προϊόντος από το PVP1 και το PVP2 στο ίδιο χρονικό διάστημα, στα ίδια μίγματα και για τις ίδιες ελεγχόμενες συνθήκες (περίπτωση Γ).

Η σημαντικότερη, όμως, παρατήρηση είναι η εμφάνιση του αγνώστου προϊόντος ΚΔ με το ίδιο PVP που σε ατμόσφαιρα κεκορεσμένης υγρασίας έχει την μεγαλύτερη τάση να εμφανίσει το άγνωστο προϊόν.

Συμπεράσματα

Το μίγμα 4-3 στην περίπτωση Α (υψηλή θερμοκρασία) υπήρξε αρνητικό ως προς το άγνωστο προϊόν δείχνοντας πως η θερμοκρασία στην περίπτωση Γ (40 °C / 75 % RH) απλά επιταχύνει το αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης καρβεδιλόλης και PVP. Δηλαδή μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τη θερμοκρασία για την επιτάχυνση των αντιδράσεων παραγωγής του αγνώστου προϊόντος. Επίσης, η σημαντική εμφάνιση του αγνώστου προϊόντος στην περίπτωση Β υποδηλώνει πως η παρουσία υγρασίας και δίχως την επίδραση υψηλής θερμοκρασίας είναι ικανή να παράγει το άγνωστο προϊόν, γεγονός που φανερώνει ότι το νερό συμμετέχει ενεργά και καθοριστικά στην εμφάνιση του αγνώστου προϊόντος. Το αντίθετο συμβαίνει με την υψηλή θερμοκρασία η οποία δεν αποτελεί ικανή συνθήκη για την παραγωγή του προϊόντος.

Η σύγκριση των τριών PVP ως προς τα χαρακτηριστικά τους ίσως θα μας οδηγούσε σε κάποια χρήσιμα συμπεράσματα.

E.3.2. Σύγκριση ποιότητας πολυβινυλοπυρρολιδονών

α. Ποιότητα PVP

Τα πολυμερή χαρακτηρίζονται πάντα από μια τιμή K, που ακολουθεί την ονομασία τους και αποτελεί έκφραση της τάξης του πολυμερούς. Η τιμή K προκύπτει από τον τύπο

$$K = \frac{1,5 \log \eta - 1}{0,15 + 0,003c} + \frac{\sqrt{300c \cdot \log \eta + (c + 1,5c \log \eta)^2}}{0,15c + 0,003c^2} \quad \text{Εξίσωση E.1}$$

όπου η το σχετικό, ως προς το νερό, ιξώδες διαλύματος του πολυμερούς συγκέντρωσης c , εκφρασμένης σε g ανά 100 mL διαλύτη (νερό).

Το K, όπως φαίνεται στην προηγούμενη σχέση, είναι έκφραση του ιξώδους του πολυμερούς και αυξάνει όσο μεγαλύτερο είναι το μέσο μοριακό βάρος του

πολυμερούς, αποτελώντας ένδειξη για το μέσο μοριακό βάρος του πολυμερούς, του βαθμού πολυμερισμού του.

Τα πολυμερή που χρησιμοποιούνται στο πείραμα 4, PVP1, PVP2 και PVP3, είναι της ίδιας τάξης, K-25, και στην τιμή αυτή ανήκουν τα πολυμερή με μέσο μοριακό βάρος 28000 έως 34000.

Κατά τη στιγμή της παραγωγής τους πληρούν συγκεκριμένες προδιαγραφές όπως αυτές έχουν οριστεί από τον παραγωγό τους.

Τα σημαντικότερα από αυτά τα χαρακτηριστικά είναι πέραν της τιμής K, η περιεχόμενη υγρασία, το % του περιεχόμενου N₂ (ένδειξη της παρουσίας των υποκαταστατών πυρρολιδόνης στο πολυμερές), το pH διαλύματος 5 % w/v σε νερό (ένδειξη οξύτητας και τελικών ομάδων του πολυμερούς), η παρουσία υπεροξειδίων (υπολείμματα συνθετικής οδού, εκκινητές πολυμερισμού), η παρουσία της 2-πυρρολιδόνης (απομακρυσμένοι υποκαταστάτες, ένδειξη αλλοίωσης και πιθανής ακορεστότητας του πολυμερούς) και της βινυλοπυρρολιδόνης (μη πολυμερισμένη ακόρεστη αρχική ουσία) παρουσιάζονται στον πίνακα E.3.3 με τις αντίστοιχες τιμές, σύμφωνα με τα πιστοποιητικά αποτελεσμάτων των αναλύσεων των παραγωγών.

Πίνακας E.3.3. Τα συγκρινόμενα χαρακτηριστικά ποιότητας για κάθε PVP τη στιγμή παραγωγής τους

Προδιαγραφές	Όρια προδιαγραφών	Χαρακτηριστικά Δειγμάτων		
		PVP1	PVP2	PVP3
Ημ. Παραγωγής		24/11/2001 παραγωγός Α	28/05/2002 παραγωγός Β	03/01/2002 παραγωγός Β
Υγρασία (%)	< 5,00	3,3	2,90	2,50
% N ₂ σε ξηρή βάση	12,0-12,8	12,5	12,4	12,5
pH	3,0 - 5,0	3,1	3,6	3,6
Υπεροξειδίων σε ppm	< 400	52	50	40
2-πυρρολιδόνη (%)	1,00-3,00	-	2,00	2,00
Βινυλοπυρρολιδόνη	< 5 ppm	< 0,1 ppm	-	-
	< 10 mg/kg	-	< 1 mg/kg	< 1 mg/kg
Τιμή K	24 - 26	26,0	-	-
	22,5-26,7	-	25,3	24,9

Έχοντας καταλήξει στη σπουδαιότητα της υγρασίας στην εμφάνιση του αγνώστου προϊόντος, επαναλαμβάνεται και στα τρία PVP ο έλεγχος της περιεχομένης υγρασίας με τη μέθοδο Karl-Fischer σε διάφορες χρονικές στιγμές φύλαξης των εκδόχων σε συνθήκες δωματίου και τα αποτελέσματα συγκρίνονται με τις αντίστοιχες τιμές που αναφέρονται από τον κάθε παραγωγό ως αρχική κατάσταση.

Πίνακας Ε.3.4. Τιμές περιεχομένης υγρασίας των PVP σε διάφορες χρονικές στιγμές, κατά την μελέτη του αγνώστου προϊόντος.

% Υγρασία (μέθοδο Karl Fischer)	PVP1	PVP2	PVP3
Στοιχεία Παραγωγού	3,30	2,90	2,50
Μέτρηση 1 % αύξηση της υγρασίας	6,67 +102	4,12 +42	3,44 +37
Μέτρηση 2 (2 τιμές με διαφορά 3 ημερών)	9,18 9,77	7,16 6,81	9,83 10,49

Αποτελέσματα και συμπεράσματα μετρήσεων της υγρασίας του PVP σε διάφορες χρονικές στιγμές

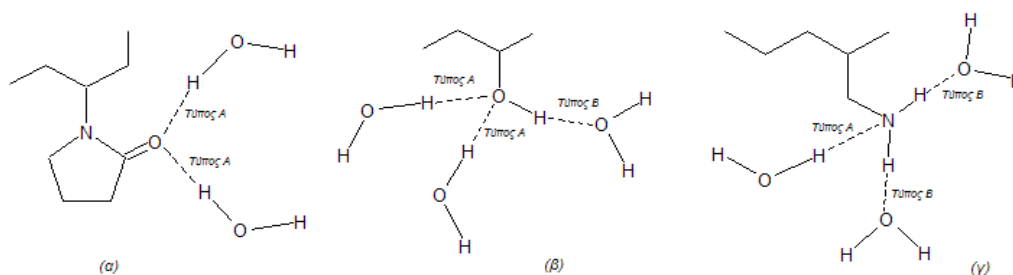
Από τη στιγμή της παρασκευής τους, το PVP3 έχει λιγότερη υγρασία από το PVP1, ενώ η τιμή για το PVP2 βρίσκεται κάπου ενδιάμεσα. Η ίδια σχέση στις τιμές παρατηρείται και για τα αποτελέσματα της μέτρησης 1 (Πίνακας Ε.3.4.)

Το PVP χαρακτηρίζεται για την υγροσκοπικότητά του και αυτή φαίνεται από την αύξηση της υγρασίας κατά την πάροδο του χρόνου. Επειδή η υγροσκοπικότητα του PVP είναι αποτέλεσμα προσρόφησης της ατμοσφαιρικής υγρασίας, ο εγκλωβισμός της στο δίκτυο του πολυμερούς, πρέπει να γίνεται με διαφορετικό τρόπο για το κάθε ένα από τα δείγματα. Δηλαδή η δομή της αλυσίδας του πολυμερούς στο χώρο, η κατανομή του πολυμερούς, ο προσανατολισμός των υποκαταστατών και η πιθανή αλληλεπίδρασή τους διαφέρει στα μελετώμενα PVP. Για κάποιο λόγο οι θέσεις που μπορούν να καταλάβουν τα μόρια του νερού μέσα στο πολυμερές δεν είναι στον ίδιο βαθμό προσβάσιμες στο PVP3 όπως είναι στο PVP1.

Η υγρασία που μετράται και στα τρία PVP μετά από 18 μήνες δίνει διαφορετική εικόνα. Η περαιτέρω προσρόφηση υγρασίας από το πολυμερές είναι αναμενόμενη, ιδίως εάν οι συνθήκες φύλαξής του δεν είναι οι καλύτερες δυνατές. Δεν έχουν και οι τρεις ποιότητες την ίδια υγρασία.

Οι δεσμοί υδρογόνου που μπορούν να σχηματίσουν τα μόρια του νερού με χαρακτηριστικές πολικές ομάδες χωρίζονται σε δυο κατηγορίες, αναλόγως του τρόπου συμμετοχής τους¹²³. Το νερό μπορεί να είναι είτε δότης είτε δέκτης ηλεκτρονίων, αναλόγως της πολικής ομάδας που καλείται να περιβάλλει, όπως αυτό φαίνεται στο σχήμα E.3.1, και η σταθερότητα του δεσμού να επηρεάζεται διαφορετικά από την παρουσία ιόντων.

Στον τύπο Α δεσμού υδρογόνου, όπως αυτός συμβολίζεται στο σχήμα E.3.1, τα μόρια του νερού δρουν ως δότες πρωτονίου. Ο δεσμός αυτός σταθεροποιείται από την παρουσία κατιόντων και αποσταθεροποιείται παρουσία ανιόντων. Αντίθετα στον τύπο Β, το νερό παρουσιάζεται ως δότης ζεύγους ηλεκτρονίων. Η σύνδεση αυτή αποσταθεροποιείται από την παρουσία κατιόντων στο περιβάλλον του.



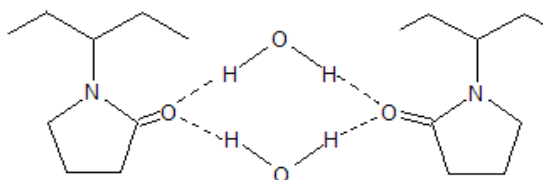
Σχήμα E.3.1. Δομές ενυδάτωσης χαρακτηριστικών ομάδων πολυμερών (α) PVP (β) PVA (γ) PAIAm¹²³

Η καρβεδιλόλη έχει δυο δευτεροταγείς αμινομάδες και θα μπορούσε να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου, τόσο τύπου Α, όσο και τύπου Β, όπως και η μονάδα του πολυμερούς PVP στην περίπτωση (β) του σχήματος E.3.1.

Σε αναφορά της αλληλεπίδρασης του PVP με το νερό, είναι γνωστό πως στο περιβάλλον της, η κάθε πυρρολιδόνη μπορεί να δεχθεί μέχρι και πέντε μόρια νερού, εκ των οποίων τα δυο αλληλεπιδρούν άμεσα με την καρβονυλομάδα και τα

υπόλοιπα βρίσκονται συνδεδεμένα με τα πρώτα ή στο άμεσο περιβάλλον. Τα μόρια αυτά νερού προκαλούν τις διάφορες σφαίρες επιδιάλυτωσης του PVP.

Από την προηγούμενη παρατήρηση, μπορούμε να ισχυριστούμε πως τα άμεσα εγκλωβισμένα μόρια νερού είναι δυο για κάθε βινυλοπυρρολιδόνη. Γνωρίζοντας όμως τη γειτνίαση των ομάδων αυτών και σε συνδυασμό με τη γνώση σχηματισμού δεσμών-Η τύπου A, μπορούμε να δεχθούμε ως σημαντικά πιθανή την περίπτωση των δυο καρβονυλίων που να μοιράζονται δυο μόρια νερού. (σχήμα E.3.2).



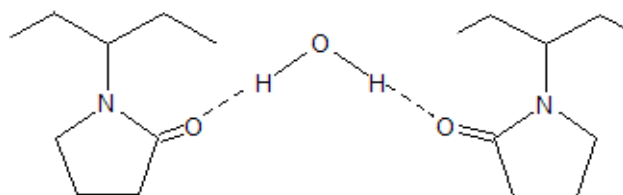
Σχήμα E.3.2. Ενυδάτωση PVP. Γέφυρες των βινυλοπυρρολιδονών σχηματισμένες από τα μόρια νερού.¹²⁴

Δεχόμενοι το σχήμα E.3.2, τότε μπορούμε να ισχυριστούμε πως δομικά, η μέγιστη ενσωμάτωση με πλήρη δέσμευση του νερού θα αντιστοιχεί σε δυο μόρια ανά δυο πυρρολιδόνες. Αυτό σημαίνει αναλογία νερού και επαναλαμβανομένης δομικής μονάδας 1-1, και αντίστοιχα, η περιεκτικότητα υγρασίας του PVP θα είναι:

$$\frac{Μάζα_{H_2O}}{Μάζα_{δομ.μονάδας} + Μάζα_{H_2O}} = \frac{1,0079 \times 2 + 15,996}{12,114 \times 6 + 1,0079 \times 9 + 14,007 + 15,996 + 1,0079 \times 2 + 15,996} \times 100\%$$

→ Χαρακτηριστική υγρασία = 13,9 %

Κατά το σχήμα E.3.2 υπάρχει και η περίπτωση του ενός μορίου νερού που δρα ως γέφυρα μεταξύ γειτονικών καρβονυλίων (σχήμα E.3.3), οπότε η παραπάνω χαρακτηριστική υγρασία θα ήταν 7,5 %. Ο παράλληλος εγκλωβισμός με διαφορετικό τρόπο των μορίων του νερού, δίνει διαφορετικές τιμές χαρακτηριστικής υγρασίας για το κάθε ένα PVP, αλλά η πλήρης κάλυψη των θέσεων για ενσωμάτωση μορίων νερού θα ήταν τα δυο μόρια ανά δυο πυρρολιδόνες.



Σχήμα Ε.3.3. Ενυδάτωση PVP. Γέφυρα ενός μορίου νερού σε κοντινές βινυλοπυρρολιδόνες.

Πίνακας Ε.3.5. Διαφορά περιεχόμενης υγρασίας των PVP σε διάφορες χρονικές στιγμές από την μέγιστη θεωρητικά ενσωματωμένη

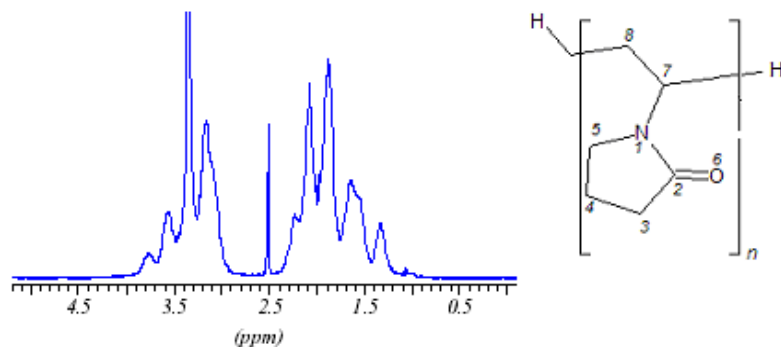
% Υγρασία (Κ.Φ.)	PVP1	PVP2	PVP3
Διαφορά πρώτης μέτρησης και χαρακτηριστικής (13,9 %)	7,26	9,78	10,46
Διαφορά τελευταίας μέτρησης και χαρακτηριστικής (13,9 %)	4,41	6,91	7,48

Τα υπάρχοντα δεδομένα δεν αφήνουν περιθώρια για περισσότερα συμπεράσματα εκτός του γεγονότος ότι στην περίπτωση των συνθηκών της σειράς Β του πειράματος 3, η υγρασία που απορροφάται πέραν του 7,5 % είναι για το PVP. Ίσως η υγρασία αυτή να σχηματίζει σφαίρα επιδιάλυτωσης η οποία σταθεροποιεί το άγνωστο προϊόν (σύμπλοκο), δηλαδή μετατοπίζει την ισορροπία προς τον σχηματισμό του.

β. Φάσματα $^1\text{H-NMR}$ των διαφορετικών PVP ¹²⁵

Σημαντικά στοιχεία για τη δομή μιας ουσίας προκύπτουν από τη φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$. Τα NMR φάσματα των PVP μπορεί να δώσουν πληροφορίες που να βοηθήσουν τη μελέτη του αγνώστου προϊόντος.

Η απόδοση των κορυφών στα πολυμερή δεν είναι εύκολη. Ευτυχώς όμως το PVP είναι ένα από τα σχετικά εύκολα πολυμερή, διότι έχει μικρή δομική ομάδα και στη βιβλιογραφία βρίσκονται φάσματα $^1\text{H-NMR}$ όπως επίσης και COSY, δυο διαστάσεων.



Σχήμα E.3.4. $^1\text{H-NMR}$ φάσμα του PVP1 σε DRX400 και με διαλύτη $\text{DMSO-}d_6$

Το σχήμα E.3.4 είναι το φάσμα 6 mg του PVP1 διαλελυμένων σε 700 μL $\text{DMSO-}d_6$. Η απόδοση των κορυφών του E.3.4 δίνεται στον πίνακα E.3.7 και επιβεβαιώνεται από τη βιβλιογραφία, όπως προαναφέρθηκε. Σημειώνεται πως η δομή του PVP, όπως αυτή δίνεται στο σχήμα E.3.4, περιλαμβάνει και δυο υδρογόνα στο τέλος της αλυσίδας, τα οποία θα πρέπει να εμφανίζονται στο φάσμα NMR. Η αναλογία, όμως, των τελικών αυτών πρωτονίων ως προς τα αυτά της επαναλαμβανομένης βινυλοπυρρολιδόνης είναι πολύ μικρή λόγω του μεγάλου μήκους του πολυμερούς, με αποτέλεσμα να μην δίνουν παρατηρήσιμη κορυφή στο φάσμα.

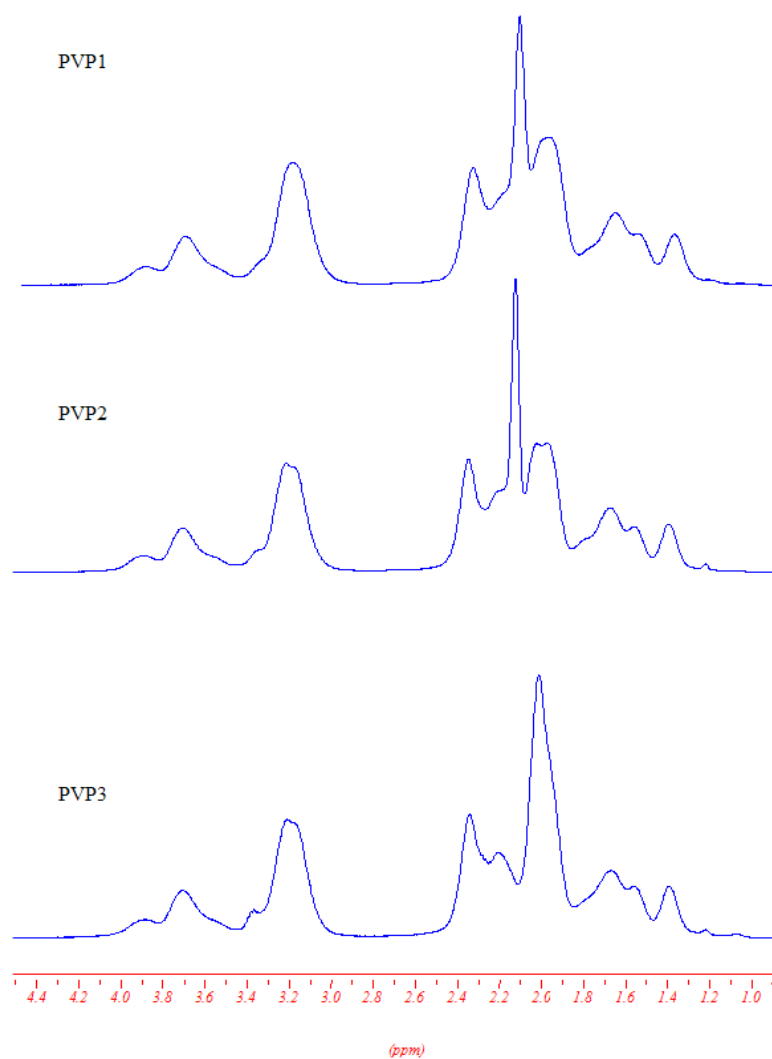
Πίνακας E.3.7. Απόδοση κορυφών φάσματος $^1\text{H-NMR}$ στα πρωτόνια του PVP σε CDCl_3

Πρωτόνιο του άνθρακα με αρίθμηση	ppm σε CDCl_3
8	1,48 (d)
4	1,87 (m)
3	2,12 (t)
5	3,16 (t)
7	3,65 (d)

Επεξηγώντας το φάσμα του σχήματος E.3.4 σημειώνεται πως η κορυφή στα 2,50 ppm αποδίδεται στο $\text{DMSO-}d_6$, ενώ η τεράστια κορυφή στα 3,33 ppm αποδίδεται στο νερό, είτε του διαλύτη είτε του PVP. Δίδεται από τη βιβλιογραφία πως για διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο η κορυφή του διαλύτη απομακρύνεται

αρκετά από το PVP (στα 7,26 ppm), η δε κορυφή του νερού εμφανίζεται στα 1,5 ppm, οπότε επιλέγεται η αλλαγή του διαλύτη για τα φάσματα των τριών PVP.

Από το κάθε ένα από τα διαφορετικά PVP διαλύονται 5 mg σε 600 μL CDCl_3 μέσα σε κατάλληλο σωληνάκι και τα δείγματα μετρούνται σε NMR DRX400. Τα φάσματα που προκύπτουν δίνονται στο σχήμα E.3.5, συγκριτική παρουσίαση των 3 φασμάτων.



Σχήμα E.3.5. Σύγκριση $^1\text{H-NMR}$ φασμάτων διαφορετικών PVP σε DRX400 και με διαλύτη CDCl_3

γ. Υπολογισμός περιεχόμενης υγρασίας

Συγκρίνοντας τα τρία φάσματα $^1\text{H-NMR}$ του PVP παρατηρούμε μία βασική διαφορά που αφορά στην περιοχή των κορυφών των πρωτονίων των C3 και C4 της πυρρολιδόνης. Υπάρχει το σήμα κάποιου (ή κάποιων) πρωτονίου το οποίο δεν παρουσιάζει σταθερή θωράκιση και εάν μετατοπιστεί αποκαλύπτει την κορυφή του πρωτονίου του C4. Είναι πολύ πιθανό το σήμα αυτό να ανήκει στο περιεχόμενο νερό του PVP.

Από τις τελευταίες μετρήσεις υγρασίας για τα τρία διαφορετικά PVP είναι γνωστή η περιεκτικότητά τους σε νερό, και η οποία με βάση τον πίνακα E.3.4 είναι της τάξης του 8 % w/w. Ως ποσοστό, είναι αρκετά μεγάλο ώστε να επιτρέπει την παρατήρηση των πρωτονίων του νερού στο φάσμα. Στο σχήμα E.3.4 τα πρωτόνια του νερού συντονίζονται στην περιοχή που είναι αναμενόμενο (3,3 ppm) και δίνουν μεγάλη κορυφή που συμφωνεί με το περιεχόμενο ποσοστό υγρασίας του PVP. Στα φάσματα με διαλύτη CDCl_3 (σχήμα E.3.5) γνωρίζοντας την περιεχόμενη υγρασία των PVP θα ήταν δικαιολογημένη η εμφάνιση της κορυφής στην περιοχή των 1,5 ppm. Αντιθέτως, εμφανίζεται μετατοπισμένη στην περιοχή των 2 ppm (στα 2,12 ppm για το PVP1, 2,12 ppm για το PVP2, 2,02 ppm για το PVP3). Τα πρωτόνια του νερού εμφανίζονται σε χαμηλότερες τιμές πεδίου όταν βρίσκονται στο δίκτυο του πολυμερούς, όπως παρουσιάζεται από τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ και η διαπίστωση αυτή συμφωνεί με τις δομές που δίνονται στα σχήματα E.3.2 και E.3.3, όπου τα μόρια του νερού σχηματίζουν γέφυρα μεταξύ γειτονικών καρβονυλίων.

Η ολοκλήρωση των κορυφών στα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ δεν είναι εύκολη, όπως αναμένεται να συμβαίνει στα πολυμερή, οι κορυφές είναι ευρείες και δεν είναι σαφής ο διαχωρισμός τους. Παρατηρείται πως τα σήματα των πρωτονίων του PVP εμφανίζονται σε δυο περιοχές. Η πρώτη περιοχή, περιοχή A (2,8 έως 4,3 ppm, πρωτόνια H5 και H7), παραμένει αμετάβλητη κατά την παρακολούθηση της διαδικασίας ξήρανσης, αντίθετα με την περιοχή B (1,2 έως τα 2,8 ppm) που περιλαμβάνει τα υπόλοιπα πρωτόνια. Η αναλογία πρωτονίων των περιοχών A και B αναμένεται να είναι 3 προς 6 αντίστοιχα. Η ολοκλήρωση όμως των περιοχών και η

σύγκριση των αποτελεσμάτων, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι στην περιοχή B περιλαμβάνονται εκτός των πρωτονίων του PVP και τα πρωτόνια νερού του πλέγματος. Το πλεόνασμα της ψηφιακής ολοκλήρωσης στην περιοχή B αντιστοιχεί σε πρωτόνια και αποδίδεται στην ποσότητα υγρασίας που περιείχε το δείγμα. Η διαφορά αυτή μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι αντίστοιχη με ανάλογα πρωτόνια μορίων νερού ανά επαναλαμβανόμενη μονάδα πολυμερούς. Κατά συνέπεια, το δεδομένο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της περιεχόμενης υγρασίας του δείγματος.

Η σύγκριση των ολοκληρώσεων των περιοχών A και B πραγματοποιείται για ένα μεγάλο αριθμό δειγμάτων PVP με διαφορετικές τιμές περιεχόμενης υγρασίας, όπως αυτή μετρήθηκε με την τιτλοδότηση κατά *Karl-Fischer*. Για την επίτευξη του εύρους των τιμών, κάποια δείγματα υφίστανται μερική ξήρανση πριν τις μετρήσεις.

Ο υπολογισμός της υγρασίας από το $^1\text{H-NMR}$ φάσμα στηρίζεται στην ακόλουθη σκέψη:

Η ψηφιακή ολοκλήρωση στο τμήμα A του φάσματος (INT_A) αντιστοιχεί σε 3 πρωτόνια ενώ στο τμήμα B ολοκληρώνονται τόσο τα 6 του PVP όσο και το πλεόνασμα των πρωτονίων που αντιστοιχεί σε νερό. Δηλαδή τα πρωτόνια του νερού θα είναι:

$$H_{H_2O} = \frac{\text{INT}_B - 2 \times \text{INT}_A}{\text{INT}_A} \times 3 \quad \text{Εξίσωση E.1}$$

Η αναλογία πρωτονίων είναι και αναλογία των αντιστοίχων μαζών. Τα 3 πρωτόνια του πολυμερούς αντιστοιχούν σε μάζα 111,14g (το μοριακό βάρος της επαναλαμβανόμενης μονάδας) ενώ για κάθε πρωτόνιο του νερού 9,01g (18,02g/2). Από τις μάζες αυτές είναι δυνατός ο υπολογισμός της υγρασίας του κάθε δείγματος χρησιμοποιώντας τη σχέση:

$$\% H_2O = \frac{H_{H_2O} \times 9,01}{111,14 + H_{H_2O} \times 9,01} \times 100 \% \quad \text{Εξίσωση E.2}$$

Κατά την παραπάνω προσέγγιση έχουν γίνει κάποιες παραδοχές.

1. Κατά την απόδοση κορυφών του πολυμερούς απουσιάζουν οι τελικές ομάδες. Το μεγάλο μήκος της αλυσίδας του PVP καθιστά αμελητέα τη συμμετοχή των τελικών ομάδων στο μοριακό βάρος και στα φάσματα.
2. Προσμίξεις της τάξης του 2 % δεν εμφανίζονται στα φασματικά δεδομένα του συγκεκριμένου πειράματος.
3. Κατά τη διαδικασία ξήρανσης, θεωρείται πως απομακρύνονται από το δείγμα μόνο μόρια νερού, αποδεχόμενοι την απουσία άλλων πτητικών ουσιών.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στον πίνακα E.3.8.

Πίνακας E.3.8. Αποτελέσματα μετρήσεων περιεχόμενης υγρασίας σε δείγματα PVP

α/α	Ολοκλήρωση περιοχής		% υγρασία σύμφωνα με	
	A	B	NMR	Karl Fischer
1	3	6,633	4,88	4,10
2	3	6,531	4,12	3,82
3	3	6,414	3,25	3,16
4	3	6,339	2,68	2,70
5	3	6,363	2,86	2,51
6	3	6,189	1,51	2,37
7	3	6,216	1,73	2,16
8	3	6,144	1,16	2,01
9	3	6,753	5,74	3,97
10	3	7,608	11,54	13,39
11	3	7,356	9,90	8,41
12	3	6,846	6,43	7,53
13	3	6,981	7,37	7,49
14	3	6,687	5,29	6,63
15	3	6,399	3,13	2,58
16	3	7,611	11,54	11,34

Σχόλια-Παρατηρήσεις

Με τα μέχρι στιγμής δεδομένα δεν είναι δυνατή η αιτιολόγηση της θωράκισης του νερού στο PVP3 σε σχέση με τα άλλα δυο. Αυτό όμως που μπορεί να ειπωθεί είναι πως η μεταβολή αυτή στην ηλεκτρονική κατάσταση του νερού στο PVP συνδέεται με κάποιο τρόπο με την εμφάνιση του αγνώστου προϊόντος.

Η περιεχόμενη υγρασία του PVP θα μπορούσε σε κάποιες περιπτώσεις να εκτιμηθεί από το φάσμα $^1\text{H-NMR}$, όμως η επικύρωση της μεθόδου δεν είναι εύκολη.

ΣΤ. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΓΝΩΣΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

Σκοπός του πειράματος είναι να βρεθεί τρόπος απομόνωσης του αγνώστου προϊόντος και πιθανώς λήψης του σε στερεή μορφή με απώτερο στόχο την εφαρμογή φασματοσκοπικών και χρωματογραφικών τεχνικών που αποσαφηνίζουν την δομή μιας ένωσης.

ΣΤ.1. Προσπάθεια παραλαβής με εκχύλιση

Πείραμα 4

Συγκεντρώνονται δέκα δισκία της μικρότερης συγκέντρωσης καρβεδιλόλης ανά δισκίο και κονιοποιούνται σε πορσελάνινο γουδί μέχρι να μετατραπούν σε λεπτόκοκκη σκόνη. Ακολουθεί μεταφορά 100 mg από την σκόνη αυτή σε ογκομετρική φιάλη των 25,0 mL και προστίθενται 20 mL από την κινητή φάση της χρωματογραφικής μεθόδου ΧΜ0 (κεφάλαιο ΙΣΤ). Το διάλυμα αναδεύεται σε μαγνητικό αναδευτήρα για 10 λεπτά μέχρι να σχηματίσει ομογενές εναιώρημα και συμπληρώνεται ο όγκος με τον ίδιο διαλύτη. Το διάλυμα διηθείται από ηθμό πόρων 0,45 μ (acrodisc), οπότε διαχωρίζονται τα αδιάλυτα έκδοχα. Το διήθημα ελέγχεται με τη ΧΜ0 HPLC μέθοδο.

Παρατηρώντας και καταγράφοντας το σήμα του ανιχνευτή, εντοπίζεται ο χρόνος ανάσχεσης και η διάρκεια έκλουσης του αγνώστου προϊόντος. Επαναλαμβάνοντας εισαγωγές από το προηγούμενο διήθημα συλλέγονται από την έξοδο του ανιχνευτή τα κλάσματα του αγνώστου προϊόντος και συγκεντρώνονται σε υάλινο κυλινδρικό περιέκτη όγκου 20 ml, ο οποίος σφραγίζεται (δείγμα Ι).

Στη συνέχεια ελέγχεται η σταθερότητα του αγνώστου προϊόντος στο δείγμα Ι με σκοπό την χρήση του ως διάλυμα εργασίας. Για να απομονωθεί το άγνωστο προϊόν σε στερεή μορφή από το δείγμα Ι, ή ως πολύ πυκνό διάλυμα, προγραμματίζονται τα ακόλουθα πειράματα:

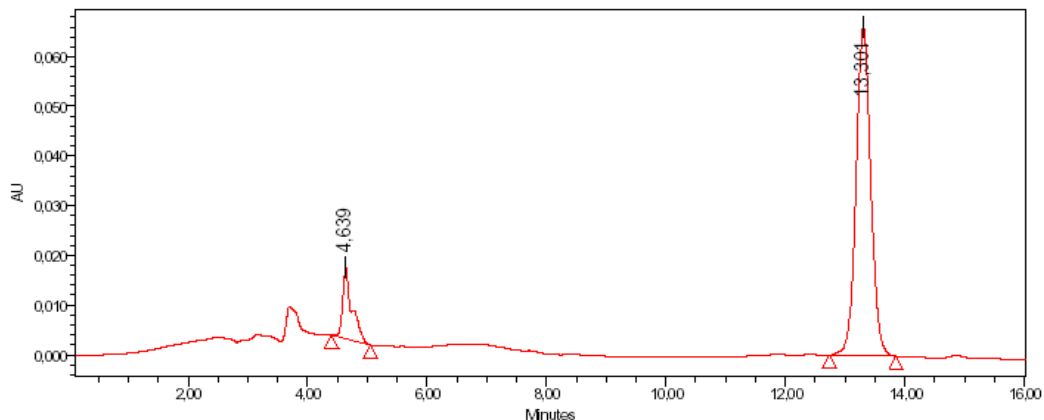
- Διεργασία 1 : εκχύλιση 2 mL του δείγματος I με 2 mL διαιθυλαιθέρα και στη συνέχεια εξάτμιση της οργανικής στοιβάδας σε συσκευή εξάτμισης με περιστρεφόμενη φιάλη σε υποπίεση (rotary).
- Διεργασία 2 : εκχύλιση 2 mL του δείγματος I με 2 mL οξικού αιθυλαιθέρα. Παραλαβή και εξάτμιση της οργανικής στοιβάδας σε ατμόσφαιρα αζώτου
- Διεργασία 3 : συμπύκνωση του δείγματος I ως έχει σε ατμόσφαιρα αζώτου.

Επειδή το άγνωστο προϊόν εμφανίστηκε για πρώτη φορά κατά τον χρωματογραφικό διαχωρισμό του μίγματος που παρασκευάστηκε για τον έλεγχο σταθερότητας των δισκίων του τελικού προϊόντος, η απομόνωσή του γίνεται με τη συλλογή του εκλούσματος της χρωματογραφικής διάταξης, μετά τον ανιχνευτή κατά τη μέθοδο ΧΜ0. Η συλλογή όμως πρέπει να γίνει με τέτοιες συνθήκες ώστε να λαμβάνεται η μεγαλύτερη δυνατή ποσότητα και αυτό απαιτεί χρήση ημιπαρασκευαστικής χρωματογραφίας ΧΜ6. Η ανάπτυξη της μεθόδου ΧΜ6 περιγράφεται στο κεφάλαιο ΙΣΤ.

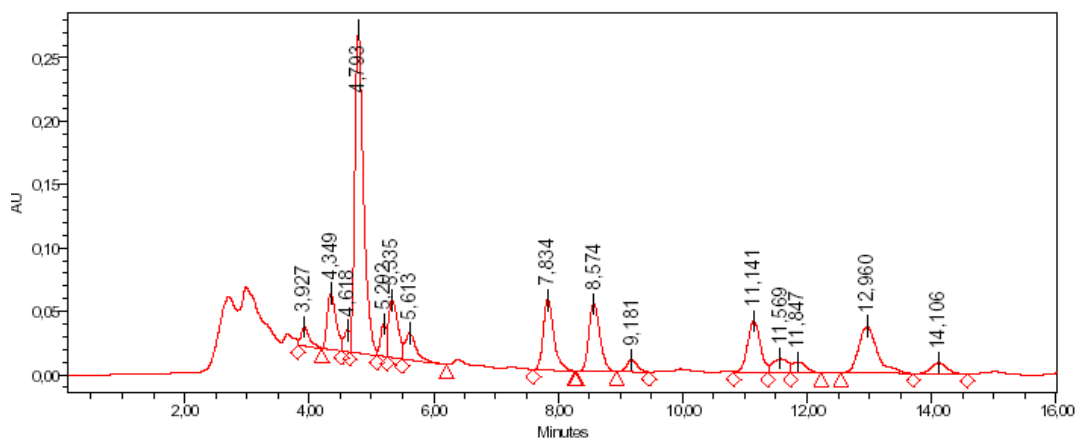
Το έκλουσμα της ημιπαρασκευαστικής χρωματογραφίας συλλέγεται, για χρονικό διάστημα ίσο με το χρωματογραφικό πλάτος της κορυφής και με τέτοιο τρόπο, ώστε να αποκλείεται, στο δείγμα I, η συλλογή οποιασδήποτε άλλης ουσίας. Στο τέλος, το δείγμα I ελέγχεται ποιοτικά ως προς τη σύσταση του με τη χρωματογραφική μέθοδο ΧΜ0.

Αποτελέσματα

Στην περίπτωση της 1^{ης} διεργασίας, εκχύλιση με διαιθυλαιθέρα, το άγνωστο προϊόν δεν ανιχνεύεται χρωματογραφικά. Στα σχήματα ΣΤ.1.1. και ΣΤ.1.2. φαίνεται η σύσταση του διαλύματος πριν και μετά τη διεργασία, όπου το άγνωστο προϊόν είτε δεν έχει παραληφθεί είτε έχει απλώς καταστραφεί.

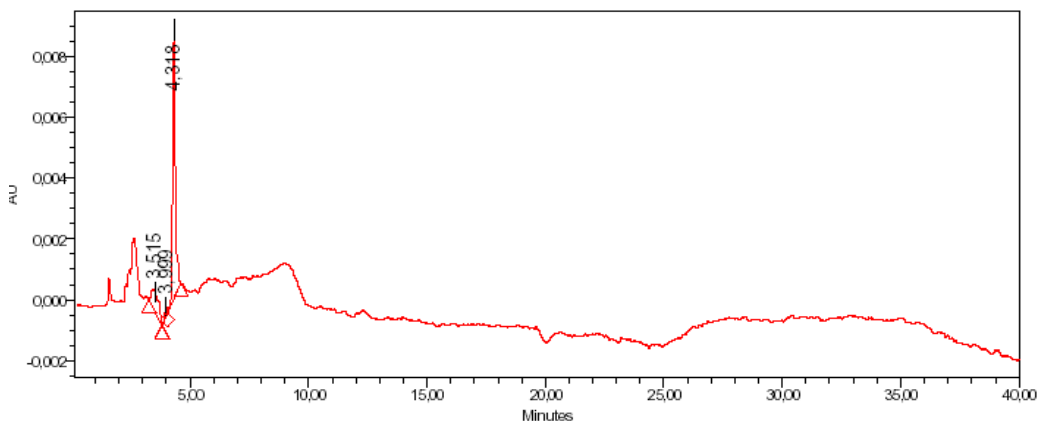


Σχήμα ΣΤ.1.1. Χρωματογράφημα δείγματος Ι πριν την εκτέλεση της 1^{ης} διεργασίας, ΑΠ στα 13,3 min.



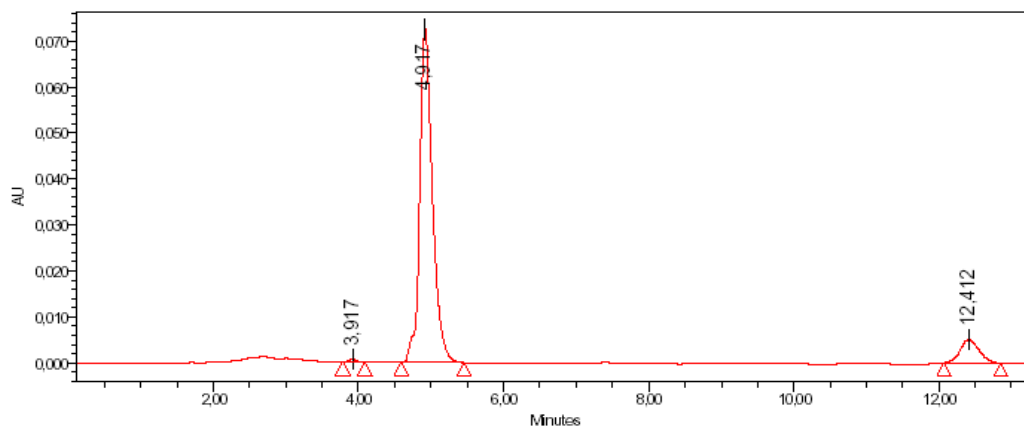
Σχήμα ΣΤ.1.2. Χρωματογράφημα υπολείμματος ξήρανσης οργανικής φάσης μετά την 1^{ης} διεργασία (καρβεδιλόλη στα 4,7 min και άγνωστο προϊόν στα 13,0 min) .

Και στην περίπτωση της δεύτερης διεργασίας το άγνωστο προϊόν δεν ανιχνεύεται χρωματογραφικά. Το χρωματογράφημα του σχήματος ΣΤ.1.3 δείχνει τη μη παραλαβή του αγνώστου προϊόντος στις τελικές συνθήκες.



Σχήμα ΣΤ.1.3. Χρωματογράφημα υπολείμματος ξήρανης οργανικής φάσης μετά την εκχύλιση της 2^{ης} διεργασίας (καρβεδιλόλη στα 4,3 min).

Η 3^η διεργασία αφορά την συμπύκνωση του αρχικού δείγματος. Ενώ η οργανική φάση απομακρύνεται εύκολα, η υδατική παραμένει. Το υδατικό υπόλειμμα τέλος αναλύεται με τη ΧΜ0 και ως αποτέλεσμα παρατηρείται η σημαντική παρουσία της κορυφής της καρβεδιλόλης και η πλήρης απουσία της κορυφής του μελετώμενου αγνώστου προϊόντος. (σχήμα ΣΤ.1.4)



Σχήμα ΣΤ.1.4. Χρωματογράφημα υδατικής φάσης μετά την συμπύκνωση της διεργασίας 3 (καρβεδιλόλη στα 4,9 min και ΑΠ στα 12,4 min)..

Σχόλια

Δεν έγινε δυνατή η παραλαβή του αγνώστου προϊόντος από το δείγμα Ι.

Το «ξηρό» υπόλειμμα που αναφέρεται στη δεύτερη εκχύλιση δεν είναι ορατό με γυμνό μάτι. Η διαδικασία όμως δεν τερματίζεται πριν το χρωματογραφικό έλεγχο διότι είναι πολύ πιθανό η συγκέντρωσή του στο δείγμα I να είναι τόσο μικρή και να μην γίνεται οπτικά αντιληπτή .

Το ακετονιτρίλιο που περιέχεται στο δείγμα I, από την κινητή φάση, και στις δυο περιπτώσεις εκχύλισης μεταφέρεται σχεδόν ποσοτικά στην οργανική στοιβάδα. Ο ισχυρισμός αυτός βασίζεται και στην οπτική παρατήρηση της αύξησης του όγκου της υπερκείμενης οργανικής στοιβάδας σε σχέση με τον προστιθέμενο όγκο του οργανικού διαλύτη. Παράλληλα, η υδατική στοιβάδα αντιστοιχεί περίπου στο μισό του αρχικού όγκου το δείγματος I.

Κατά την εκχύλιση με οξικό αιθυλαιθέρα και συμπύκνωση της οργανικής φάσης είναι φανερό πως η κορυφή του αγνώστου προϊόντος, χάνεται κατά την όλη διαδικασία. Η υδατική στοιβάδα ελέγχεται για την παρουσία αγνώστου προϊόντος στην οποία ανιχνεύεται μια πολύ μικρή ποσότητα. Αυτό μπορεί να σημαίνει είτε πως η ουσία διασπάστηκε και έμεινε μια πολύ μικρή ποσότητα, είτε πως τελικά απομονώθηκε μεν κατά την εκχύλιση αλλά χάθηκε κατά τη συμπύκνωση.

Στην περίπτωση της εκχύλισης με αιθυλαιθέρα τα υπολείμματα της υδατικής στοιβάδας έδωσαν πολύ μικρή κορυφή αγνώστου προϊόντος, τη στιγμή που το αρχικό δείγμα I είχε δώσει σημαντική κορυφή. Το διαλελυμένο (όσο ήταν δυνατό) σε κινητή φάση υπόλειμμα της φιάλης δεν έδωσε ούτε αυτό το ποσό αγνώστου προϊόντος που αρχικά είχε συλλεχθεί. Ο ενδεικτικός έλεγχος μικροποσότητας του εκχυλίσματος μετά τη συμπύκνωσή του, έδωσε κορυφή με το χαρακτηριστικό φάσμα και τον χρόνο ανάλυσης της καρβεδιλόλης χωρίς όμως αυτή να υπάρχει αρχικά στο δείγμα I. Η παρατήρηση αυτή συνδυάζεται πολύ καλά με την υπόθεση πως το άγνωστο προϊόν περιέχει στη δομή του το μόριο της καρβεδιλόλης, το οποίο και αποδίδει στη συνέχεια ανέπαφο, κατά τη συμπύκνωση.

Συμπέρασμα

Όλες οι προηγούμενες προσπάθειες εκχύλισης του αγνώστου προϊόντος και συμπύκνωσης του οργανικού διαλύτη απέτυχαν να αποδώσουν άγνωστο προϊόν, τη στιγμή που η παρουσία του στο αρχικό διάλυμα της κάθε περίπτωσης είναι δεδομένη

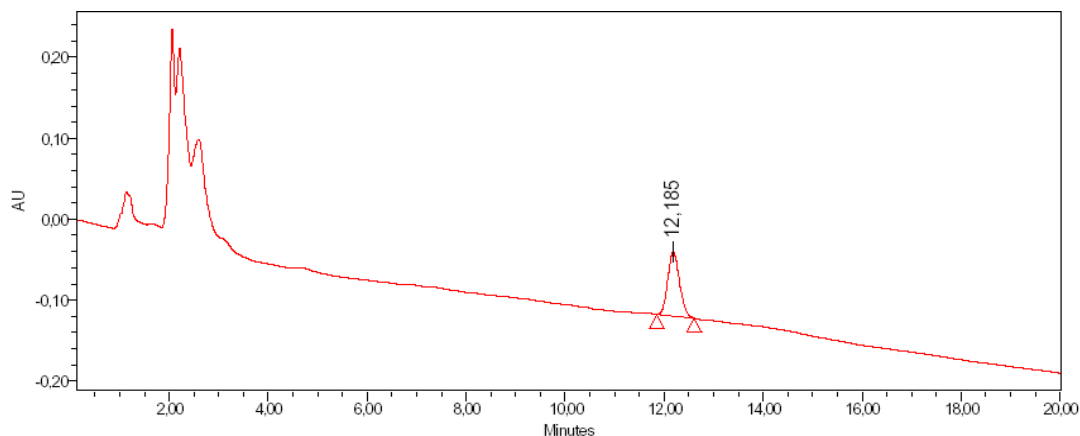
και επιβεβαιωμένη. Η επόμενη προσπάθεια θα πρέπει να είναι η απομόνωση με τεχνική που δεν αλλοιώνει το δείγμα, δηλαδή η εκδίωξη των διαλυτών της κινητής φάσης δίχως καταστροφή του αγνώστου προϊόντος. Ως τέτοια επιλέγεται η λυοφιλοποίηση του συλλεχθέντος κλάσματος.

ΣΤ.2. Προσπάθεια παραλαβής με λυοφιλοποίηση

Πείραμα 5

Συλλέγεται, με τον συνήθη τρόπο από την ημιπαρασκευαστική χρωματογραφική διάταξη το δείγμα I, έκλουσμα αγνώστου προϊόντος, διαλελυμένο σε κινητή φάση.

Το δείγμα I φυλάσσεται προσωρινά σε θερμοκρασία συντήρησης (4 °C) και μετά από παραμονή 24 ωρών, ελέγχεται για την ποιοτική του σύσταση. Διαπιστώνεται από τη χρωματογραφική ανάλυση ότι σε κάθε δείγμα το κύριο συστατικό είναι το άγνωστο προϊόν.



Σχήμα ΣΤ.2.1. Χρωματογράφημα δείγματος I με άγνωστο προϊόν μετά από παραμονή 24 ωρών σε θερμοκρασία συντήρησης (2-4 °C), άγνωστο προϊόν στα 12,2 min.

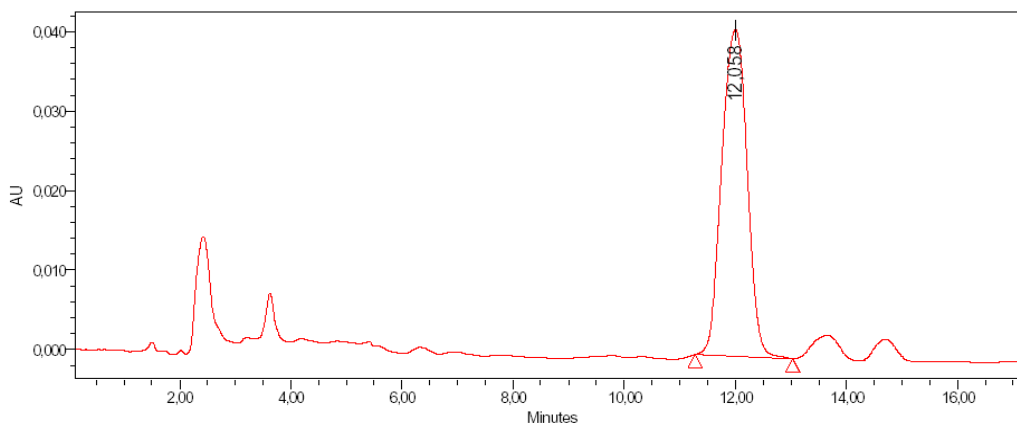
Το δείγμα φυλάσσεται σε κατάψυξη μέχρι να προγραμματιστεί η λυοφιλοποίησή του. Η καθυστέρηση της λυοφιλοποίησης επιτρέπει την παρατήρηση για το δείγμα της κατάψυξης πως διαχωρίζονται οι δυο φάσεις. Ενώ η υδατική στοιβάδα έχει στερεοποιηθεί, η οργανική φάση του ακετονιτριλίου παραμένει σε

υγρή κατάσταση. Πριν την επεξεργασία του δείγματος απομακρύνεται η στοιβάδα του ακετονιτρίλιου και αποθηκεύεται σε διαφορετικό περιέκτη στην ίδια χαμηλή θερμοκρασία (δείγμα II) προτού επανα-υγροποιηθεί η υδατική στοιβάδα.

Το υδατικό διάλυμα λυοφιλοποιείται και το στερεό υπόλειμμα κρατείται για να ελεγχθεί η παρουσία του αγνώστου προϊόντος.

Το λυοφιλοποιημένο υπόλειμμα είναι μια πολύ μικρή ποσότητα και χρησιμοποιείται όλη αρχικά για έλεγχο NMR και στη συνέχεια για χρωματογραφικό έλεγχο. Τα περίπου 8 mg της λυοφιλοποιημένης ποσότητας που ζυγίστηκαν δεν αντιστοιχούν σε ανιχνεύσιμη μάζα αγνώστου προϊόντος, πράγμα που διαπιστώθηκε από την αδυναμία λήψης κάποιου σήματος. Πολύ πιθανό αυτά που ζυγίζονταν να ήταν τα φωσφορικά άλατα του ρυθμιστικού διαλύματος, και πολύ λίγο άγνωστο προϊόν. Η απουσία σήματος για το άγνωστο προϊόν επιβεβαιώθηκε και από τον έλεγχο του δείγματος χρωματογραφικά.

Το άγνωστο προϊόν δεν έχει εμφανιστεί στο δείγμα κατά την απομόνωση της υδατικής φάσης οπότε, πριν την ολοκλήρωση του πειράματος, το φυλαγμένο δείγμα II ελέγχεται χρωματογραφικά. Από το χρωματογράφημα, τα δείγματα αυτά χαρακτηρίζονται ως αποκλειστικά δείγματα αγνώστου προϊόντος.



Σχήμα ΣΤ.2.2. Χρωματογράφημα δείγματος II που δείχνει την διατήρηση του αγνώστου προϊόντος στο ακετονιτρίλιο, μετά το χωρισμό του από την υδατική φάση στο δείγμα I.

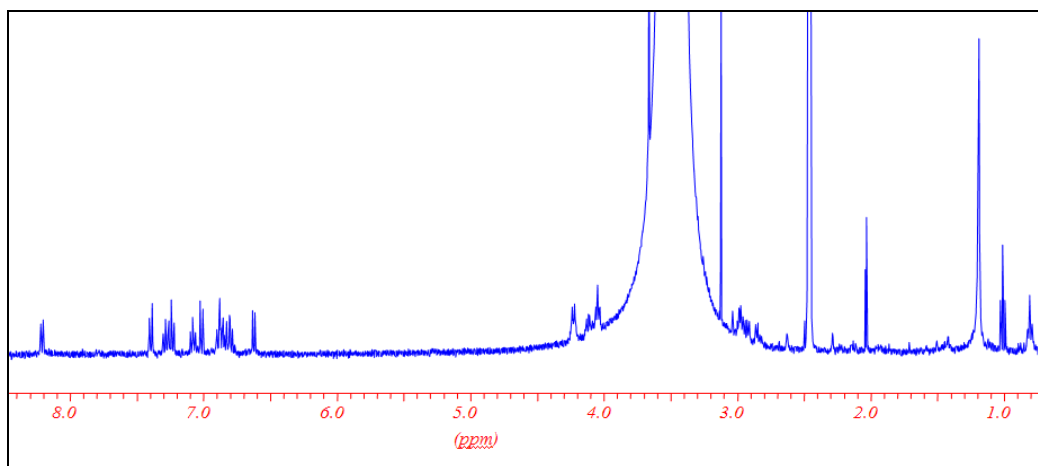
Z. ΠΡΟΣΠΑΘΕΙΕΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΓΝΩΣΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

Z.1. Φασματοσκοπία και φασματομετρία αγνώστου προϊόντος

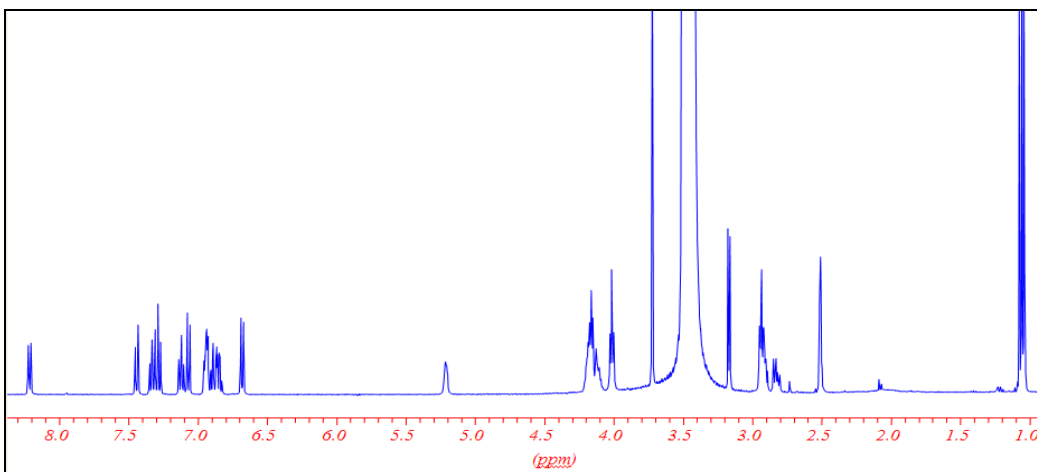
Z.1.1. Μελέτη $^1\text{H-NMR}$

Ποσότητα αγνώστου προϊόντος που έχει απομονωθεί και συμπυκνωθεί μέχρι ξηρού σύμφωνα με την προηγούμενη διαδικασία, διαλύεται σε 700 μL $\text{DMSO-}d_6$ και μεταφέρεται σε σωλήνα κατάλληλο για φασματοσκοπία NMR. Στη συνέχεια λαμβάνεται το φάσμα του και αυτό παρατίθεται στο σχήμα Z.1.1.

Στη συνέχεια, για να διευκολυνθεί η σύγκριση των φασμάτων, καταγράφεται και το φάσμα της καθαρής καρβεδιλόλης, διαλύοντας 7 mg αυτής σε 700 μL $\text{DMSO-}d_6$. Το λαμβανόμενο φάσμα δίδεται στο σχήμα Z.1.2.

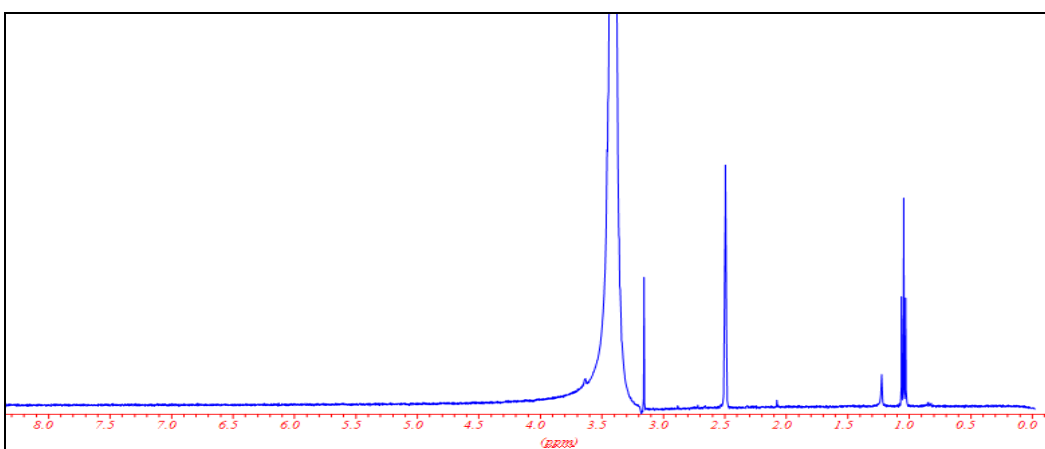


Σχήμα Z.1.1. $^1\text{H-NMR}$ φάσμα του αγνώστου προϊόντος σε $\text{DMSO } d_6$

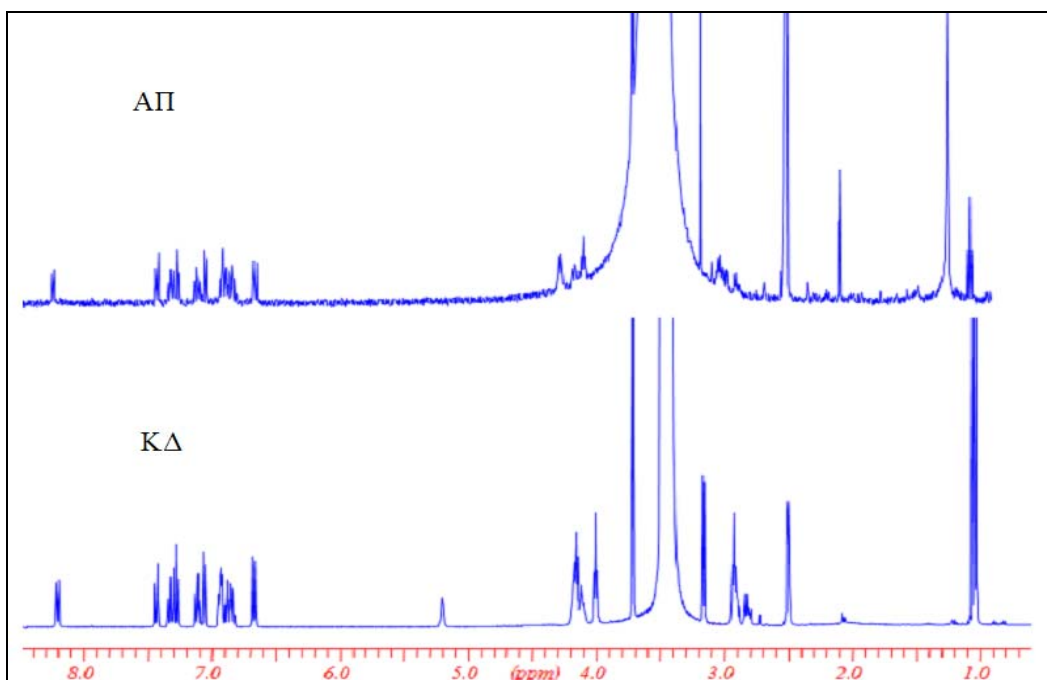


Σχήμα Z.1.2. $^1\text{H-NMR}$ φάσμα της καρβεδιλόλης σε $\text{DMSO-}d_6$ για να συγκριθεί με αυτό του άγνωστου προϊόντος.

Η παρουσία κάποιων έντονων κορυφών στο φάσμα του αγνώστου προϊόντος μπορεί να οφείλονται στα υπολείμματα από την ατελή απομάκρυνση του ακετονιτριλίου. Επίσης η εμφάνιση κάποιων μη ερμηνευμένων κορυφών στο φάσμα της καρβεδιλόλης μπορεί να οφείλονται στο δευτεριωμένο διαλύτη. Για το λόγο αυτό λαμβάνεται και το φάσμα του ακετονιτριλίου με τον ίδιο διαλύτη και οι κορυφές που εμφανίζονται σε αυτό, σχήμα Z.1.3, δεν μελετώνται στα φάσματα των Z.1.1 και Z.1.2.



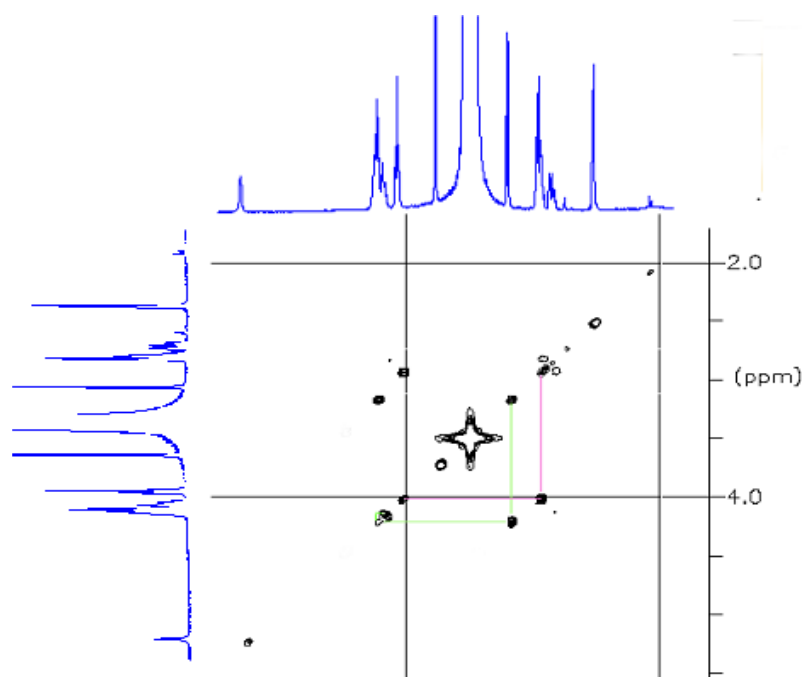
Σχήμα Z.1.3. $^1\text{H-NMR}$ φάσμα του ακετονιτριλίου, με αρκετό νερό, σε $\text{DMSO-}d_6$ για να συγκριθεί με το άγνωστο προϊόν και την καρβεδιλόλη



Σχήμα Z.1.4. Σύγκριση $^1\text{H-NMR}$ φασμάτων της καρβεδιλόλης και του αγνώστου προϊόντος σε $\text{DMSO-}d_6$.

Η σύγκριση του αγνώστου προϊόντος με την καρβεδιλόλη με τη φασματοσκοπία $\text{H}^1\text{-NMR}$ φαίνεται στα σχήματα Z.1.4, Z.1.5, Z.1.6 και συνοψίζεται στον πίνακα Z.1.1. Η αρίθμηση ανθράκων που χρησιμοποιείται για την καρβεδιλόλη είναι αυτή του σχήματος E.1.1 (που επαναλαμβάνεται στον πίνακα Z.1.1.) και τη δανείζεται το άγνωστο προϊόν στα σημεία ομοιότητας.

Σημειώνεται πως η απόδοση των κορυφών της καρβεδιλόλης συμφωνεί και με τη βιβλιογραφία για την περιοχή των αρωματικών^{100 126}. Επειδή όμως υπάρχει μια διαφοροποίηση όσο αφορά στα H-1'' και H-3 , τα οποία είναι αρκετά κοντινά και με παρόμοιο ηλεκτρονικό περιβάλλον, λαμβάνεται το φάσμα πρωτονίων 2 διαστάσεων (COSY) και η περιοχή των αλειφατικών υδρογόνων φαίνεται στο σχήμα Z.1.5. Όπως φαίνεται από αυτό, το H-1'' είναι πιο θωρακισμένο από το H-3 .

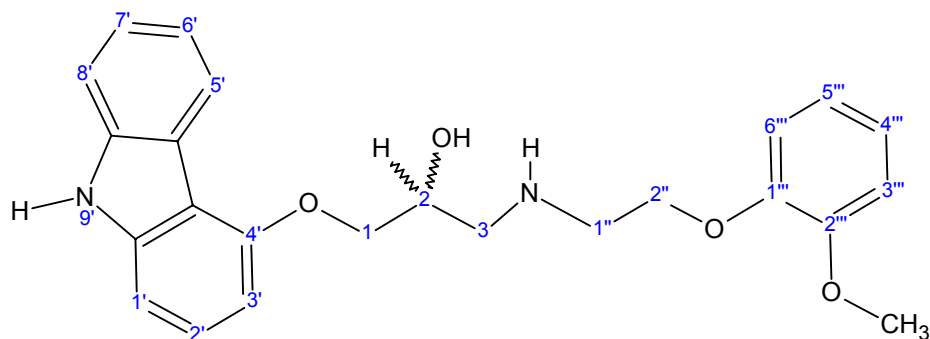


Σχήμα Z.1.5. Τμήμα του ^1H -COSY φάσματος της καρβεδιλόλης, αλειφατικά πρωτόνια, σε NMR DRX400 και με διαλύτη σε $\text{DMSO-}d_6$.

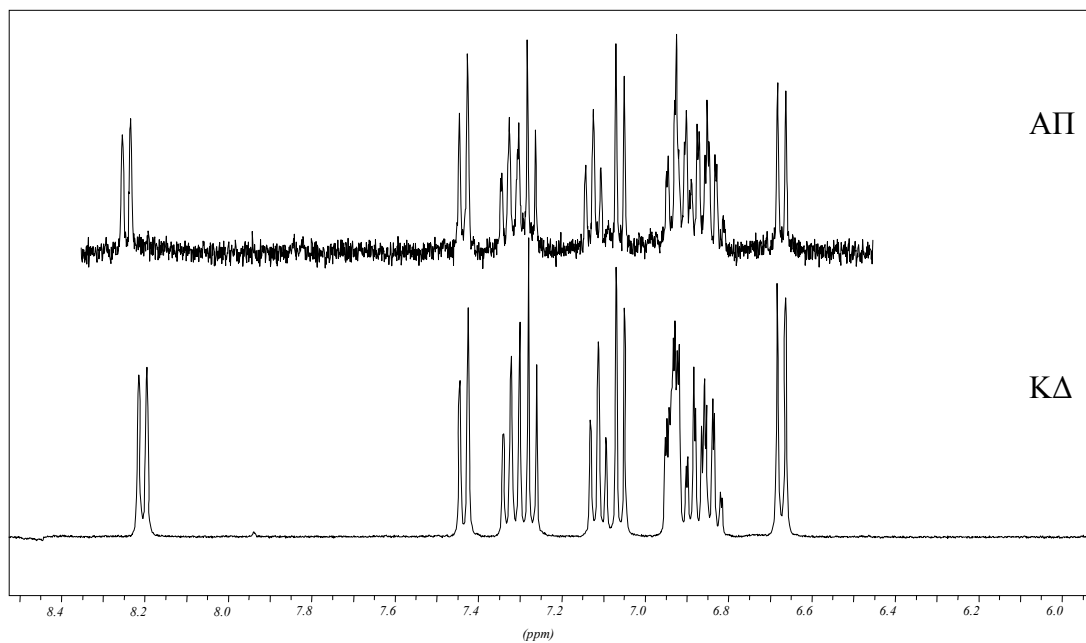
Η μεγέθυνση του φάσματος ^1H -COSY της καρβεδιλόλης στο σχήμα Z.1.5 χρησιμοποιείται για την απόδοση των αλειφατικών πρωτονίων της καρβεδιλόλης.

Στον πίνακα Z.1.1 παρατίθενται οι θεωράσεις των πρωτονίων της καρβεδιλόλης και τα αντίστοιχα αποτελέσματα για το άγνωστο προϊόν, αποτελέσματα που στηρίζονται στις ομοιότητες που προβάλλουν οι αντίστοιχες περιοχές τους στα σχήματα Z.1.6 και Z.1.7.

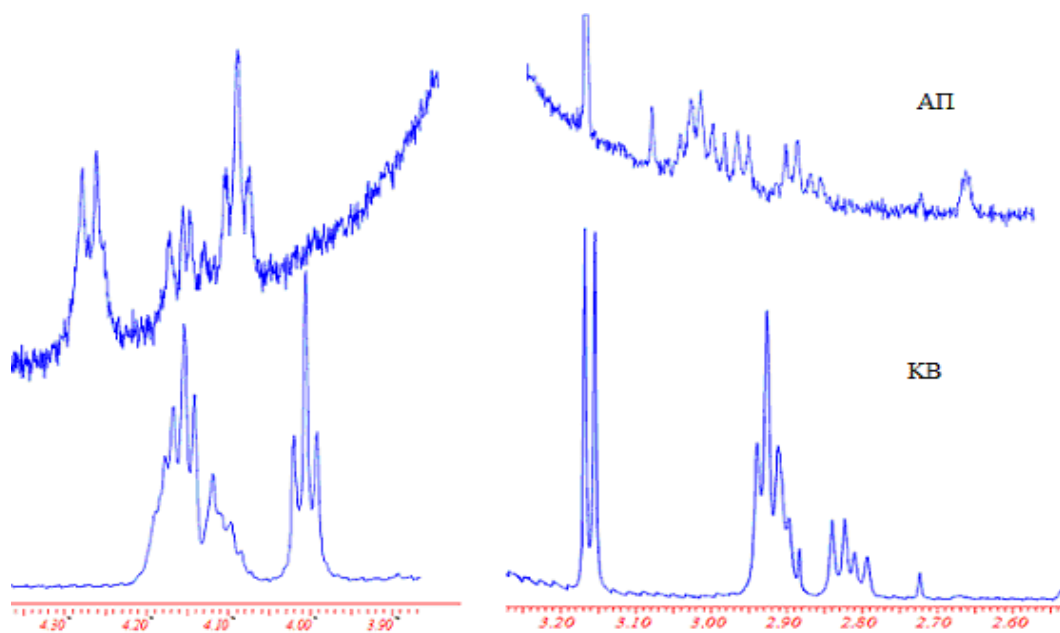
Πίνακας Z.1.1. Απόδοση κορυφών και σύγκριση φασμάτων H^1 -NMR των καρβεδιόλη και αγνώστου προϊόντος σε $DMSO-d_6$.



Αρίθμηση (στη δομή της ΚΔ)	δ (ppm) ΚΔ	δ (ppm) ΑΠ	$\Delta\delta$ (ppm)
5'	8,21 (d)	8,25 (d)	0,04
8'	7,43 (d)	7,43 (d)	-
7'	7,31 (t) [dd]	7,32 (t)	0,01
2'	7,28 (t)	7,28 (t)	-
6'	7,11 (t)	7,12 (t)	0,01
1'	7,06 (d)	7,05 (d)	-0,01
3''' & 6'''	6,93 (m)	6,92 (m)	-0,02
4''' & 5'''	6,86 (m)	6,85 (m)	-0,01
3'	6,67 (d)	6,66 (d)	-0,01
OH	5,20 (d)	-	
1	4,17 (m)	4,27 (d)	0,10
2	4,13 (m)	4,15 (q)	0,02
2''	4,00 (t)	4,09 (t)	0,08
CH3	3,71 (s)	3,70 (s)	-0,01
3	2,92 (m)	3,06 (t)	0,10
1''	2,85 (m)	2,93 (m)	0,08
NH	2,00 (broad)		



Σχήμα Z.1.6. Τμήμα των $^1\text{H-NMR}$ φασμάτων της καρβεδιόλης (KB) και του αγνώστου προϊόντος (ΑΠ) σε $\text{DMSO-}d_6$, στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων.



Σχήμα Z.1.7. Τμήματα των $^1\text{H-NMR}$ φασμάτων της καρβεδιόλης (KB) και του αγνώστου προϊόντος (ΑΠ) σε $\text{DMSO-}d_6$, στην περιοχή των αλειφατικών πρωτονίων.

Παρατηρήσεις - Σχόλια

Η οπτική ομοιότητα των φασμάτων της καρβεδιλόλης και του αγνώστου προϊόντος ενισχύει τη σκέψη πως το τελευταίο περιέχει το πλήρες μόριο της καρβεδιλόλης. Οι χαρακτηριστικές ομοιότητες των αρωματικών πρωτονίων, που βρίσκονται στα άκρα του μορίου της και η μικρή μεταβολή των χημικών μετατοπίσεων, αποτελούν ισχυρή ένδειξη πως το μόριο της καρβεδιλόλης είναι σχεδόν ακέραιο και στο άγνωστο προϊόν.

Η παρατήρηση πως τα αλειφατικά υδρογόνα γειτονικά στο υδροξύλιο, H-1 και H-3 παρουσιάζουν την ίδια σημαντική αποθωράκιση, μεταφράζεται σε δομική αλλαγή στο μόριο της καρβεδιλόλης. Το ηλεκτρονικό τους περιβάλλον έχει αλλάξει πιθανότατα εξαιτίας της παρουσίας κάποιας άλλης ομάδας.

Επίσης στο φάσμα του αγνώστου προϊόντος δεν ανιχνεύεται η κορυφή του πρωτονίου της αμινομάδας. Δεν μπορούμε να ισχυριστούμε πως και το πρωτόνιο αυτό απουσιάζει από το μόριο. Στο δείγμα της καρβεδιλόλης η κορυφή αυτή είναι αρκετά ασθενής και ευκίνητη, οπότε στην περίπτωση του αγνώστου προϊόντος που όλα τα σήματα της καρβεδιλόλης είναι αρκετά ασθενή μειώνονται οι πιθανότητες να παρατηρηθεί.

Η δεύτερη μεγάλη μετατόπιση, αποθωράκιση, στο φάσμα του αγνώστου προϊόντος παρατηρείται για τα H-1'' και H-2''. Αυτό ενισχύει την υπόθεση πως κάποια μετατροπή έχει συμβεί στην περιοχή της αλειφατικής αλυσίδας της καρβεδιλόλης που αποθωρακίζει τα πρωτόνια.

Μια τελευταία ένδειξη για τις αλλαγές της περιοχής των αλειφατικών πρωτονίων έρχεται από τα αρωματικά υδρογόνα. Το H-5', είναι το μόνο αρωματικό υδρογόνο που μπορεί να επηρεαστεί από τη δομή της αλειφατικής αλυσίδας λόγω της μικρής απόστασης που έχει στο χώρο από αυτή, εάν μελετήσουμε τις δομές που προκύπτουν από υπολογιστικά προγράμματα για την καρβεδιλόλη, πρωτονιωμένης και μη, σε κενό ή σε νερό¹²⁷.

Όπως προαναφέρθηκε, τα αρωματικά πρωτόνια της καρβεδιλόλης και του αγνώστου προϊόντος έχουν χαρακτηριστική ομοιότητα, παρόλο που η συγκέντρωση των δυο ουσιών δεν είναι η ίδια. Η διαφορά αυτή των συγκεντρώσεων δεν μπορεί να

δικαιολογήσει τη μικρή αλλαγή των 3'' και 6'' πρωτονίων της καρβεδιλόλης στο φάσμα του αγνώστου προϊόντος. Η δομή του αγνώστου προϊόντος πρέπει να είναι πιο σταθερή και πιο άκαμπτη από την καρβεδιλόλη, για να επιτευχθεί η σταθεροποίηση των πρωτονίων και να ξεχωρίσουν οι αντίστοιχες κορυφές.

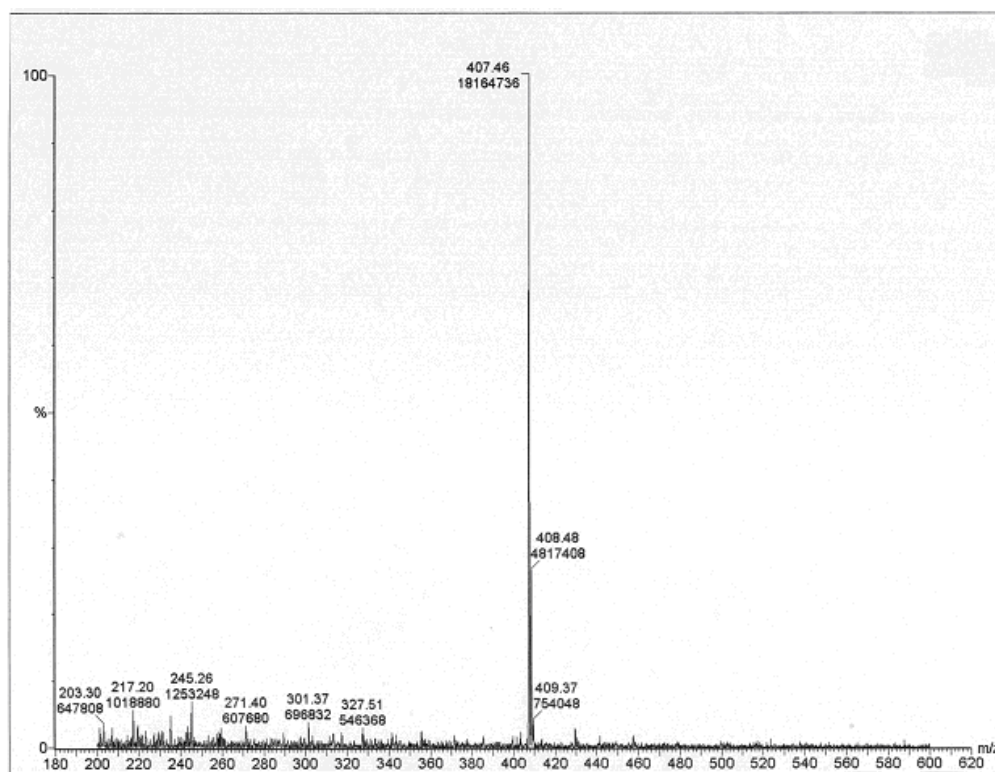
Μια τελευταία σημαντική παρατήρηση που αφορά στα δυο φάσματα, αλλά όχι στα πρωτόνια τους είναι το γεγονός πως η παρουσία της κορυφής του νερού είναι πολύ σημαντική στο άγνωστο προϊόν, σε σημείο που δυσκολεύει την ολοκλήρωση των αλειφατικών πρωτονίων που υπάρχουν κοντά του. Ως αίτιο μπορεί να θεωρηθεί η ατελής απομάκρυνση του νερού κατά την ξήρανση σε ατμόσφαιρα αζώτου, κατά την απομόνωση του αγνώστου προϊόντος.

Z.1.2. Μελέτη του δείγματος του απομονωμένου αγνώστου προϊόντος I με φασματομετρία μάζας

Πείραμα 7

Ποσότητα του αγνώστου προϊόντος που έχει απομονωθεί με τον τρόπο που έχει περιγραφεί στην παράγραφο E.3 χρησιμοποιείται για να εκτιμηθεί το μοριακό του βάρος. Το άγνωστο προϊόν στην περίπτωση αυτή είναι διαλελυμένο σε ακετονιτρίλιο και είναι απαλλαγμένο από την υδατική φάση και τα φωσφορικά ιόντα, άρα μπορεί να εισαχθεί σε φασματόμετρο μαζών. Μη γνωρίζοντας τη μορφή του αγνώστου προϊόντος αλλά επιθυμώντας την ιονισμένη κατάσταση (βάση του τρόπου λειτουργίας του φασματογράφου μάζας) επιδιώκεται ο ελαφρύς ιονισμός του πριν τη μέτρηση. Αυτό επιτυγχάνεται με διάλυμα μυρμηκικού οξέος 0,1 % (v/v).

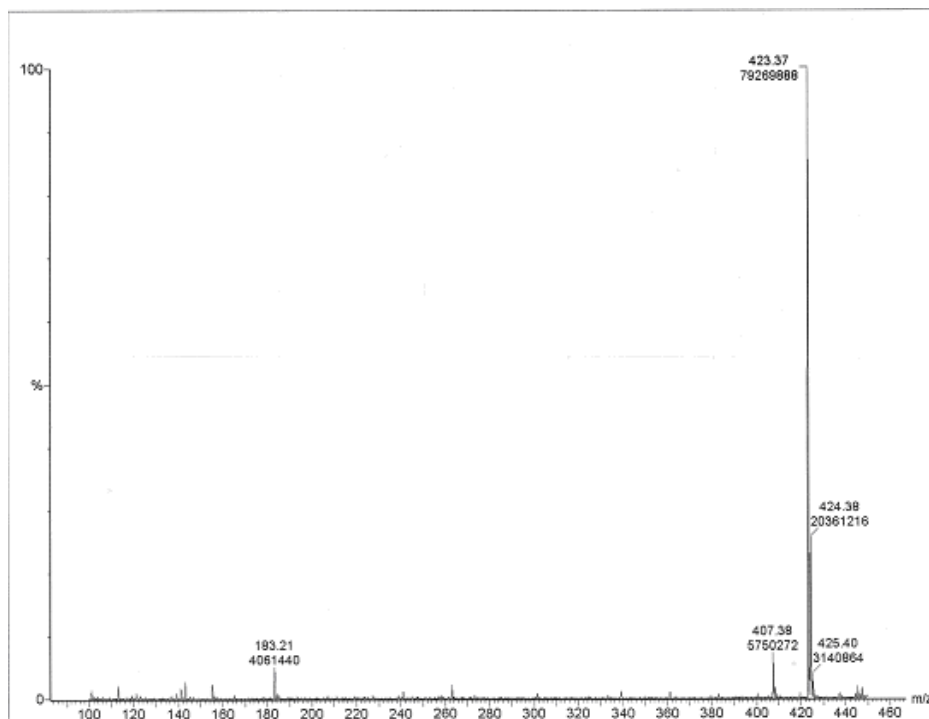
Παρασκευάζεται διάλυμα καρβεδιλόλης σε ακετονιτρίλιο 0,25 M και σε 1,0 mL αυτού προστίθεται 1,0 mL διαλύματος μυρμηκικού οξέος 0,1 % (v/v). Το διάλυμα εισάγεται στον φασματόμετρο μαζών και λαμβάνεται το φάσμα του σχήματος Z.1.6.



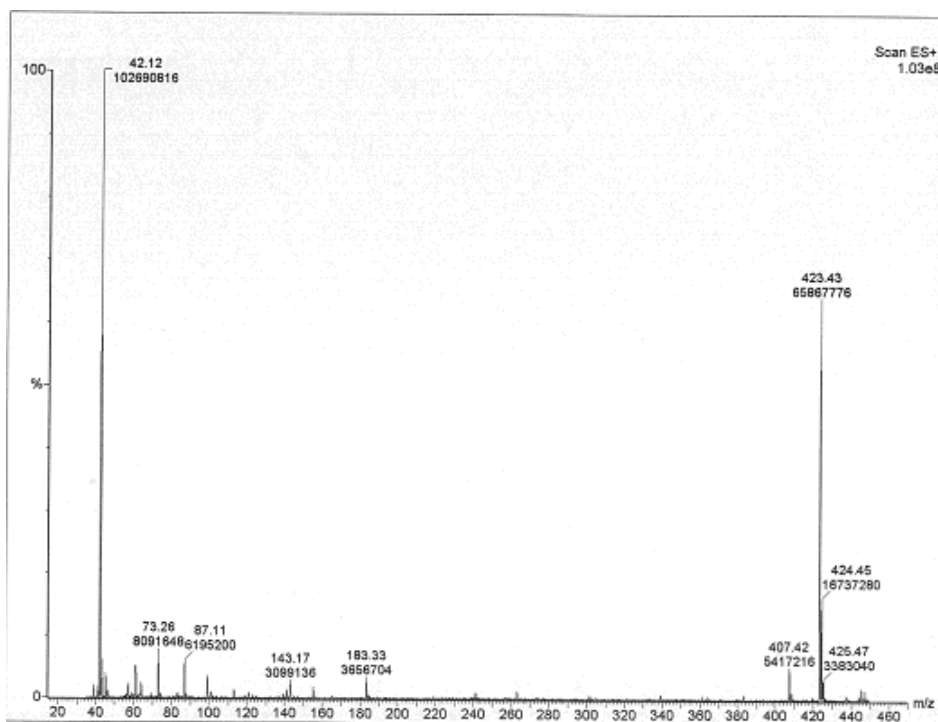
Σχήμα Z.1.6. Φάσμα μάζας καρβεδιλόλης σε ακετονιτρίλιο και οξιμισμένο με 0,1 % μυρμηκικό οξύ (200-600 m/z)

Η κύρια λοιπόν μάζα για την καρβεδιλόλη είναι αυτή που πραγματικά αναμένεται. Το μοριακό της βάρος είναι 406,5 ενώ λόγω της ιονισμένης κατάστασης στην οποία γίνεται η μέτρηση, η λαμβανόμενη τιμή είναι αυξημένη κατά τη μάζα ενός υδρογόνου, δηλαδή 407,5 m/z.

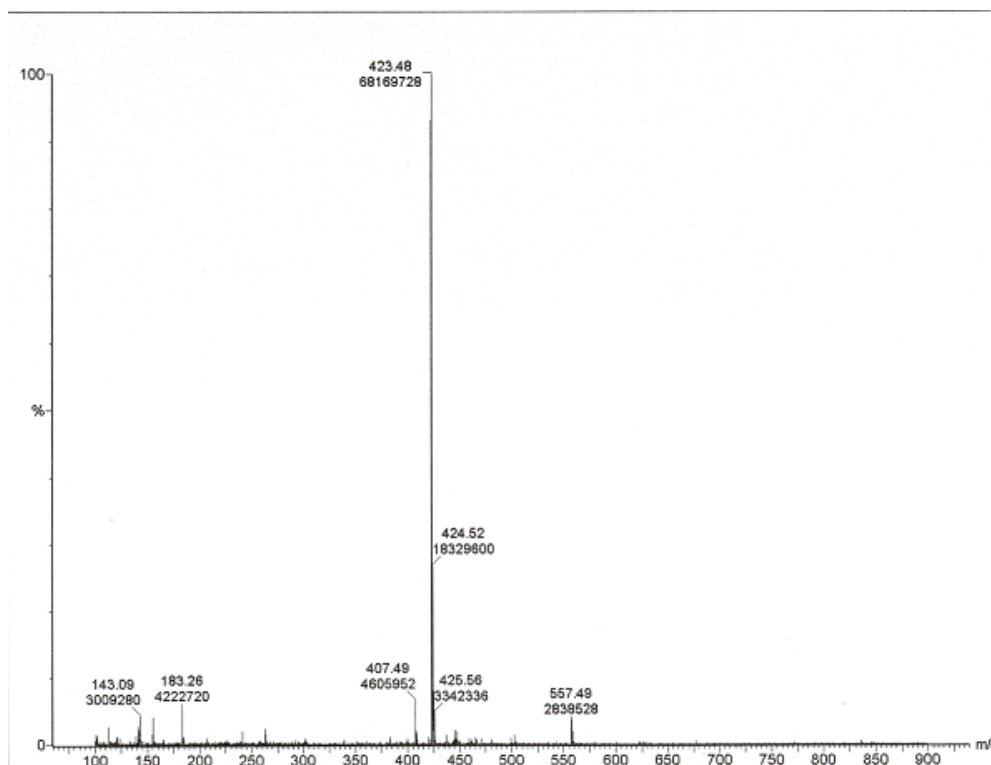
Σε 500 μL διαλύματος αγνώστου προϊόντος με ακετονιτρίλιο ως διαλύτη, προστίθενται 500 μL μυρμηκικού και εισάγεται στο φασματόμετρο. Η εισαγωγή επαναλαμβάνεται άλλες δυο φορές με σκοπό την καταγραφή διαφορετικών περιοχών μαζών κάθε φορά. Τα φάσματα που λαμβάνονται δίνονται στα σχήματα Z.1.9-11.



Σχήμα Z.1.9. Φάσμα μάζας αγνώστου προϊόντος σε ακετονιτρίλιο, οξινισμένο με 0,1 % μυρμηκικό οξύ (100-450 m/z)



Σχήμα Z.1.10. Φάσμα μάζας αγνώστου προϊόντος σε ακετονιτρίλιο, οξινισμένο με 0,1 % μυρμηκικό οξύ (35-450 m/z)



Σχήμα Z.1.11. Φάσμα μάζας αγνώστου προϊόντος σε ακετονιτρίλιο, οξιμισμένο με 0,1 % μυρμηκικό οξύ (100-900 m/z)

Η μάζα που μπορεί να αντιστοιχηθεί στο άγνωστο προϊόν είναι 423,5 m/z και αποτελεί τη μοναδική τιμή στις μικρές μάζες (μέχρι 900 m/z). Επειδή το φασματόμετρο που χρησιμοποιήθηκε δεν έχει τη δυνατότητα να μετρήσει μεγαλύτερες μάζες, από το σημείο αυτό η μάζα του αγνώστου προϊόντος θα θεωρείται πως στην περιοχή 1-900 m/z και σε ελαφρά όξινο περιβάλλον θα είναι 423,5 m/z. Με μια πρώτη μα πρόχειρη σύγκριση θα μπορούσαμε να αντιστοιχίσουμε τη μάζα αυτή σε ένα μόριο καρβεδιλόλης με αυξημένη τη μάζα της κατά 16 m/z μονάδες.

Μη γνωρίζοντας όμως την ακριβή δομή του, δεν μπορούμε να ισχυριστούμε έτσι απλά πως αυτή η μετρούμενη τιμή αντιστοιχεί σε ιονισμένη κατάσταση ούτε να δεχτούμε πως η πραγματική δομή του αγνώστου προϊόντος έχει μοριακό βάρος 422,5. Έτσι κάθε φορά που θα αναφέρουμε τη μάζα 423,5 m/z, θα εννοούμε την εμφανιζόμενη μάζα στην περιοχή 1-900 m/z και σε ελαφρά όξινο περιβάλλον.

Σχόλια φασμάτων μάζας

Το μόνο συμπέρασμα που μπορεί να εξαχθεί με αξιοπιστία από τα παραπάνω φάσματα είναι πως το άγνωστο προϊόν δεν μπορεί να είναι απλά θραύσμα της καρβεδιλόλης, καθότι η μετρούμενη μάζα του είναι μεγαλύτερη. Μπορεί είτε να είναι θραύσμα που όμως έχει δεχθεί ένα επιπλέον τμήμα μεγαλώνοντας το μοριακό του βάρος, είτε ένα μόριο καρβεδιλόλης προσανυξημένο με κάποια μάζα που στις συνθήκες του πειράματος δίνει κάτι που αυξάνει τη μάζα της καρβεδιλόλης κατά 16 m/z, είτε κάποιο μόριο πολύ μεγαλύτερο (ίσως με μάζα μεγαλύτερη του 1000) που ιονίζεται πολύ εύκολα σε περισσότερες από μια ιονίσιμες ομάδες δίνοντας κατά την ανίχνευσή του λόγο μάζας / φορτίο ίσο με 423,5 m/z.

Z.2. Προσπάθεια απομάκρυνσης αλάτων από το έκλουσμα αγνώστου προϊόντος

Τα φωσφορικά άλατα που χρησιμοποιούνται στο ρυθμιστικό διάλυμα της κινητής φάσης δεν είναι συμβατά με το φασματόμετρο μαζών, οπότε για να ληφθεί το φάσμα μάζας του αγνώστου προϊόντος πρέπει στο έκλουσμα να μην υπάρχουν φωσφορικά.

Πείραμα 8

Για να αποφευχθεί η διαδικασία ψύξης και για το διαχωρισμό της οργανικής στοιβάδας, τροποποιείται η κινητή φάση στη χρωματογραφική μέθοδο ΧΜ0. Αντί για ρυθμιστικό διάλυμα, χρησιμοποιείται υπερκάθαρο νερό χρωματογραφίας, ενώ η αναλογία του ακετονιτριλίου παραμένει σταθερή.

Σχόλια-Παρατηρήσεις

Η προσπάθεια αυτή απομόνωσης δεν ήταν επιτυχής, διότι ενώ το άγνωστο προϊόν έβγαине στον αναμενόμενο, βάσει των συνθηκών στη χρωματογραφική μέθοδο ΧΜ0, χρόνο ανάσχεσης, η καρβεδιλόλη αποκτά χρόνο ανάσχεσης περίπου 10 φορές μεγαλύτερο. Σημειώνεται πως η χρωματογραφία στη μέθοδο ΧΜ0 είναι αντίστροφης φάσης, η στατική φάση είναι C18, αρκετά άπολη, και η κινητή φάση μίγμα ακετονιτριλίου και ρυθμιστικού φωσφορικών σε σχετικά όξινο pH (3,8).

Συμπεράσματα

Το γεγονός πως το άγνωστο προϊόν δεν μεταβάλλει το χρόνο ανάσχεσής του κατά την αντικατάσταση του ρυθμιστικού διαλύματος στην κινητή φάση με υπερκάθαρο νερό, αποκαλύπτει σε ένα βαθμό το είδος των αλληλεπιδράσεών του με τη στατική φάση, καθώς και τη συμπεριφορά του στην κινητή φάση.

Γνωρίζοντας την άπολη φύση της στατικής φάσης και τις αρχές του χρωματογραφικού διαχωρισμού μπορούμε να ερμηνεύσουμε την αλλαγή στην έκλουση της καρβεδιλόλης. Στη μέθοδο ΧΜ0 η καρβεδιλόλη εκλύεται στα 4,5 min ενώ το άγνωστο προϊόν στα 12,5 min. Το γεγονός της μεγάλης διαφοράς στην έκλουση των δυο ουσιών μπορεί να ερμηνευθεί με διαφορετικής ισχύος αλληλεπιδράσεις με τη στατική φάση. Γνωρίζοντας από τη βιβλιογραφία το pK_a του αζώτου της αλειφατικής αλυσίδας, γίνεται αντιληπτό πως σε τιμές pH μικρότερες του 8, όπως στη χρωματογραφική μέθοδο ΧΜ0, το μόριο της καρβεδιλόλης είναι ιονισμένο. Στην ιονισμένη αυτή κατάσταση, η έντονη πολικότητα της καρβεδιλόλης έρχεται σε αντίθεση με την άπολη φύση των υδρόφοβων ομάδων της στατικής φάσης. Τα πολικά μόρια της καρβεδιλόλης δεν αλληλεπιδρούν έντονα με τη στατική φάση και ως αποτέλεσμα εκλούνται σε σύντομο χρονικό διάστημα. Σε αντίθεση με την καρβεδιλόλη, το άγνωστο προϊόν εκλύεται σε τριπλάσιο σχεδόν χρόνο που αποκαλύπτει μεγαλύτερη συγγένεια της ουσίας με την στατική φάση. Η μικρότερη πολικότητα του αγνώστου προϊόντος σε σχέση με την καρβεδιλόλη έρχεται σε συμφωνία με τις ενδείξεις των φασμάτων NMR, όπου η αλειφατική περιοχή του αζώτου έχει υποστεί έντονες αλλαγές, σημαντικές αποθωρακίσεις πρωτονίων σε σχέση με τα πρωτόνια της καρβεδιλόλης.

Η σημαντική αύξηση του χρόνου ανάσχεσης της καρβεδιλόλης όταν απουσιάζουν τα άλατα από την κινητή φάση θα μπορούσε να αποδοθεί στον ελάχιστο ιονισμό της και κατά συνέπεια στην ενίσχυση των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με την στατική φάση. Πιθανότερη είναι η μείωση της διαλυτότητάς της, είναι πρακτικά αδιάλυτη σε νερό και η διαλυτότητά της είναι μέγιστη σε HCl 0,01 N και pH 3,5, με αποτέλεσμα να παρασύρεται δύσκολα από την κινητή φάση. Το αποτέλεσμα είναι η καρβεδιλόλη να μην εκλύεται σε μικρό

χρονικό διάστημα από την ρέουσα κινητή φάση και να κατακρατείται περισσότερο με τις ελεύθερες σιλανόλες της στατικής φάσης.

Σε αντίθεση με την καρβεδιλόλη, το άγνωστο προϊόν δεν επηρεάζεται από την απουσία των ιόντων από την κινητή φάση. Κρατώντας στην κινητή φάση την αναλογία οργανικής και υδατικής σταθερή, ο χρόνος έκλουσής του δεν μεταβάλλεται και αποκαλύπτεται έτσι η απουσία ιοντικών αλληλεπιδράσεών του με τη στατική φάση, είτε διότι δεν υπάρχουν κέντρα ιονισμού είτε διότι αυτά έχουν με κάποιο τρόπο απενεργοποιηθεί. Η διαπίστωση αυτή έρχεται και σε συμφωνία με τις ενδείξεις του NMR φάσματος.

Z.3. Σχολιασμός πολικότητας αγνώστου προϊόντος σε σχέση με την καρβεδιλόλη

Ο σχολιασμός για την πολικότητα του αγνώστου προϊόντος αποτελεί ανακεφαλαίωση και περαιτέρω σκέψεις των μέχρι στιγμής πειραματικών δεδομένων και προσπαθειών απομόνωσής του.

- Στη χρωματογραφική μέθοδο ΧΜ0, το άγνωστο προϊόν έχει σχετικό χρόνο έκλουσης ως προς την καρβεδιλόλη 2,3. Γνωρίζοντας τη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης και για άπολη στατική φάση την αντιστοίχιση του μεγάλου χρόνου έκλουσης με τη μειωμένη πολικότητα, η καρβεδιλόλη χαρακτηρίζεται ως περισσότερο πολική του αγνώστου προϊόντος ή καλύτερα το άγνωστο προϊόν ως λιγότερο πολικό της καρβεδιλόλης.
- Στη διαδικασία απομόνωσης του αγνώστου προϊόντος από την κινητή φάση της μεθόδου ΧΜ0 και μετά την κατάψυξη του συλλεγμένου δείγματος, το άγνωστο προϊόν εντοπίζεται στην οργανική στοιβάδα, με μερικά μικρά υπολείμματα καρβεδιλόλης στην στερεοποιημένη υδατική φάση. Επίσης το άγνωστο προϊόν χαρακτηρίζεται από σταθερότητα στην οργανική φάση του ακετονιτριλίου. Το γεγονός πως το άγνωστο προϊόν κατανέμεται περισσότερο στην οργανική φάση του ακετονιτριλίου σε σχέση με την υδατική στοιβάδα, σε συνδυασμό με την σταθερότητά του σε αυτήν, ενισχύουν τον ισχυρισμό για αυξημένη λιποφιλία ως αποτέλεσμα της μειωμένης πολικότητάς του.

- Κατά την προσπάθεια απομάκρυνσης των φωσφορικών αλάτων της κινητής φάσης (χρήση μόνο υπερκαθαρού νερού για χρωματογραφία), παρατηρήθηκε μια σημαντική διαφοροποίηση στον χρόνο ανάλυσης της καρβεδιλόλης αλλά όχι του αγνώστου προϊόντος. Ο χρόνος ανάλυσης του αγνώστου προϊόντος δεν άλλαξε σε σχέση με την μέθοδο ΧΜ0 αλλά ο χρόνος της καρβεδιλόλης αυξήθηκε. Αυτό είναι μια ακόμα ένδειξη ότι η άγνωστη ουσία διαφέρει στην πολικότητα από την καρβεδιλόλη και στην αλληλεπίδραση με το υδρόφοβο υλικό πλήρωσης των C18 στηλών.
- Στην περίπτωση του υπερκαθαρού νερού (HPLC Plus) είναι σημαντική η προσέγγιση της ιονικής του ισχύος ως *απουσία ιόντων* παρά ως *ουδέτερο pH*. Τα ιόντα που απουσιάζουν από το νερό αλλά βρίσκονται σε αφθονία στο ρυθμιστικό διάλυμα της μεθόδου ΧΜ0, δεν μπορούν παρά να βοηθούν την έκλυση της καρβεδιλόλης από τη στατική φάση. Στον ισχυρισμό αυτό βοηθάει η γνώση της δομής της καρβεδιλόλης και η αναγνώριση των κέντρων ιονισμού της, που στην περίπτωση του αγνώστου προϊόντος ή δεν υπάρχουν ή παρεμποδίζονται έντονα από τις επιδράσεις του περιβάλλοντος.

Φαίνεται πως σε pH 6,5-7 που είναι το pH του νερού η καρβεδιλόλη ιονίζεται και μεταβάλλεται η συμπεριφορά της ενώ το άγνωστο προϊόν είναι μη ιονισμένο για κάποιο λόγο.

Z.4. Επίδραση του pH του διαλύματος παραμονής στο άγνωστο προϊόν

Γνωρίζοντας την αστάθεια του αγνώστου προϊόντος σε θερμοκρασία δωματίου, τόσο σε υδατικό περιβάλλον, πείραμα 9, όσο και στο ρυθμιστικό διάλυμα του δείγματος I, πραγματοποιείται έλεγχος της σταθερότητάς του σε 3 ενδεικτικές περιπτώσεις: σε όξινο, ουδέτερο και αλκαλικό περιβάλλον.

Πείραμα 9

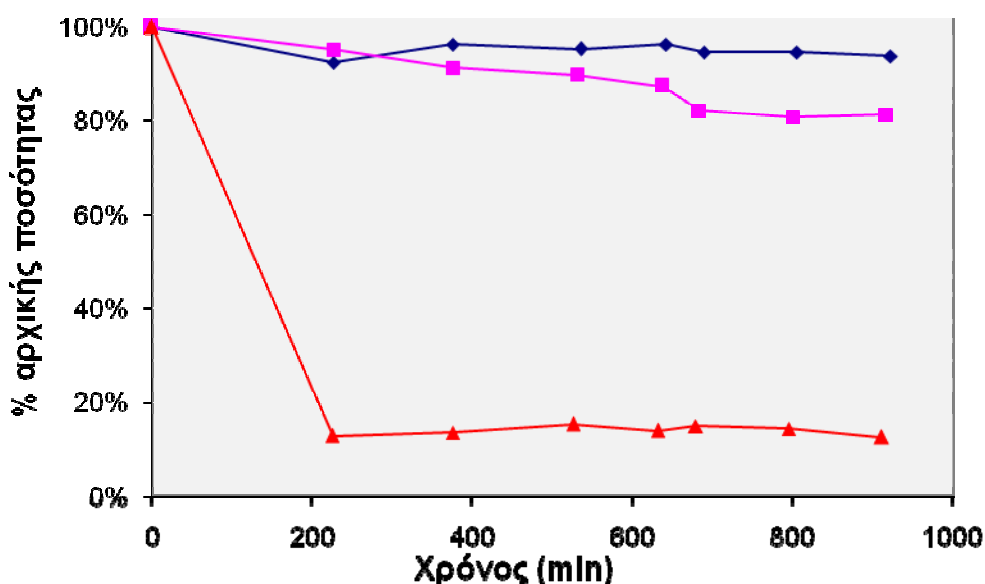
Παρασκευάζονται τρία διαλύματα με νερό χρωματογραφικής καθαρότητας τα οποία ρυθμίζονται σε pH 3,0, 7,3 και 11,0 με διαλύματα HCl 0,1 M και NaOH 0,1 M. Σημειώνεται πως στο όξινο διάλυμα δεν έχει προστεθεί NaOH ούτε στο

αλκαλικό HCl. Το pH 7,3 όμως παρασκευάστηκε χρησιμοποιώντας και τα 2 διαλύματα αραιών ηλεκτρολυτών.

Από το κάθε διάλυμα των προηγούμενων ρυθμίσεων pH, 1200 μ L μεταφέρονται σε τρία χρωματογραφικά φιαλίδια και προστίθενται στο κάθε ένα 300 μ L από το δείγμα II, διάλυμα αγνώστου προϊόντος σε ακετονιτρίλιο.

Τα φιαλίδια αυτά μεταφέρονται σε χρωματογραφική διάταξη με αυτόματο δειγματολήπτη και αναλύονται με τη μέθοδο ΧΜ0. Για 15 ώρες εισάγονται επαναλήψιμοι όγκοι από το κάθε δείγμα και καταγράφονται τα χρωματογραφήματα.

Το εμβαδό της κορυφής του ανακτώμενου αγνώστου προϊόντος σε κάθε περίπτωση καταχωρείται ανά pH προστιθέμενου διαλύματος και σε σχέση με το χρόνο παραμονής του δείγματος (σε λεπτά, min). Τα συνολικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα Z.4.1. το οποίο οπτικοποιεί πολύ καλά τη σταθερότητα του αγνώστου προϊόντος σε διαφορετικά pH.



Σχήμα Z.4.1. Γραφική απεικόνιση του αγνώστου προϊόντος σε διαλύματα διαφορετικού pH ως προς τον χρόνο παραμονής του, εκφρασμένα ως % αρχικής ποσότητας, pH : 3,0 (◆), 7,3 (■), 11,0 (▲).

Αποτελέσματα

Η σταθερότητα του αγνώστου προϊόντος στα τρία διαφορετικά pH είναι ιδιαίτερος αποκαλυπτική στο σχήμα Z.4.1 και αρκετά ενδιαφέρουσα.

Στην περίπτωση προσθήκης σχετικά όξινου διαλύματος, pH 3,0, το άγνωστο προϊόν παραμένει σχεδόν σταθερό για το διάστημα των 900 λεπτών (~15 ώρες), ίσως παρουσιάζοντας όμως μια πολύ μικρή τάση να διασπαστεί. Η τελευταία όμως υπόθεση θα μπορούσε να τεκμηριωθεί μόνο εάν παρατηρηθεί με περαιτέρω μείωση του αγνώστου προϊόντος σε πιθανή παράταση του χρόνου του πειράματος.

Η τάση διάσπασης αυτή είναι πιο εμφανής στο διάλυμα pH 7,3, σχετικά ουδέτερο περιβάλλον, που μέσα στο ίδιο χρονικό διάστημα το άγνωστο προϊόν έχει ελαττωθεί στο 80 %.

Διαφορετική είναι η περίπτωση του αγνώστου προϊόντος όταν επιδρά σε αυτό διάλυμα σχετικά αλκαλικό, pH 11,0. Τα 200 πρώτα λεπτά είναι αρκετά για να μειωθεί η περιεκτικότητα του αγνώστου προϊόντος στο 14 % και να παραμείνει σε αυτό μέχρι το τέλος του πειράματος.

Σχόλια-Παρατηρήσεις

Η φύση των δεσμών που σχηματίζουν το άγνωστο προϊόν χαρακτηρίζονται από σχετική σταθερότητα σε όξινο περιβάλλον και από ταχύτατη διάνοιξή τους σε αλκαλικό περιβάλλον.

Είναι πιθανό μια αλκαλική επίδραση να ευνοεί τη διάσπαση του αγνώστου προϊόντος τη στιγμή που το όξινο περιβάλλον δεν δείχνει να το επηρεάζει.

Μια άλλη προσέγγιση αφορά την κινητική της διάσπασης του αγνώστου προϊόντος, με μηχανισμό αλκαλικής κατάλυσης να παρουσιάζει μεγαλύτερη ταχύτητα σε σχέση με αυτόν που λαμβάνει χώρα σε όξινο περιβάλλον.

Θα παρουσίαζε ενδιαφέρον η επανάληψη του παραπάνω πειράματος με συχνότερο έλεγχο του διαλύματος αγνώστου προϊόντος σε pH 11,0 για και να μελετηθεί η διάσπαση στο χρονικό διάστημα των δυο πρώτων ωρών. Επίσης επανάληψη του πειράματος για pH 3,0 και 7,3 και η συνέχισή του για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα ώστε να καταγραφεί η συμπεριφορά του αγνώστου προϊόντος σε όξινο και ουδέτερο περιβάλλον ίσως να έδινε περισσότερα στοιχεία για τη

σταθερότητά του. Στην παρούσα φάση όμως εκτιμάται πιο ενδιαφέρουσα η μελέτη της συμπεριφοράς του αγνώστου προϊόντος σε αλκαλικό περιβάλλον, όπου η αστάθειά του είναι δεδομένη και μάλιστα καταγράφοντας τα αποτελέσματα της μελέτης όχι με ανιχνευτή UV, όπως γινόταν μέχρι τώρα, αλλά με ανιχνευτή μάζας. Μια τέτοια μελέτη θα επιβεβαιώσει εάν το άγνωστο προϊόν όταν μειώνεται δίνει καρβεδιλόλη.

Z.5. Παρακολούθηση της συμπεριφοράς του αγνώστου προϊόντος και της καρβεδιλόλης σε διαφορετικά pH κινητής φάσης

Στο κεφάλαιο αυτό παρακολουθείται η χρωματογραφική συμπεριφορά και η διαφοροποίηση του χρόνου ανάσχεσης του αγνώστου προϊόντος και της καρβεδιλόλης όταν μεταβάλλεται το pH της κινητής φάσης. Υπάρχει μια ένδειξη για τη διαφορετική συμπεριφορά των δυο ουσιών από παρατηρήσεις προηγούμενου πειράματος και κρίνεται σημαντικό να γνωρίζουμε καλύτερα τη συμπεριφορά αυτή διότι μπορεί να συνδεθεί με ιδιότητες και χαρακτηριστικά της δομής τους.

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται μέχρι στιγμής χαρακτηρίζεται από χρόνο ανάσχεσης ~4,5 λεπτά για την καρβεδιλόλη και ~12,5 για το άγνωστο προϊόν. Σε γενικές γραμμές η διαφορά αυτή είναι σημαντική και έχει μέχρι στιγμής χρησιμοποιηθεί στη συγκριτική αξιολόγηση της συμπεριφοράς πολικότητας των δύο ουσιών.

Υπενθυμίζεται πως η στήλη που χρησιμοποιείται μέχρι στιγμής, η Zorbax C18, δεν είναι σταθερή για κινητές φάσεις με pH μικρότερο του 2 και μεγαλύτερο του 8. Για το λόγο αυτό δεν επιλέγονται τιμές πέραν των προαναφερθέντων ορίων. Στη μελέτη μεταβάλλεται το pH παρασκευής του υδατικού ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχεται στην κινητή φάση. Επίσης, για να μην υπάρξουν παράλληλα φαινόμενα διαφορετικής επίδρασης των ιόντων του ρυθμιστικού διαλύματος στις 2 μελετώμενες ουσίες, σε όσα μίγματα παρασκευάστηκαν χρησιμοποιήθηκαν μόνο H_3PO_4 σε συνδυασμό με διαλύματα NaH_2PO_4 και Na_2HPO_4 . Στην παρασκευή των

ρυθμιστικών χρησιμοποιήθηκαν συμβουλευτικά οι πίνακες με ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών που παρατίθενται στην ευρωπαϊκή φαρμακοποιία.

Πείραμα 10α

Χρησιμοποιώντας διάλυμα H_3PO_4 0,1 M και $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 13,8 g/L παρασκευάζονται τα υδατικά ρυθμιστικά που περιγράφονται στον πίνακα Z.5.1 και μετράται το pH τους.

Πίνακας Z.5.1. Ρυθμιστικά διαλύματα για την κινητή φάση κατά την εκτέλεση του πειράματος 10α

Ρυθμιστικό Διάλυμα	mL H_3PO_4 0,1 M	mL NaH_2PO_4 13,8 g/l	Μετρούμενο pH ($\pm 0,05$)
PΔ1	200	0	1,5
PΔ2	113	87	2,0
PΔ3	50	150	2,6
PΔ4	11	189	3,2
PΔ5	<i>Όπως αναφέρεται στην μέθοδο XM0</i>		3,7

Στη συνέχεια το κάθε ρυθμιστικό διάλυμα αναμιγνύεται με ακετονιτρίλιο σε αναλογία 52 προς 48 αντιστοίχως, το διάλυμα ομογενοποιείται με δεκαπεντάλεπτη έντονη ανάδευση και ακολούθως απαερώνεται.

Η χρωματογραφική διάταξη σταθεροποιείται και εισάγονται ξεχωριστά το διάλυμα Π, για την καταγραφή του χρόνου έκλυσης του αγνώστου προϊόντος, και διάλυμα καρβεδιλόλης ($2,46 \times 10^{-2}$ M) 0,1 % w/v για την καταγραφή της τελευταίας. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα Z.5.2.

Πίνακας Z.5.2. Χρόνοι έκλυσης αγνώστου προϊόντος και καρβεδιλόλης για τις χρωματογραφικές συνθήκες της μεθόδου XM0 σε διαφορετικά pH ρυθμιστικού. Πείραμα 10α.

Ρυθμιστικό Διάλυμα	Μετρούμενο pH ($\pm 0,05$)	Χρόνος έκλυσης καρβεδιλόλης (min)	Χρόνος έκλυσης ΑΠ (min)
PΔ1	1,5	4,64	4,64
PΔ2	2,0	4,49	4,75
PΔ3	2,6	4,40	5,82
PΔ4	3,2	4,43	10,11
PΔ5	3,7	4,44	12,41

Πείραμα 10β

Χρησιμοποιώντας διάλυμα $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 13,8 g/l και $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 26,8 g/l παρασκευάζονται τα υδατικά ρυθμιστικά που περιγράφονται στον πίνακα Z.5.3 και μετράται το pH τους.

Πίνακας Z.5.3. Ρυθμιστικά διαλύματα για την κινητή φάση κατά την εκτέλεση του πειράματος 10β

Ρυθμιστικό Διάλυμα	mL NaH_2PO_4 13,8 g/l	mL $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 26,8 g/l	Μετρούμενο pH ($\pm 0,05$)
PΔ5	<i>Όπως αναφέρεται στην μέθοδο ΧΜ0</i>		3,7
PΔ6	184	16	4,6
PΔ7	147	53	6,1
PΔ8	78	122	7,1
PΔ9	26	174	8,13
PΔ10	11	189	9,16

Ακολουθώντας την ίδια διαδικασία με το πείραμα 10β και διαλύματα με τις ίδιες συγκεντρώσεις, συλλέγονται οι χρόνοι του πίνακα Z.5.4 για την καρβεδιλόλη και το άγνωστο προϊόν.

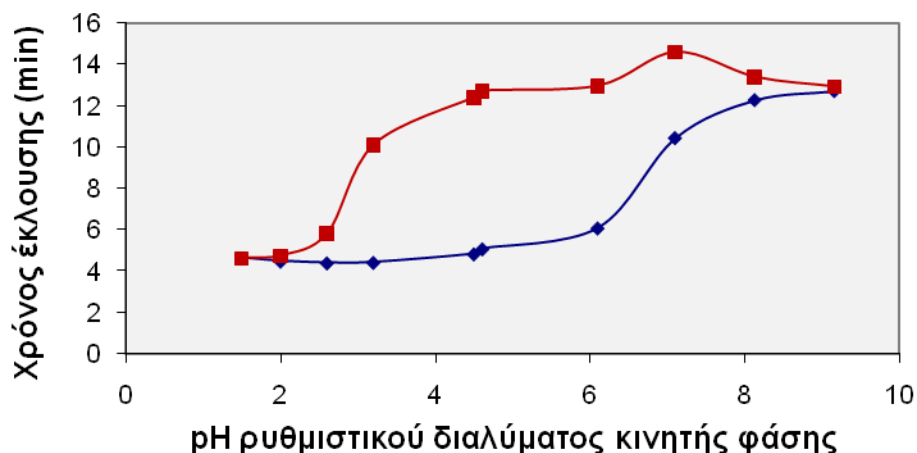
Πίνακας Z.5.4. Χρόνοι έκλυσης αγνώστου προϊόντος και καρβεδιλόλης για τις χρωματογραφικές συνθήκες της μεθόδου ΧΜ0 σε διαφορετικά pH ρυθμιστικού. Πείραμα 10β

Ρυθμιστικό Διάλυμα	Μετρούμενο pH ($\pm 0,05$)	Χρόνος έκλυσης καρβεδιλόλης (min)	Χρόνος έκλυσης ΑΠ (min)
PΔ5	3,7	5,04	13,53
PΔ6	4,6	5,08	12,71
PΔ7	6,1	6,09	12,95
PΔ8	7,1	10,44	14,58
PΔ9	8,13	12,27	13,38
PΔ10	9,16	12,71	12,91

Αποτελέσματα

Τα δεδομένα των πινάκων Z.5.2 και Z.5.4 περιέχουν τα αποτελέσματα του ίδιου πειράματος που πραγματοποιήθηκε σε 2 εργαστηριακές ημέρες. Εάν τα συνδυάσουμε για να καταγράψουμε τη μεταβολή του χρόνου ανάσχεσης σε σχέση

με το pH του ρυθμιστικού διαλύματος της κινητής φάσης προκύπτει το γράφημα του σχήματος Z.5.1.



Σχήμα Z.5.1. Χρόνοι ανάσχεσης καρβεδιλόλης (◆) και αγνώστου προϊόντος (■) σε συνάρτηση με το pH του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιείται στην κινητή φάση.

Παρατηρήσεις-Συμπεράσματα

Η πρώτη σημαντική παρατήρηση που προκύπτει από το σχήμα Z.5.1 είναι πως για πολύ μικρές αλλά και για σχετικά μεγάλες τιμές του pH οι χρόνοι έκλουσης των δυο ουσιών εξισώνονται, στην πρώτη περίπτωση με μικρούς χρόνους και στη δεύτερη με μεγάλους χρόνους έκλουσης. Στις ενδιάμεσες τιμές δείχνουν να έχουν διαφορετική πολικότητα. Ένας άλλος τρόπος ερμηνείας είναι πως η μεταβολή στην πολικότητα του αγνώστου προϊόντος που συμβαίνει στην περιοχή του pH 3 γίνεται για την καρβεδιλόλη σε pH ~8.

Η προσέγγιση λοιπόν της μεταβολής που υφίσταται η καρβεδιλόλη θα μας δώσει σημαντικές πληροφορίες για την φύση του αγνώστου προϊόντος. Πρέπει όμως να γίνει έχοντας υπ' όψην το μόριο της καρβεδιλόλης και ιδιαίτερα τις ιονίσιμες ομάδες της, εφόσον η πρωτονίωσή τους επηρεάζεται από το μεταβαλλόμενο pH.

pH<2: Η στατική φάση, όπως περιγράφηκε και στο πείραμα 12, είναι χαρακτηριστικά υδρόφοβη. Επομένως η συγκράτηση των πολικών μορίων, όπως

είναι η καρβεδιλόλη είναι πολύ μικρή. Η καρβεδιλόλη σε όξινο περιβάλλον, έως pH 6, πρωτονιώνεται με αποτέλεσμα την έντονη πολική συμπεριφορά της. Η συνέκλωση στον ίδιο χρόνο της καρβεδιλόλης με το άγνωστο προϊόν για pH μικρότερα του 2 δείχνει πως και οι δυο ουσίες είναι αρκετά πολικές στο συγκεκριμένο pH και δεν αλληλεπιδρούν σημαντικά με τη στατική φάση. Μην έχοντας όμως περισσότερα στοιχεία για τη δομή του αγνώστου προϊόντος δεν μπορεί να γίνει σύγκριση της πολικότητάς του με αυτή της καρβεδιλόλης.

pH>6: Η μεταβολή του χρόνου ανάσχεσης της καρβεδιλόλης μετά το pH 6 και η σχετική σταθεροποίησή του μετά το pH~8 οφείλεται στη αποπρωτονίωση και της δευτεροταγούς αλειφατικής αμινομάδας της. Η τιμή αυτή συμφωνεί και με τη βιβλιογραφία όπου δίδεται στην περιοχή του 8, έχοντας αλλού υπολογιστεί ως $pK_a=8,25^{128}$ και αλλού ως $7,9^{116}$. Είναι σημαντική η παρατήρηση πως με την πλήρη αποπρωτονίωση των ιονίσιμων ομάδων της καρβεδιλόλης, η χρωματογραφική συμπεριφορά της συμφωνεί με αυτήν του αγνώστου προϊόντος. *Δηλαδή, σε αλκαλικό περιβάλλον το άγνωστο προϊόν έχει την ίδια συμπεριφορά με την καρβεδιλόλη.*

Προσπαθώντας να ερμηνεύσουμε τη μεταβολή του σχήματος Z.5.1 για το άγνωστο προϊόν και συγκρίνοντάς το με την καρβεδιλόλη θα μπορούσαμε να ισχυριστούμε πως στο πρώτο δεν υπάρχει η συνεισφορά της R-NH.

Η. Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΝΕΡΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗ ΦΥΛΑΞΗ ΤΩΝ ΜΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΡΒΕΔΙΛΟΛΗ-PVP ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΟΥ ΤΗ ΔΙΚΑΙΟΛΟΓΟΥΝ

Οι μελέτες που προηγήθηκαν στο άγνωστο προϊόν σκοπό είχαν την συλλογή πληροφοριών για τον τρόπο απομόνωσής του, τη σταθερότητά του κατά την αποθήκευση, αλλά και κάποιες πληροφορίες που να μπορέσουν να βοηθήσουν την υποστήριξη κάποιας δομής του ή κάποιων δομικών χαρακτηριστικών του. Τα στοιχεία αυτά είναι σημαντικά, δεν βοηθούν όμως την εξήγηση του σχηματισμού του προκειμένου να βρεθούν οι συνθήκες που θα μειώσουν την εμφάνισή του και θα συμβάλουν σε ασφαλέστερο φαρμακευτικό σκεύασμα.

Από τα πρώτα πειράματα έχει αποδειχθεί πως η εμφάνιση του αγνώστου προϊόντος οφείλεται στην παρουσία του PVP και ενισχύεται έντονα από την υγρασία, είτε την περιεχόμενη στο έκδοχο είτε την προσροφούμενη από το περιβάλλον. Στη συνέχεια, σκοπός του παρόντος πειράματος αποτελεί η συσχέτιση της περιεχομένης υγρασίας του δείγματος με την παραγομένη ποσότητα αγνώστου προϊόντος.

Πείραμα 11

Ζυγίζονται 1,537 g καρβεδιλόλης και 1,553 g PVP3 και αναμιγνύονται με υάλινη ράβδο. Στη συνέχεια, σε ογκομετρικές φιάλες των 10 mL μεταφέρονται οι ποσότητες που αναφέρονται στον πίνακα Η.1.1 και προστίθεται η αντίστοιχη ποσότητα ύδατος στο καθένα. Οι φιάλες σφραγίζονται και φυλάσσονται σε θερμοκρασία 55 ± 5 °C, αποδεδειγμένα ευνοϊκή για την εμφάνιση του αγνώστου προϊόντος.

Πίνακας Η.1.1. Σύσταση των μιγμάτων καρβεδιλόλης και PVP 1:1 που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της συγκέντρωσης της υγρασίας στην εμφάνιση του αγνώστου προϊόντος.

	Μάζα μίγματος ΚΔ/PVP3 1:1 (mg)			μL H ₂ O προστιθέμενα
	Σειρά Α	Σειρά Β	Σειρά Γ	
X0	101,6	97,5	103,2	0,0
X1	98,3	98,9	98,6	2,0
X2	100,1	103,9	101,6	5,0
X3	104,4	102,1	103,7	10,0
X4	103,3	100,6	100,4	20,0
X5	102,7	108,4	98,0	50,0
X6	101,4	104,3	97,3	100,0
X7	104,4	107,0	100,3	150,0

Η υγρασία του κάθε δείγματος υπολογίζεται με βάση την παρακάτω σχέση, στην οποία η μάζα του νερού συνυπολογίζεται με τη μάζα του δείγματος (πίνακας Η.1.1). Η δε πυκνότητα του νερού στους 20 °C, συνθήκες εργασίας, είναι 0,9974 mg/μL.

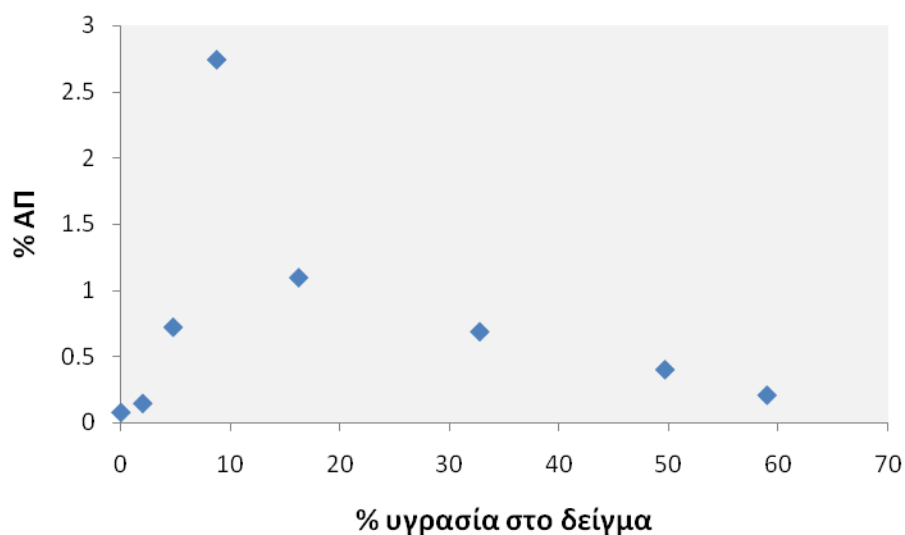
$$\% \text{ υγρασία} = \frac{\mu\text{L}_{\text{H}_2\text{O}} \times 0,9974 \text{ mg} / \mu\text{l}}{\text{mg}_{\text{μίγματος}} + (\mu\text{L}_{\text{H}_2\text{O}} \times 0,9974 \text{ mg} / \mu\text{l})} \times 100 \% \quad \text{Εξίσωση Η.1}$$

Οι σειρές Α, Β και Γ αποθηκεύονται σε θερμοκρασία 55 ± 5 °C και αποσφραγίζονται σε 6, 12 και 18 μέρες αντίστοιχα.

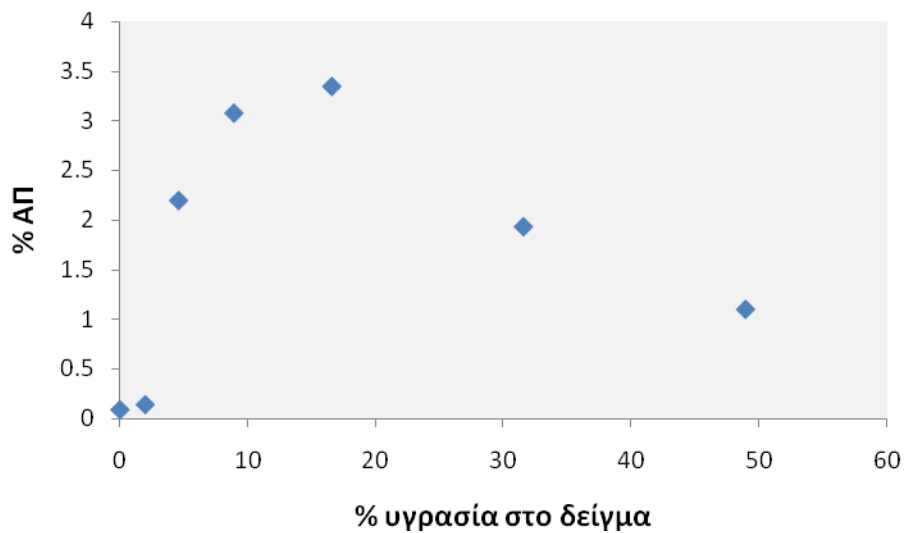
Μετά το τέλος του υπολογισμένου χρονικού διαστήματος, κάθε ένα από τα δείγματα του πίνακα Η.1.1 διαλύεται σε 8 mL κινητής φάσης της μεθόδου ΧΜ0. Κατόπιν αναδεύεται για 10 λεπτά και εμβαπτίζεται σε λουτρό υπερήχων για άλλα 10 λεπτά ώστε να διευκολυνθεί η διάλυση, δίχως να υποστούν τα δείγματα θέρμανση. Συμπληρώνεται ο όγκος του κάθε δείγματος στα 10,0 mL και αναλύεται με την μέθοδο ΧΜ4. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα σχήματα Η.1.1. – Η.1.3

Παρατηρήσεις Αποτελέσματα

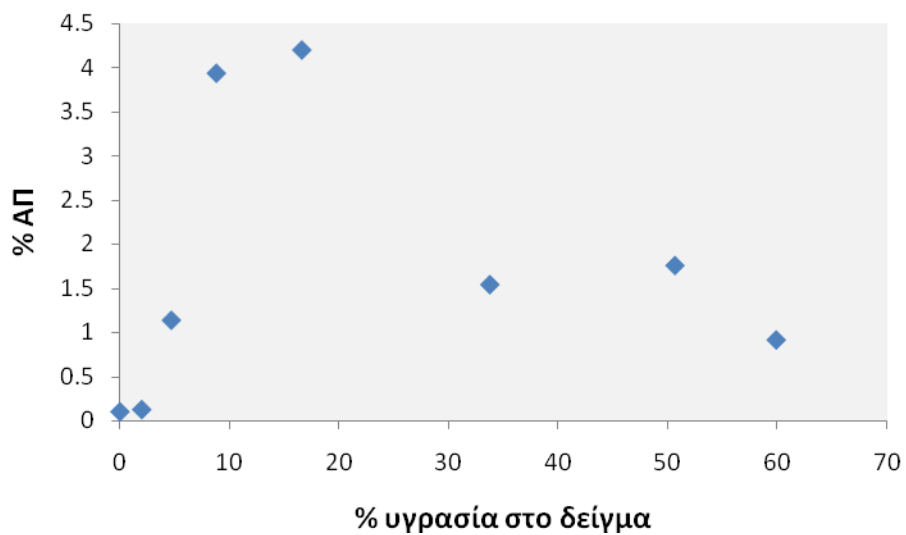
Σημειώνεται πως τα δείγματα 5A-7A, 4B-7B και 4Γ-7Γ, όπως παρατηρήθηκε πριν τη διάλυσή τους για την διεξαγωγή του πειράματος 19, έχουν το κίτρινο χρώμα και την οπτική μορφή πλαστικοποίησης της πολυβινυλοπυρρολιδόνης των δειγμάτων καθαρού πολυμερούς.



Σχήμα Η.1.1. % περιεκτικότητα σε άγνωστο προϊόν σε συνάρτηση με την % υγρασία του δείγματος στις 6 μέρες παραμονής των δειγμάτων



Σχήμα Η.1.2. % περιεκτικότητα σε άγνωστο προϊόν σε συνάρτηση με την % υγρασία του δείγματος στις 12 μέρες παραμονής των δειγμάτων



Σχήμα Η.1.3. % περιεκτικότητα σε άγνωστο προϊόν σε συνάρτηση με την % υγρασία του δείγματος στις 18 μέρες παραμονής των δειγμάτων

Παρατηρήσεις

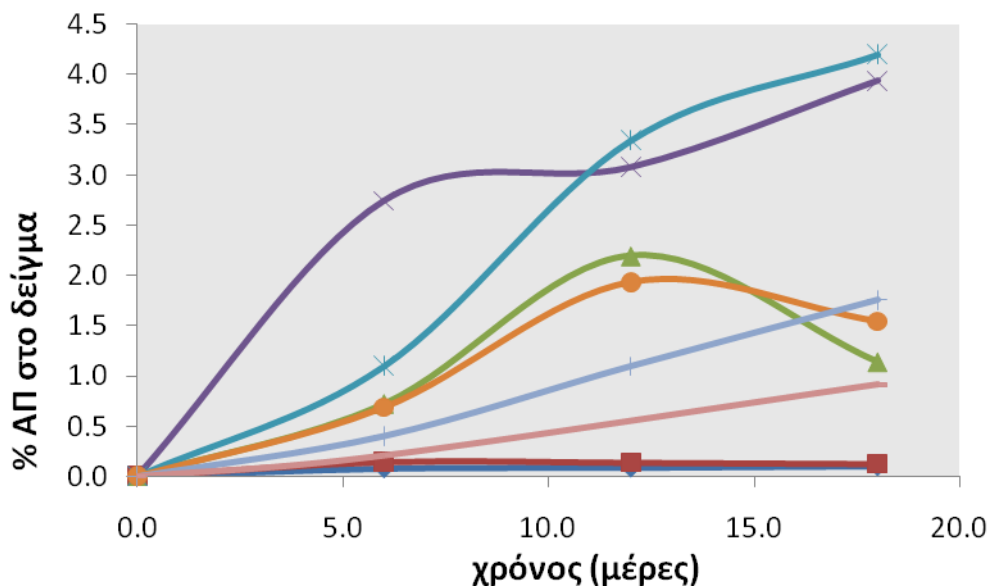
Τα σχήματα Η.1.1-3 μοιράζονται κάποια κοινά χαρακτηριστικά αλλά παρουσιάζουν και την εξέλιξη στην εμφάνιση του αγνώστου προϊόντος ως προς τον χρόνο.

Η συνολική εικόνα των γραφημάτων είναι κωδωνοειδής. Παρατηρείται, δηλαδή, πως η συγκέντρωση του αγνώστου προϊόντος και στις τρεις χρονικές στιγμές αυξάνεται όσο αυξάνεται η περιεχόμενη υγρασία στο δείγμα, αυτή φτάνει ένα μέγιστο και μετά ελαττώνεται, για πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις υγρασίας.

Το μέγιστο του κάθε κωδωνοειδούς γραφήματος δεν δίνεται από την ίδια συγκέντρωση υγρασίας, εμφανίζεται όμως και στις τρεις χρονικές στιγμές στην περιοχή προστιθέμενης υγρασίας 8-15 %. Όσο αυξάνεται ο χρόνος παραμονής των δειγμάτων, τόσο μεγαλύτερη γίνεται η μέγιστη τιμή και δείχνει να μετατοπίζεται σε μεγαλύτερες περιεκτικότητες υγρασίας.

Η κωδωνοειδής μορφή των γραφημάτων μπορεί να εξηγηθεί θεωρώντας πως ο σχηματισμός του αγνώστου προϊόντος, μέχρι το μέγιστο, ευνοείται με την αύξηση της υγρασίας του δείγματος, ίσως και να πραγματοποιείται μια αντίστροφη αντίδραση με τα μόρια του νερού ή μια μη ομοιοπολική σύνδεση. Μετά όμως από το μέγιστο, η περιεκτικότητα του δείγματος σε νερό είναι τόσο μεγάλη που μπορεί να ευνοεί τη διάσπαση του αγνώστου προϊόντος.

Για τη μελέτη της μεταβολής της συγκέντρωσης του αγνώστου προϊόντος σε κάθε διαφορετική υγρασία ως προς το χρόνο, παρατίθεται το σχήμα Η.1.4.



Σχήμα Η.1.4. % περιεκτικότητα σε άγνωστο προϊόν σε συνάρτηση με τον χρόνο παραμονής των δειγμάτων σε 40 °C / 75 % RH, ανά προστιθέμενη υγρασία 0 % (◆), 2 % (■), 5 % (▲), 9 % (×), 16 % (*), 33 % (●), 50 % (+), 59 % (-).

Μελετώντας και το σχήμα Η.1.4, παρατηρείται πως για τις περισσότερες συγκεντρώσεις άνω του 16 % προστιθέμενης υγρασίας, όσο αυξάνεται ο χρόνος παραμονής των δειγμάτων τόσο αυξάνεται και η συγκέντρωση του αγνώστου προϊόντος.

Στις προστιθέμενες υγρασίες 5 % και 33 % παρατηρείται ομοιότητα στην παραγομένη ποσότητα αγνώστου προϊόντος ως προς τον χρόνο. Θα μπορούσε να υποστηριχθεί πως είναι κάποιο τυχαίο σφάλμα που αφορούσε την αρχική ζύγιση – πριν την αποθήκευση- των δειγμάτων διότι ο υπόλοιπος τρόπος παρασκευής των δειγμάτων έχει επιλεγεί για να μειώσει τα πιθανά αναλυτικά σφάλματα ζυγίσεων. Σημειώνεται πως πρόκειται για τις πλησιέστερες υγρασίες στην περιοχή που παρουσιάζεται το μέγιστο, 10 με 20 %. Είναι, λοιπόν, πιθανό να συμβαίνει μια αντιστρεπτή αντίδραση ή μια μη ομοιοπολική σύνδεση της καρβεδιλόλης με την πολυβινυλπυρρολιδόνη.

Είναι άξιο αναφοράς πως τα δείγματα 5Α-7Α , 4Β-7Β και 4Γ-7Γ έχουν το κίτρινο χρώμα και την οπτική μορφή πλαστικοποίησης όλων των δειγμάτων του πολυμερούς μετά την επίδραση επιταχυνομένων συνθηκών. Αυτό μπορεί να δώσει

μια άλλη ερμηνεία στη μείωση του αγνώστου προϊόντος μετά το μέγιστο. Η αυξημένη περιεκτικότητα υγρασίας στο δείγμα αλληλεπιδρά με την πολυβινυλοπυρρολιδόνη και κατεβάζει αισθητά τη θερμοκρασία πλαστικοποίησής του, T_g . Η δομή του PVP έχει πλέον περισσότερες ομοιότητες με την υγρή κατάσταση, η κινητικότητα των μορίων είναι μεγαλύτερη από τη στερεή μορφή του, και ως εκ τούτου είναι αναμενόμενη η αυξημένη διάσπαση του αγνώστου προϊόντος (σύμφωνα πάντα με τα αποτελέσματα σταθερότητάς του).

Η παραπάνω παρατήρηση ισχύει εάν θεωρήσουμε πως για μεγάλες υγρασίες, ο σχηματισμός του αγνώστου προϊόντος ανταγωνίζεται τη διάσπασή του. Είναι σαφές ότι στις αυξανόμενες συγκεντρώσεις ύδατος παράγονται συνεχώς υψηλότερες ποσότητες αγνώστου προϊόντος. Όμως, μετά από κάποια αναλογία, η συμπεριφορά των δειγμάτων μεταβάλλεται ριζικά και αυξανόμενης της υγρασίας εμφανίζουν συνεχώς ελαττώμενες ποσότητες.

Μια δεύτερη, όμως, προσέγγιση των αποτελεσμάτων του πειράματος είναι ο ισχυρισμός πως οι μικρές υγρασίες ευνοούν τον σχηματισμό του αγνώστου προϊόντος, ενώ η μεγάλη περιεκτικότητα νερού τον εμποδίζει. Σε συνδυασμό με τα όσα παρατίθενται στην παράγραφο E.3.2 για την υγρασία του πολυμερούς, μπορούμε να ισχυριστούμε πως για τις μεγάλες τιμές υγρασίας στη σφαίρα επιδιάλυτωσης του καρβονυλίου βρίσκονται περισσότερα από δυο μόρια νερού. Η συσσώρευση αυτή των μορίων, εμποδίζει την προσέγγιση της καρβεδιλόλης και την αλληλεπίδραση των χαρακτηριστικών της ομάδων με το καρβονύλιο της πυρρολιδόνης, δομική μονάδας του πολυμερούς.

Υπολογιστικό Πείραμα 20-Υπολογισμός T_g δειγμάτων

Από την αναφορά στην T_g των δειγμάτων, γεννιέται η απορία για την τιμή της στις συνθήκες του πειράματος. Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, η βιβλιογραφική τιμή για το PVP K25, δίχως υγρασία, είναι ~ 155 °C, για την καρβεδιλόλη ~ 118 °C και για το νερό ~ 165 °C¹¹⁵. Χρησιμοποιώντας την εξίσωση του Fox μπορούμε να υπολογίσουμε τη θεωρητική T_g για το κάθε δείγμα.

Σημειώνεται πως σε κάθε φιάλη στα ζυγισμένα x mg η καθαρή καρβεδιλόλη είναι

$$m_{carv} = x \cdot \left(\frac{1,537}{1,537 + 1,553} \right) \cdot 0,9923$$

όπου 99,23 % το ποσοστό της καθαρής καρβεδιλόλης σε κάθε mg που ζυγίζεται, ενώ για το PVP3, με μετρημένη υγρασία 3,44 %, έχουμε

$$m_{PVP} = x \cdot \left(\frac{1,553}{1,537 + 1,553} \right) \cdot 0,9656$$

και η περιεχόμενη υγρασία στην κάθε περίπτωση θα είναι

$$m_{H_2O} = (\mu L_{added} \cdot 0,9974) + m_{carv} \cdot 0,77\% + m_{PVP} \cdot 3,44\%$$

με 0,9974 g/mL η πυκνότητα του νερού στη θερμοκρασία εργασίας, 0,77 % και 3,44 % οι υγρασίες των καρβεδιλόλη και PVP αντιστοίχως.

Έτσι, έχουμε για την κάθε σειρά πειράματος τις τιμές του πίνακα Η.1.3 για τις μάζες των τριών συστατικών.

Πίνακας Η.1.2. Υπολογισμένες μάζες στις φιάλες των δειγμάτων του πειράματος 11

	6 μέρες				12 μέρες				18 μέρες		
	mg H ₂ O	mg ΚΔ	mg PVP		mg H ₂ O	mg ΚΔ	mg PVP		mg H ₂ O	mg ΚΔ	mg PVP
0Α	2,2	50,2	49,3	0Β	2,1	48,1	47,3	0Γ	2,2	50,9	50,1
1Α	4,1	48,5	47,7	1Β	4,1	48,8	48,0	1Γ	4,1	48,7	47,9
2Α	7,1	49,4	48,6	2Β	7,2	51,3	50,4	2Γ	7,1	50,2	49,3
3Α	12,2	51,5	50,7	3Β	12,1	50,4	49,6	3Γ	12,2	51,2	50,3
4Α	22,1	51,0	50,1	4Β	22,1	49,7	48,8	4Γ	22,1	49,6	48,7
5Α	52,0	50,7	49,8	5Β	52,2	53,5	52,6	5Γ	51,9	48,4	47,6
6Α	101,9	50,1	49,2	6Β	102,0	51,5	50,6	6Γ	101,8	48,0	47,2
7Α	151,8	51,5	50,7	7Β	151,9	52,8	51,9	7Γ	151,7	49,5	48,7

Η εξίσωση του Fox, εκφράζεται από τη σχέση

$$\frac{1}{T_{g \text{ μιγματος}}} = \frac{w_1}{T_{g_1}} + \frac{w_2}{T_{g_2}} + \frac{w_3}{T_{g_3}} \quad \text{Εξίσωση Η.1}$$

όπου w οι σχετικές μάζες του κάθε συστατικού στο δείγμα και T_g η θερμοκρασία μετάπτωσης από την υαλώδη στην άμορφη κατάσταση για το καθένα, σε Κ. Στον πίνακα Η.1.3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της εξίσωσης τόσο σε Κ όσο και σε °C.

Πίνακας Η.1.3. Υπολογιζόμενες T_g για τα δείγματα του πειράματος 11.

	6 μέρες		12 μέρες		18 μέρες			
	T_g (K)	T_g (°C)	T_g (K)	T_g (°C)	T_g (K)	T_g (°C)		
0A	396	123	0B	396	123	0Γ	396	123
1A	385	112	1B	386	113	1Γ	386	113
2A	371	98	2B	372	99	2Γ	372	99
3A	353	80	3B	352	79	3Γ	353	80
4A	323	50	4B	322	49	4Γ	322	49
5A	272	-1	5B	275	2	5Γ	269	-3
6A	234	-39	6B	235	-38	6Γ	232	-41
7A	217	-56	7B	218	-55	7Γ	216	-57

Στα αποτελέσματα του πίνακα Η.1.3 ξεχωρίζουν οι τιμές για τα δείγματα στα οποία σημειώθηκε η πλαστικοποιημένη όψη, και παρατηρείται πως πρόκειται για τις περιπτώσεις όπου η υπολογιζόμενη T_g είναι χαμηλότερη από τη θερμοκρασία επώασης, 55 ± 5 °C. Δηλαδή, η μορφή των δειγμάτων δικαιολογείται διότι λόγω της μεγάλης περιεχομένης (αρχικά περιεχομένης και προστιθεμένης) υγρασίας ταπεινώνει την T_g του δείγματος πιο κάτω και από τα επίπεδα του πειράματος¹²⁹.

Σχόλια-Παρατηρήσεις

Ο σχηματισμός του αγνώστου προϊόντος, στην άμορφη κατάσταση, θερμοκρασίες κάτω από την T_g , επηρεάζεται από την παρουσία του νερού και στην ουσία, όπως ειπώθηκε και προηγουμένως, αυξανόμενη της υγρασίας αυξάνεται και το παραγόμενο προϊόν. Ίσως διότι το νερό είναι αυτό που γεφυρώνει το PVP με τα μόρια της καρβεδιλόλης και η μέγιστη ποσότητα νερού που μπορεί να δράσει έτσι, είναι, όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενη παράγραφο, η αναλογία ενός μορίου νερού ανά πυρρολιδόνη, ή περιεχομένη υγρασία περίπου 14 %. Προτού, όμως, να κορεστεί το σύστημα από την προστιθέμενη υγρασία, για να αξιολογηθεί η επίδρασή του από τη υγρασία μετά τον κορεσμό, παρατηρείται πως η σύσταση του δείγματος ταπεινώνει την T_g σε τιμές στις συνθήκες εργασίας.

Είναι γνωστό πως στην υαλώδη κατάσταση, στην οποία βρίσκονται τα δείγματα 5-6 Α, 4-7 Β και 4-7 Γ η κινητική των πραγματοποιούμενων αντιδράσεων δεν μπορεί να προβλεφθεί. Αντιθέτως, μπορεί να ενισχυθεί η άποψη πως στις μεγάλες περιεκτικότητες υγρασίας η σφαίρα ενυδάτωσης της καρβονυλομάδας του

PVP διαθέτει τόσα μόρια νερού που πραγματικά η αλληλεπίδραση με την καρβεδιλόλη δεν είναι εύκολη.

Επίσης, εάν παρατηρηθούν οι τιμές υγρασίας για τα δείγματα 5-7 και στις τρεις σειρές, αυτές ξεπερνούν την τιμή του ~24 %, που αντιστοιχεί σε δυο μόρια νερού ανά πυρρολιδόνη. Δηλαδή, ό,τι υγρασία παραπάνω υπάρχει, απλά παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση που χαρακτηρίζει τον σχηματισμό του αγνώστου προϊόντος, και για τον λόγο αυτό οι τιμές του είναι πολύ χαμηλότερες της περιοχής 6-18 %. Οι πειραματικές τιμές αυτές ίσως δεν εκφράζουν όλη την αντίστοιχη περιοχή που, εάν γίνει αποδεκτή η θεώρηση για τον σχηματισμό του αγνώστου προϊόντος, πρέπει να είναι από 6 % (ένα μόριο νερού ως γέφυρα για κάθε δυο πυρρολιδόνες) έως 24 % (δυο μόρια νερού για κάθε μια πυρρολιδόνη).

Θ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ **ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΟΣ ΚΑΡΒΕΔΙΛΟΛΗΣ**

Η χρωματογραφική παρατήρηση και απομόνωση του αγνώστου προϊόντος της καρβεδιλόλης πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια παρακολούθησης και τεκμηρίωσης της σταθερότητας νέου φαρμακευτικού σκευάσματος.

Το άγνωστο προϊόν συνδέθηκε με την πολυβινυλοπυρολιδόνη, έκδοχο της σύνθεσης, και με την υγρασία. Η αρχική προσέγγιση που αφορούσε τη συσχέτιση με την ποιότητα του PVP οδήγησε σε μια συζήτηση που αξιολογούσε τη δομή του πολυμερούς και την περιεχόμενη υγρασία. Οι φυσικές του ιδιότητες επηρεάζονται από την περιεχόμενη υγρασία και η δραστητικότητα του μορίου, γνωστή από τις πολλές/διαφορετικές εφαρμογές του στην φαρμακευτική βιομηχανία δεν μπορεί να μην επηρεάζεται. Δεν έγινε όμως εφικτός ο σαφής εντοπισμός της φύσης της επίδρασης. Η αντικατάσταση του συγκεκριμένου εκδόχου, θα μπορούσε να είναι μια κίνηση για τη βελτίωση του σκευάσματος, δεν ήταν όμως επιτρεπτή. Η ανάγκη για μείωση του σχηματισμού του αγνώστου προϊόντος παραμένει.

Με τα τελευταία πειράματα που αφορούσαν την συσχέτιση της υγρασίας με την εμφάνιση της χρωματογραφικής κορυφής του αγνώστου προϊόντος, αποκάλυψε την αύξησή του όσο η υγρασία του μίγματος αυξάνεται. Με τη γνώση αυτή, πραγματοποιείται μια διορθωτική κίνηση όσο αφορά στην παραγωγική διαδικασία. Εφόσον η σύσταση του σκευάσματος δεν μπορούσε να αλλαχθεί, τροποποιήθηκε η ποιότητα του πρωτογενούς περιέκτη και τα παραγόμενα δισκία προστατεύθηκαν από την υγρασία με καλύτερο υλικό.

Η παρακολούθηση της σταθερότητας του σκευάσματος στο νέο πρωτογενή περιέκτη υπήρξε επιτυχής και το σκεύασμα διατήρησε την ποιότητά του και την ασφάλεια στη χορήγησή του καθόλη την απαιτούμενη χρονική διάρκεια.

Η φύση του αγνώστου προϊόντος δεν είναι απαραίτητο να προσδιοριστεί όσο βρίσκεται σε τιμές μικρότερες των επίσημων ορίων. Υπάρχουν όμως, στο σύνολο

των πειραμάτων στοιχεία, που συνδυαστικά, μπορούν να βοηθήσουν να χαρακτηριστεί καλύτερα το άγνωστο αυτό προϊόν.

➤ Τα $^1\text{H-NMR}$ της καρβεδιλόλης και του άγνωστου προϊόντος έδειξαν τις πολλές ομοιότητές τους αλλά και μια μικρή εικόνα των διαφορών τους. Τα βασικά δομικά χαρακτηριστικά της καρβεδιλόλης υπάρχουν και στο άγνωστο προϊόν, παρόλο που τα δυο μόρια δεν είναι όμοια. Πιο συγκεκριμένα, τα πρωτόνια που ανήκουν στα αρωματικά τμήματα του μορίου παρατηρήθηκε να έχουν μετατοπιστεί ελαφρώς (τιμές από $-0,01$ έως $+0,04$ ppm) ενώ τα πρωτόνια που αποδίδονται στην αλειφατική αλυσίδα της καρβεδιλόλης παρουσίασαν σημαντική αποθωράκιση από $+0,08$ έως $0,011$ ppm. Επίσης, το σήμα που είχε αποδοθεί στο πρωτόνιο της αλειφατικής αμινομάδας ($>\text{NH}$) στα $5,20$ ppm δεν εμφανίζεται στο φάσμα του αγνώστου προϊόντος. Η μικρή μετατόπιση των αρωματικών πρωτονίων μπορεί να αποδοθεί στις μοριακές διαμορφώσεις που αλλάζουν και επηρεάζουν το σύνολο των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων. Η ισχυρή αποθωράκιση των αλειφατικών πρωτονίων και η απουσία του σήματος του πρωτονίου της $>\text{NH}$, είναι ενδεικτικές του είδους των διαφορών της μοριακής δομής του αγνώστου προϊόντος. Τα παραπάνω δεδομένα μας οδηγούν στην υπόθεση πως το μέρος του μορίου όπου φιλοξενούνται οι χαρακτηριστικές ομάδες, αμινομάδα και υδροξυλομάδα, έχει υποστεί κάποια αλλοίωση που επηρεάζει το περιβάλλον των γειτονικών αλειφατικών πρωτονίων.

➤ Η έκλυση της καρβεδιλόλης και του αγνώστου προϊόντος σε διαφορετικά pH της κινητής φάσης παρουσιάζει διαφορετική συμπεριφορά. Η σημαντική μεταβολή του χρόνου έκλυσης αντιστοιχεί στην πρωτονίωση της αλειφατικής αμινομάδας, που στην περίπτωση της καρβεδιλόλης συμβαίνει σε κινητές φάσεις με pH 7-8 ενώ στο άγνωστο προϊόν σε pH 3-4. Η μείωση του χρόνου πρωτονίωσης για το άγνωστο προϊόν αποκαλύπτει την μειωμένη βασικότητα του αλειφατικού αζώτου της.

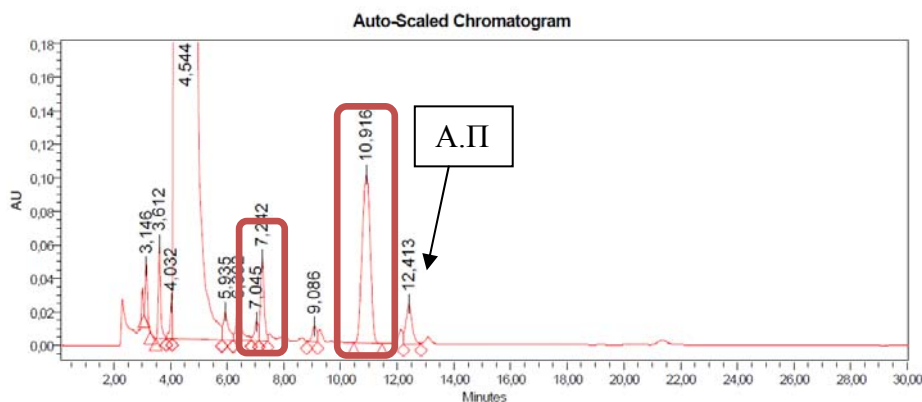
➤ Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, δευτεροταγείς αμίνες μπορούν να υποστούν ήπια οξείδωση σε υδροξυλαμίνες, μετά από αναδιάταξη των αρχικών οξειδίων του αζώτου. Αυτή η αντίδραση μπορεί να παρατηρηθεί και σε άνευ διαλυτών περιβάλλον, με τη βοήθεια υποστρωμάτων με καταλυτική δράση.

Η οξειδωτική αποικοδόμηση της δευτεροταγούς αλειφατικής αμίνης της καρβεδιλόλης σε υδροξυλαμίνη παρουσία PVP και υγρασίας, μπορεί να είναι μια λογική ερμηνεία για τα μέχρι στιγμής ευρήματα. Η καρβεδιλόλη διασπαρμένη σε υπόστρωμα που περιέχει PVP (σύνθεση σκευάσματος) μπορεί να υποστεί οξείδωση σε ένα μικροπεριβάλλον που να περιλαμβάνει την χαρακτηριστική ομάδα της πυρρολιδόνης (καρβονύλιο) και την σφαίρα επιδιάλυτώς της, παρουσία ατμοσφαιρικού οξυγόνου. Το εκτενές δίκτυο του PVP και των μορίων του νερού, πιθανότατα να προσφέρουν το κατάλληλο ηλεκτρονιακό περιβάλλον που διευκολύνει την προσθήκη ενός ατόμου οξυγόνου και την μετατροπή της καρβεδιλόλης στην υδροξυλαμίνη της.

Τα αποτελέσματα της φασματομετρίας μάζας, έδωσαν σχετική μάζα για το άγνωστο προϊόν 16 m/z μεγαλύτερη από της καρβεδιλόλης, επιβεβαιώνοντας την υπόθεση του σχηματισμού της υδροξυλαμίνης.

I. ΝΕΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΔΙΑΣΠΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΑΡΒΕΔΙΛΟΛΗΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΪΟΝ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ

Η όλη διερεύνηση για το άγνωστο προϊόν αποικοδόμησης βοήθησε τη βελτίωση της ποιότητας του τελικού σκευάσματος περιορίζοντας τις συνθήκες που ευνοούσαν το σχηματισμό του. Ανατρέχοντας στην παρακολούθηση της σταθερότητας του σκευάσματος, παρατηρήθηκε πως μέχρι την ημερομηνία λήξης του καμία από τις υπόλοιπες κορυφές δεν έφθασε σε κρίσιμα επίπεδα συγκεντρώσεων. Κατά την διερεύνηση όμως της εμφάνισης του άγνωστου προϊόντος και κατά την επεξεργασία της καρβεδιλόλης με το PVP, εμφανίστηκαν χρωματογραφικά άλλες δυο κορυφές που δεν μπορούσαν να αποδοθούν σε κάποια γνωστά προϊόντα αποικοδόμησης. Οι κορυφές αυτές είχαν σημαντική παρουσία και θεωρείται ενδιαφέρον να αναφερθεί η προσπάθεια που έγινε για τη διερεύνησή τους.



Σχήμα I.1.1. Χρωματογράφημα που δείχνει την εμφάνιση περισσότερων αγνώστων προϊόντων διάσπασης της καρβεδιλόλης μετά την παραμονή της σε μίγμα με PVP, σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και παρουσία υγρασίας.

Ακολουθείται η διαδικασία που ακολουθήθηκε και για το αρχικό άγνωστο προϊόν και εφαρμόζονται οι τεχνικές όπως περιγράφηκαν νωρίτερα. Αρχικά οι δυο αυτές ουσίες απομονώνονται, και στη συνέχεια γίνεται προσπάθεια να χαρακτηριστούν με φασματομετρία μάζας και φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Παράλληλα, ελέγχεται η χρωματογραφική συμπεριφορά τους όταν αλλάζει το pH της κινητής φάσης, πείραμα που μας παρείχε ενδιαφέρουσες πληροφορίες για τις διαφορές μεταξύ της καρβεδιλόλης και του αρχικού αγνώστου προϊόντος. Τέλος, καταγράφεται η συμβολή της υγρασίας στην εμφάνισή τους σε μίγματα καρβεδιλόλης και PVP.

I.1. Απομόνωση Αγνώστων Προϊόντων 2 και 3

Εφαρμόζοντας τη χρωματογραφική μέθοδο ΧΜ0, όπου ο χρόνος έκλουσης της καρβεδιλόλης είναι περίπου στα 4,5 min, τα δυο νέα άγνωστα προϊόντα εκκλούνται στα 7 min και στα 12,5 min και τα χαρακτηρίζουμε ως Άγνωστο Προϊόν 2 (ΑΠ2) και Άγνωστο Προϊόν 3 (ΑΠ3). Σημειώνεται πως το άγνωστο προϊόν 3 δίνει ευρεία κορυφή.

Για να απομονωθούν τα δυο νέα προϊόντα, εφαρμόζεται η διαδικασία που περιγράφηκε και περιλάμβανε τα ακόλουθα βήματα:

1. Παραμονή καρβεδιλόλης και PVP σε συνθήκες υψηλής υγρασίας για την επιτάχυνση του σχηματισμού των αγνώστων προϊόντων
2. Απομόνωση των ΑΠ2 και ΑΠ3 με ημιπαρασκευαστική χρωματογραφία και συλλογή των κατάλληλων εκλουσμάτων.
3. Βαθιά ψύξη των εκλουσμάτων για τον διαχωρισμό της οργανικής από την υδατική φάση και παραλαβή των αγνώστων προϊόντων στην οργανική φάση.

Ο χρωματογραφικός έλεγχος των 2 φάσεων επιβεβαίωσε την απομόνωση των δυο προϊόντων με την τεχνική αυτή. Είναι δυνατή η συνέχεια της διερεύνησης με:

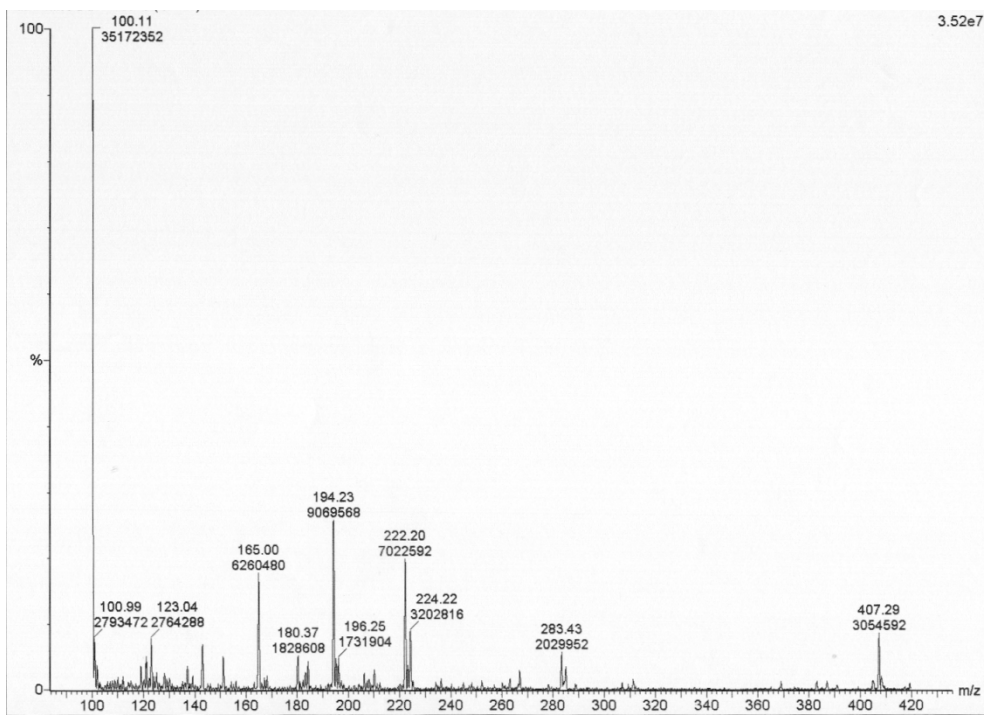
- Συμπύκνωση των δειγμάτων για λήψη φασμάτων μάζας
- Απομάκρυνση όλης της οργανικής φάσης των συλλεγμένων εκλουσμάτων και λήψη φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού.

I.2. Φασματομετρία μάζας

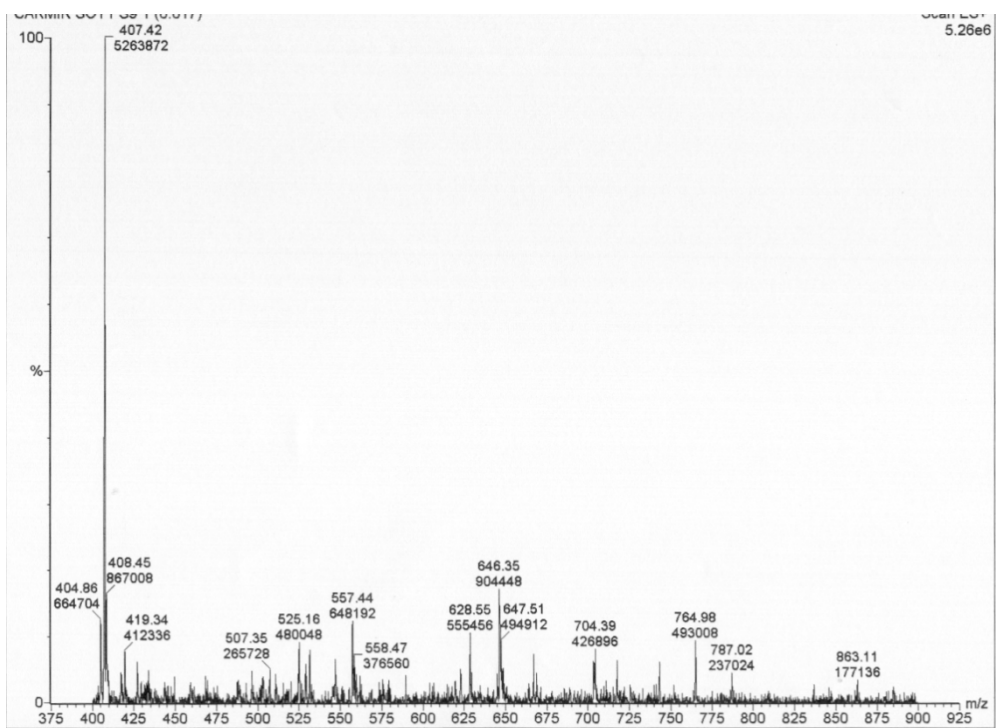
Τα δυο απομονωμένα ΑΠ που βρίσκονται στο ακετονιτρίλιο, οξυνίζονται με τη βοήθεια μυρμηκικού οξέος 0,1 % (v/v) και εισάγονται στον φασματόμετρο μάζας. Κανένα από τα δυο άγνωστα προϊόντα δεν δίνει τιμή m/z που να αντιστοιχεί σε κάποιο από τα γνωστά προϊόντα διάσπασης της καρβεδιλόλης.

Το ΑΠ2 δεν βρέθηκε να αντιστοιχεί σε κάποια γνωστή τιμή, όπως φαίνεται από τα σχήματα που ακολουθούν. Σε όλο το εύρος των μετρήσεων της φασματοσκοπίας μάζας, δεν υπάρχει κάποια που ξεχωρίζει αλλά τιμές θραυσμάτων μικρού m/z που δεν είναι εύκολο να αντιστοιχηθούν σε δομές. Η παρουσία της χαρακτηριστικής τιμής της καρβεδιλόλης (407 m/z) είναι αναμενόμενη λόγω του χρόνου έκλουσης του ΑΠ2, που στην ημιπαρασκευαστική χρωματογραφία που χρησιμοποιείται για την απομόνωσή τους αλληλεπικαλύπτονται σε ένα μικρό σημείο.

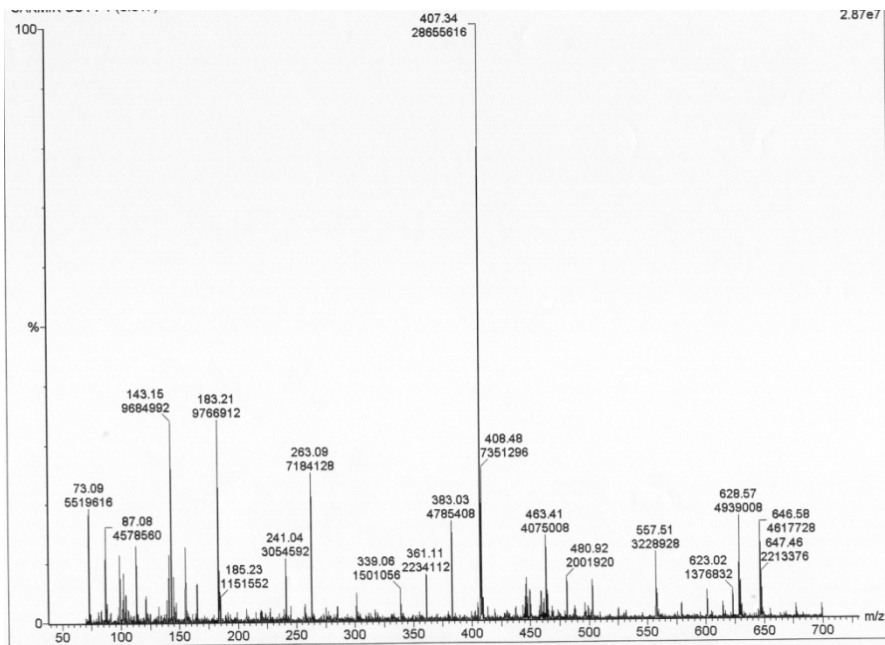
Το φάσμα μάζας του ΑΠ3 είναι πιο απλό. Εμφανίζεται ένα σήμα που αντιστοιχεί σε μοριακό βάρος 456 (τιμή 457 m/z) και μια δευτερεύουσα τιμή (252 m/z). Και σε αυτή την περίπτωση δεν υπάρχει κάποιο από τα γνωστά προϊόντα διάσπασης της καρβεδιλόλης στο οποίο μπορούσαμε να το αποδώσουμε.



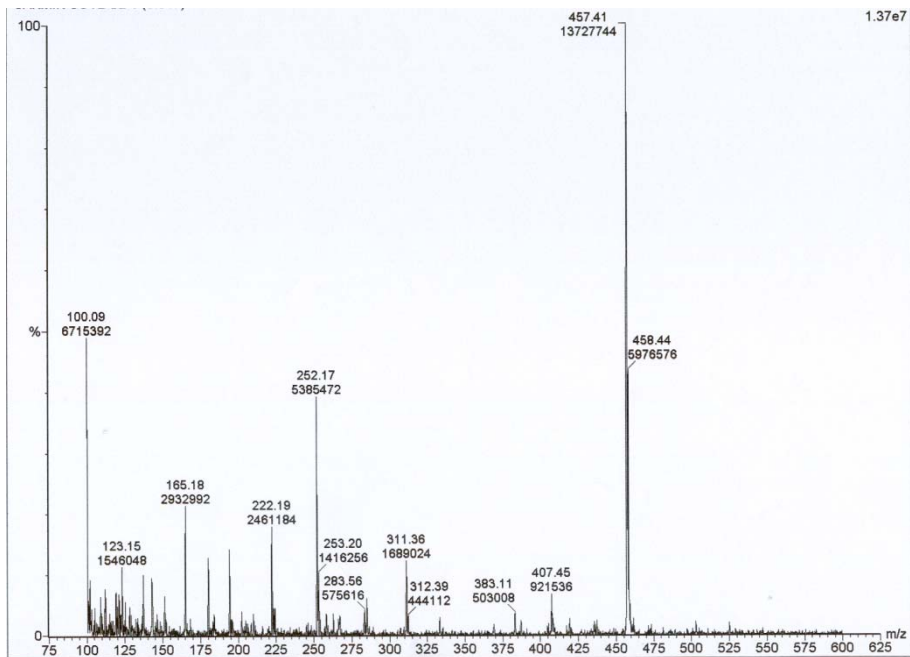
Σχήμα I.2.1. Τμήμα του φάσματος μάζας δείγματος του άγνωστου προϊόντος 2 (80 – 430 m/z).



Σχήμα I.2.2. Τμήμα του φάσματος μάζας δείγματος του άγνωστου προϊόντος 2 (400 – 900 m/z).



Σχήμα I.2.3. Τμήμα του φάσματος μάζας δείγματος του άγνωστου προϊόντος 2 (80 – 700 m/z).



Σχήμα I.2.4. Φάσμα μάζας δείγματος του άγνωστου προϊόντος 3 (100 – 625 m/z)

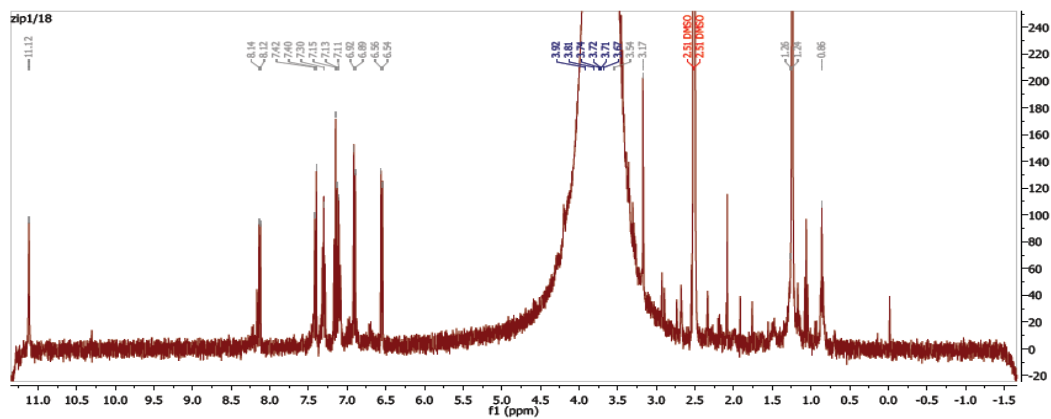
I.3. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού

Τα δείγματα των ΑΠ2 και ΑΠ3 μέσα σε ακετονιτρίλιο, συμπυκνώνονται μέχρι ξηρού σε ατμόσφαιρα αζώτου, όπως περιγράφεται στο πείραμα 6, στο κεφάλαιο ΣΤ3. Στη συνέχεια προστίθεται ως διαλύτης 600μL DMSO-*d*₆ στο καθένα και λαμβάνονται τα φάσματα ¹H-NMR, τα οποία παρουσιάζονται στα σχήματα I.3.1 και I.3.2.

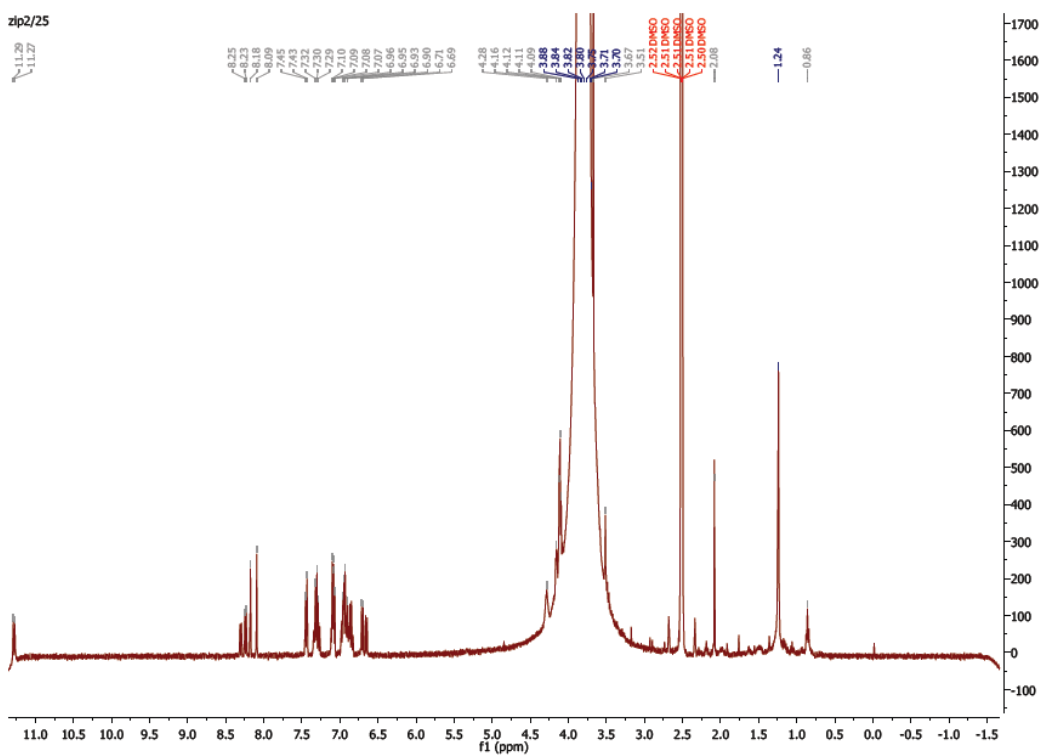
Λόγω του τρόπου συλλογής των ουσιών, τα δείγματα που χρησιμοποιούνται είναι μικρής συγκέντρωσης και αυτό φαίνεται και από τα NMR φάσματα. Η προσπάθεια απόδοσης των κορυφών σε κάποια δομή δεν υπήρξε αποτελεσματική. Αναγνωρίζονται και στα δυο άγνωστα προϊόντα τμήματα του μορίου της καρβεδιλόλης, όπως είναι το τρικυκλικό τμήμα, η καρβαζόλη, αλλά δεν μπορεί να γίνει αξιολόγηση για το αλειφατικό μέρος.

Στο ΑΠ2, το τμήμα της καρβαζόλης φαίνεται να υπάρχει αυτούσιο, ενώ δεν είναι δυνατό να διακριθεί εάν υπάρχει και εδώ η μεθοξυφαινύλο ομάδα του μορίου της καρβεδιλόλης. Είναι πιθανό το σήμα να επικαλύπτεται με τα άλλα αρωματικά και να μη διακρίνεται.

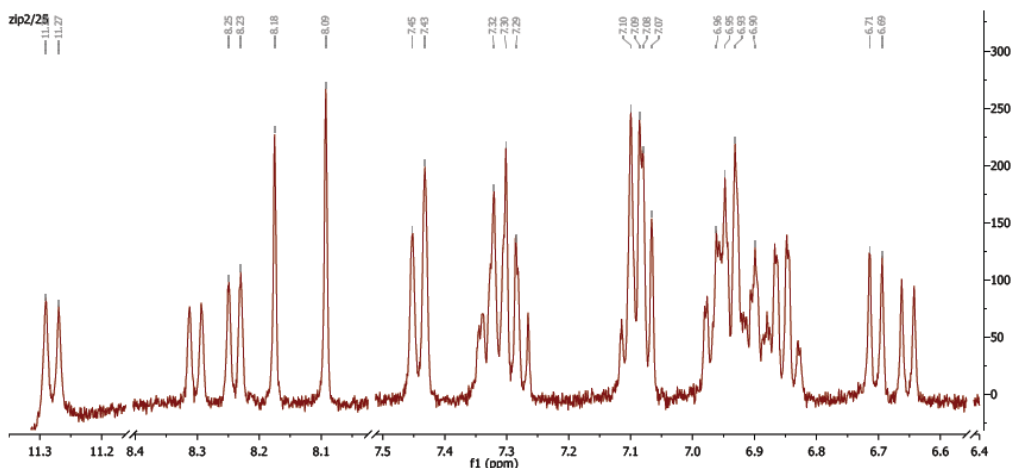
Στα φάσματα ¹H-NMR του ΑΠ3 παρατηρούνται και πάλι τα αρωματικά πρωτόνια που προσομοιάζουν σε αυτά της καρβαζόλης με μια ιδιαιτερότητα: τα σήματα που αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια 5' και 3' εμφανίζονται ως διπλές κορυφές. Είναι πιθανό στο μόριο να υπάρχουν δυο ομάδες καρβαζόλης. Οι ολοκληρώσεις των αρωματικών αυτών κορυφών συμφωνούν με την ύπαρξη δυο καρβαζολών, όπως μπορεί να φανεί και από το σχήμα I.3.3. Η αδυναμία εξαγωγής καλής πληροφορίας που να αφορά τα αλειφατικά πρωτόνια δεν επιτρέπει περαιτέρω επεξεργασία του φάσματος.



Σχήμα 1.3.1.: Το $^1\text{H-NMR}$ φάσμα του ΑΠ2 καθώς και το τμήμα των αρωματικών πρωτονίων του σε $\text{DMSO-}d_6$



Σχήμα 1.3.2.: $^1\text{H-NMR}$ φάσμα του ΑΠ2 καθώς και το τμήμα των αρωματικών πρωτονίων του σε $\text{DMSO-}d_6$

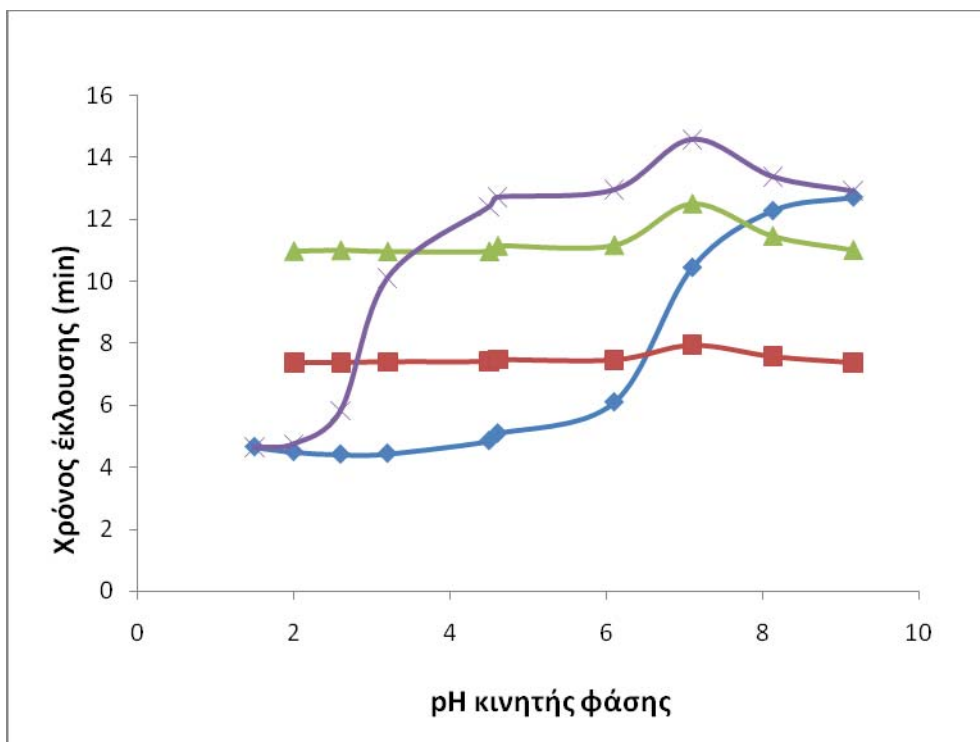


Σχήμα I.3.3.: Η περιοχή των αρωματικών πρωτονίων του $^1\text{H-NMR}$ φάσματος του ΑΠ2 σε $\text{DMSO-}d_6$

I.4. Παρακολούθηση της χρωματογραφικής συμπεριφοράς των αγνώστων προϊόντων σε αλλαγές του pH της κινητής φάσης

Στο κεφάλαιο Z5 (σελίδα 138), περιγράφεται η παρακολούθηση της χρωματογραφικής συμπεριφοράς του άγνωστου προϊόντος αποικοδόμησης σε κινητές φάσεις με διαφορετικό pH και η σύγκρισή του με αυτή της καρβεδιλόλης.

Ο έλεγχος επαναλαμβάνεται, και στις αντίστοιχες συνθήκες ελέγχονται τα συλλεγμένα εκλούσματα των ΑΠ2 και ΑΠ3. Τα αποτελέσματα είναι αρκετά ενδιαφέροντα και παρουσιάζονται στο σχήμα I.4.1 ταυτόχρονα με τα αντίστοιχα αποτελέσματα της καρβεδιλόλης και του αρχικού άγνωστου προϊόντος.



Σχήμα I.4.1: Χρόνοι ανάσχεσης των ΑΠ2 (■) και ΑΠ3 (▲) σε σχέση με το αρχικό άγνωστο προϊόν (×) και την καρβεδιλόλη (◆), σε σχέση με το pH του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιείται στην κινητή φάση.

Στην περιοχή pH που ελέγχεται από τα πειράματα, η χρωματογραφική συμπεριφορά των ΑΠ2 και ΑΠ3 παραμένει ανεπηρέαστη από την τιμή του pH. Το τμήμα του μορίου της καρβεδιλόλης που είναι υπεύθυνο για την τροποποίηση που παρατηρείται στο χρόνο έκλουσης σε συνάρτηση με το pH, δηλαδή η πρωτονίωση της αμινομάδας, παύει να είναι διαθέσιμο για αλληλεπίδραση με τον διαλύτη ή και την στατική φάση.

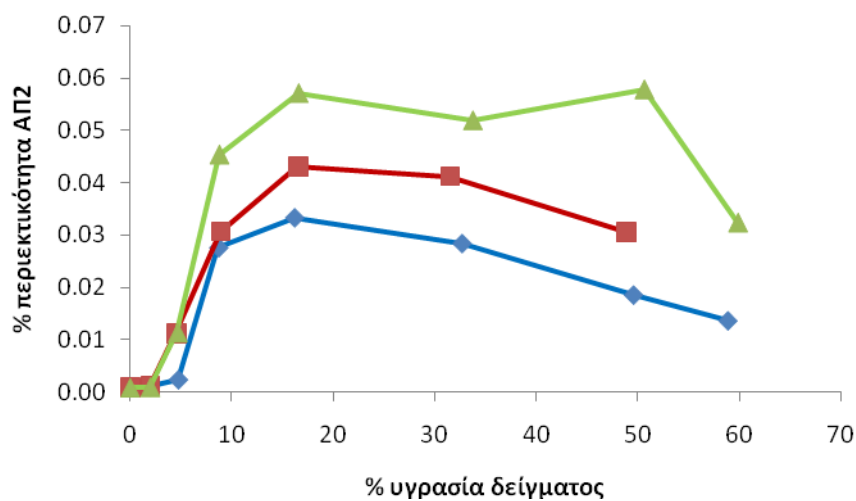
I.5. Συσχέτιση της εμφάνισης των αγνώστων προϊόντων με την περιεχόμενη υγρασία σε μίγματα PVP και καρβεδιλόλης

Οι εργασίες του κεφαλαίου Η, έδωσαν την πιο σημαντική πληροφορία όσο αφορά στο σχηματισμό του άγνωστου προϊόντος. Ήταν όμως και πειράματα που παρατηρήθηκαν σημαντικές συγκεντρώσεις τα άγνωστα προϊόντα ΑΠ2 και ΑΠ3.

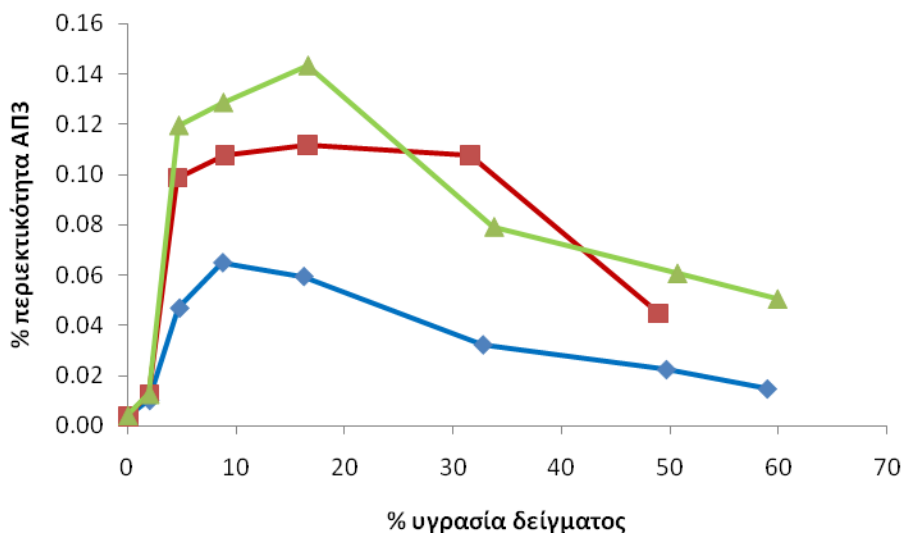
Τα χρωματογραφικά αποτελέσματα των πειραμάτων υφίστανται νέα επεξεργασία και γίνονται υπολογισμοί και για τα δυο ακόμα προϊόντα διάσπασης. Τα αποτελέσματα δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας I.5.1.: Αποτελέσματα παραγόμενων άγνωστων προϊόντων στους 55 ± 5 °C μετά την προσθήκη υγρασίας και παραμονής για 6, 12 και 18 μέρες μιγμάτων καρβεδιλόλης και PVP.

<u>6 μέρες</u>			<u>12 μέρες</u>			<u>18 μέρες</u>		
% υγρασία	% ΑΠ2	% ΑΠ3	% υγρασία	% ΑΠ2	% ΑΠ3	% υγρασία	% ΑΠ2	% ΑΠ3
0,00	0,001	0,004	0,00	0,001	0,003	0,00	0,001	0,004
1,99	0,001	0,010	1,98	0,001	0,012	1,98	0,001	0,013
4,75	0,002	0,047	4,58	0,011	0,099	4,68	0,011	0,119
8,72	0,028	0,065	8,90	0,031	0,108	8,77	0,045	0,129
16,19	0,033	0,060	16,55	0,043	0,112	16,58	0,057	0,143
32,69	0,028	0,032	31,51	0,041	0,108	33,73	0,052	0,079
49,59	0,019	0,022	48,88	0,031	0,045	50,62	0,058	0,061
58,90	0,014	0,015	<i>το δείγμα χάθηκε</i>			59,93	0,032	0,050



Σχήμα I.5.1. % περιεκτικότητα στο άγνωστο προϊόν 2 σε συνάρτηση με την % υγρασία του δείγματος στις 6 (◆), 12 (■) και 18 μέρες (▲) παραμονής των δειγμάτων.



Σχήμα I.5.2. % περιεκτικότητα στο άγνωστο προϊόν 3 σε συνάρτηση με την % υγρασία του δείγματος στις 6 (◆), 12 (■) και 18 μέρες (▲) παραμονής των δειγμάτων.

I.6. Συμπεράσματα – Σχόλια

Η παρακολούθηση των δυο ακόμα προϊόντων διάσπασης της καρβεδιλόλης παρουσία του PVP πραγματοποιήθηκε με στόχο τον χαρακτηρισμό τους.

Τα NMR δείγματα ήταν χαμηλής συγκέντρωσης και τα φάσματα πολύ πιο σύνθετα από αυτό του βασικού μελετώμενου προϊόντος διάσπασης, με αποτέλεσμα να μη δίνουν σημαντικές πληροφορίες.

Η φασματοσκοπία μάζας υπήρξε πολύ πιο δύσκολη στην αξιολόγησή της, δεδομένου ό,τι δεν ήταν εύκολο να ξεχωρίσει κάποια βασική τιμή m/z και στα δυο δείγματα.

Η χρωματογραφική συμπεριφορά των δυο αυτών ουσιών είναι λίγο πιο ξεκάθαρη, καθότι δεν δείχνει την ίδια διακύμανση με το pH που παρουσιάζουν η καρβεδιλόλη και το προϊόν της που χαρακτηρίστηκε ως οξίμη. Είναι ενδεικτική της απουσίας της δευτεροταγούς αμινομάδας της καρβεδιλόλης.

Η συσχέτιση των δυο αγνώστων προϊόντων με την περιεχόμενη υγρασία στα μίγματα της καρβεδιλόλης με PVP είναι το πείραμα που δίνει τις πιο σημαντικές

πληροφορίες. Ο σχηματισμός των δυο αυτών συστατικών είναι σημαντικός σε κάθε περίπτωση και δίνουν τις μέγιστες τιμές τους στην ίδια περιεχόμενη υγρασία και ίδιο χρόνο παραμονής με την οξίμη. Σε σχέση με την οξίμη όμως, είναι πάντοτε μεγαλύτερη η παρουσία τους στα δείγματα.

Η σχέση που έχουν με τον σχηματισμό της οξίμης, αποκαλύπτει μια ισχυρή πιθανότητα να έχουν την ίδια αιτία σχηματισμού, δηλαδή τον συνδυασμό της υγρασίας με το PVP.

Με εξαίρεση τα σκευάσματα της καρβεδιλόλης όπου ο ρυθμός εμφάνισης της οξίμης είναι πολύ αργός και τα δυο άλλα προϊόντα δεν εμφανίζονται για μεγάλο χρονικό διάστημα, σε όλες τις υπόλοιπες πειραματικές συνθήκες η συγκέντρωση της οξίμης είναι ασήμαντη σε σχέση με τα δυο προϊόντα. Οι υπόλοιπες, όμως, πειραματικές συνθήκες σχεδιάστηκαν για να ενισχύσουν τον σχηματισμό της οξίμης, σκέψη που οδηγεί στο συμπέρασμα πως η οξίμη είναι ένα ενδιάμεσο στάδιο για τον σχηματισμό των ΑΠ2 και ΑΠ3.

Η τελευταία σκέψη θα μπορούσε να βοηθήσει πολύ στην εύρεση της δομής των δυο αυτών προϊόντων. Θα χρειαζόντουσαν όμως επανάληψη στα πειράματα της συλλογής μεγαλύτερης ποσότητας και για τα δυο συστατικά, την επανάληψη της φασματομετρίας μάζας και πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού.

Το γεγονός πως η σταθερότητα του φαρμακευτικού σκευάσματος έχει ήδη εξασφαλιστεί και κανένα από τα τρία προϊόντα αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης από το PVP δεν υπερβαίνει τα όρια ασφαλείας, δεν δίνει κίνητρο στην περαιτέρω μελέτη.

ΙΑ. ΜΕΛΕΤΗ ΦΩΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΚΑΡΒΕΔΙΛΟΛΗΣ

Επιλέγεται να μελετηθεί η φωτοχημική αποικοδόμηση της καρβεδιλόλης, στα πλαίσια διερεύνησης των ιδιοτήτων ενός μορίου. Στις φαρμακευτικές αγωγές, η σταθερότητα του δραστικού μορίου ακόμα και μετά τη χορήγησή του, κατά την κυκλοφορία του στο αίμα του λήπτη, είναι πολύ σημαντική.

Οι διεθνείς οδηγίες που αφορούν στον έλεγχο των φαρμακευτικών σκευασμάτων δεν αναφέρουν πρόβλεψη του χρόνου ζωής και της ημερομηνίας λήξης των ευπαθών στο φως δραστικών ενώσεων. Είναι λοιπόν πολύ σημαντικό να καθιερωθούν διαδικασίες και υπολογισμοί που θα μας οδηγούν σε προβλέψεις ημερομηνίας λήξης ή επιτρεπόμενου χρόνου έκθεσης στο ηλιακό φως. Στόχος των δοκιμασιών που ακολουθούν είναι να βρεθεί τρόπος υπολογισμού και πρόβλεψης της συμπεριφοράς της καρβεδιλόλης όταν αυτή υφίσταται ακτινοβολία λυχνίας αερίου Ξένου.

ΙΑ.1.Πειραματικές συνθήκες ελέγχου φωτοσταθερότητας της καρβεδιλόλης

Φωτοχημική αποικοδόμηση των μορίων είναι το φαινόμενο αυτό κατά το οποίο τα μόρια απορροφούν ενέργεια από το φως που δέχονται και αποικοδομούνται. Το φαινόμενο αυτό εξαρτάται από πάρα πολλές παραμέτρους, φυσικές ή χημικές, και δεν είναι εύκολο να μελετηθεί η επίδραση όλων ξεχωριστά σε μια αποικοδομητική διεργασία.

Σχεδιάζεται ο τρόπος εργασίας βήμα βήμα, επιλέγοντας να διερευνηθούν οι παράμετροι που μπορεί να προκαλέσουν διακυμάνσεις στα αποτελέσματα. Έτσι θα επιτευχθεί επαναλήψιμος τρόπος εργασίας, ο οποίος θα επιτρέψει την αναπαραγωγή των πειραμάτων και σε άλλα εργαστήρια, πιθανότητα και με διαφορετική οργάνολογία, αρκεί να ακολουθούνται οι ίδιες συνθήκες.

Η επιστημονική κοινότητα προσπαθεί για πολλά χρόνια να μπορέσει να επεξεργαστεί πειραματικά δεδομένα φωτοχημικών αποικοδόμησεων με έναν επαναλήψιμο τρόπο. Σε αυτή την προσπάθεια εντάσσεται ο ορισμός της απόστασης από την πηγή, η κυψελίδα που προτείνεται, η χρήση του ακτινομετρικού συστήματος.

ΙΑ.1.1. Σύστημα ελέγχου φωτοσταθερότητας της καρβεδιλόλης

Για την παρακολούθηση της φωτοχημικής αποικοδόμησης των φαρμακευτικών ουσιών, όπως συμβαίνει στα πλαίσια της φαρμακευτικής ανάλυσης, επιλέγονται συγκεκριμένες συνθήκες μελέτης που επιτρέπουν την σταθεροποίηση των παραμέτρων και την επαναληψιμότητα των πειραμάτων.

- Πηγή φωτεινής ενέργειας: Η μελέτη πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας λυχνία αερίου Ξένου με το φάσμα της να επιτυγχάνεται βέλτιστη προσομοίωση με το ηλιακό φως.
- Συσκευή: Χρησιμοποιείται η συσκευή της Atlas SUNTEST CPS+ η οποία φιλοξενεί τη λυχνία αερίου Ξένου. Διαθέτει θάλαμο που ψύχεται, κατ'επιλογή, για τον έλεγχο της θερμοκρασίας των δειγμάτων και τον περιορισμό της επίδρασης της θερμοκρασίας στην αποικοδόμηση των μορίων. Τα δείγματα τοποθετούνται στη βάση του θαλάμου και απέχουν όλα συγκεκριμένα, σταθερή και επαναλήψιμη απόσταση από την πηγή της ακτινοβολίας.
- Επιφάνεια έκθεσης: Η έκταση της φωτοχημικής αποικοδόμησης μιας ουσίας εξαρτάται από το μέγεθος της επιφάνειας που δέχεται την ακτινοβολία. Για τη μελέτη χρησιμοποιούνται κυψελίδες συγκεκριμένων διαστάσεων (1×1×4 cm) και η επιφάνεια που εκτίθεται στην ακτινοβολία είναι σταθερή.
- Κυψελίδες: Οι κυψελίδες που φιλοξενούν τα υγρά δείγματα είναι από quartz, ποιότητα υάλου που απορροφά τη λιγότερη δυνατή ακτινοβολία και επιτρέπει τη μέγιστη έκθεση σε αυτή του περιεχόμενου δείγματος. Για την ασφάλεια των δειγμάτων και για να μπορούν οι κυψελίδες να δέχονται κάθετα την ακτινοβολία της λυχνίας (μέγιστη επιφάνεια ακτινοβολίας) είναι εφοδιασμένες με κατάλληλο επίθεμα ώστε να εφαρμόζει βιδωτό πώμα. Το

μήκος της διαδρομής του φωτός μέσα στο διάλυμα, είναι και αυτό συγκεκριμένο από τη γεωμετρία της κυψελίδας στα 10 mm.

- Όγκος διαλύματος: Πέρα από την επιφάνεια έκθεσης (δείγματα που η ακτινοβολία δεν εξαντλείται στην επιφάνεια) ο όγκος του διαλύματος που χρησιμοποιείται είναι σημαντική παράμετρος για την έκταση του φαινομένου που θα παρακολουθηθεί. Επιλέγεται ο όγκος να είναι σταθερός και ως τιμή επιλέγονται τα 4 mL που είναι στα επίπεδα χωρητικότητας της κυψελίδας, προκειμένου να μην υπάρχει κενό μεταξύ του υλικού της κυψελίδας και του διαλύματος. Σημειώνεται πως όλες οι κυψελίδες του εργαστηρίου καταχωρούνται με μοναδικό κωδικό ώστε να είναι εύκολη η καταγραφή της κυψελίδας που έχει χρησιμοποιηθεί στο κάθε πρωτόκολλο.

Ακτινομετρικά Συστήματα

Συνήθως, στις μελέτες επίδρασης του φωτός και για την μέτρηση της ενέργειας την οποία έχει δεχθεί ένα δείγμα, προτείνεται η χρήση ενός ακτινομετρικού συστήματος. Πρόκειται για μοριακά συστήματα ή ουσίες των οποίων μπορεί να μετρηθεί η έμμεσα η απορροφούμενη ενέργεια βάση κάποιας ιδιότητάς τους που μεταβάλλεται, σε συγκεκριμένη συγκέντρωση διαλύματος. Συνήθως είναι γνωστός και ο μηχανισμός με τον οποίο μεταβάλλεται η δομή τους από το φως. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται πως έχουν χρησιμοποιηθεί ως ακτινομετρικά συστήματα το σιδηρο-οξαλικό κάλιο, οξαλικό ουρανίλιο, 2-νιτροβενζαλδεΰδη κ.α.. Από τον διεθνή φορέα εναρμόνισης της φαρμακευτικής έρευνας και ανάπτυξης (ICH), προτείνεται η χρήση της διωδρικής υδροχλωρικής κινίνης. Στη συγκεκριμένη μελέτη, δεν χρησιμοποιήθηκε ακτινομετρικό σύστημα σε κάθε φωτοχημική διεργασία αλλά ελέγχεται ανά διαστήματα η σταθερότητα της πηγής.

Συσκευή

Η συσκευή υποβολής των δειγμάτων σε ακτινοβολία είναι της εταιρείας Atlas, SUNTEST CPS+.

Έχει εγκαταστημένη λυχνία ακτινοβολίας αερίου Xe η οποία διαθέτει δυνατότητα ρύθμισης της έντασης της έως 750 W/m^2 . Στα πειράματα που θα ακολουθήσουν ρυθμίζεται η λυχνία σε ένταση 750 W/m^2 για όλα τα πειράματα που διεξάγονται.

Ο θάλαμος στον οποίον τοποθετούνται οι κυψελίδες με τα δείγματα θερμοστατείται στους $35 \text{ }^\circ\text{C}$

ΙΑ.1.2.Αξιολόγηση της ομοιομορφίας στη διαπερατότητα των κυψελίδων

Η χρήση περισσότερων από μια κυψελίδα σε κάθε ανάλυση απαιτεί την εξασφάλιση της απουσίας διακυμάνσεων του φαινομένου που να οφείλονται σε αυτές. Για τον έλεγχο, χρησιμοποιείται το επίσημο ακτινομετρικό σύστημα, 2 % w/v διάλυμα διωδικής υδροχλωρικής κινίνης καθώς και η αναλυτική τεχνική παρακολούθηση της απορρόφησης ενέργειας.

Στον έλεγχο συμμετέχουν πέντε κυψελίδες στις οποίες μεταφέρονται 4,0 mL από διάλυμα 2 % (1,004 g/ 50 mL νερό). Οι κυψελίδες τοποθετούνται μέσα στον θάλαμο έκθεσης της συσκευής Atlas και υφίστανται ακτινοβολία 700 W/m^2 για 15 h.

Στο τέλος της έκθεσής τους σε ακτινοβολία, πραγματοποιούνται δυο σειρές μετρήσεων με UV στα 400 nm και μηδενίζοντας με την απορρόφηση στο UV του αέρα:

(I) Μετράται η απορρόφηση της κάθε κυψελίδας ως έχει.

(II) Μετράται η απορρόφηση του περιεχομένου της κάθε κυψελίδας.

Κυψελίδα		N1	N2	O1	O2	O3
Σειρά A (mAU)		800	764	680	675	706
Σειρά B (mAU)	164	869	842	756	753	779

Παρατηρείται πως οι κυψελίδες έχουν μια διαφορά μεταξύ τους, ιδίως η σειρά N σε σχέση με τη σειρά O. Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως πρέπει σε όλα τα πρωτόκολλα να χρησιμοποιηθεί η ίδια σειρά κυψελίδων για να υπάρχουν συγκρίσιμα αποτελέσματα.

ΙΑ.1.3.Έλεγχος επαναληψιμότητας φωτόλυσης

Σε συνέχεια του προηγούμενου πειράματος ελέγχου των κυψελίδων για επιλογή και σχεδιασμό του πρωτοκόλλου εργασίας, θα πρέπει να επιβεβαιωθεί η διαφορά μεταξύ των κυψελίδων και να εκτιμηθεί εάν η διαφορά οφείλεται στο υλικό τους ή στη θέση τους μέσα στον θάλαμο της συσκευής Atlas. Οι συσκευές της Atlas έχουν σχεδιαστεί για να υπάρχει η μέγιστη έκθεση των δειγμάτων στην ακτινοβολία όμως στο συγκεκριμένο μοντέλο δεν υπάρχει προδιαγραφή που να εξασφαλίζει πως όλα τα σημεία της επιφάνειας κάτω από τη λυχνία δέχονται την ίδια ενέργεια. Πριν την έναρξη των πειραμάτων οφείλουμε να διερευνήσουμε εάν υπάρχουν διαφοροποιήσεις και να σχεδιάσουμε κατάλληλα τα πρωτόκολλα εργασίας μας.

Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων εργασίας

5,0 mg και 10,2 mg πρότυπης CV (99,7 %) μεταφέρονται σε φιάλες των 50 mL και αραιώνονται με μεθανόλη. Στη συνέχεια, 2 mL από τα διαλύματα αυτά αραιώνονται στα 50 mL με τον ίδιο διαλύτη και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις των διαλυμάτων που προκύπτουν είναι $9,84 \times 10^{-6}$ και $2,01 \times 10^{-5}$ M.

Παρασκευή διαλύματος εργασίας

Για τη φωτόλυση, ζυγίζονται 4,1 mg καρβεδιλόλης σε φιάλη των 50 mL και 3 mL από αυτά αραιώνονται στα 50 mL με τον ίδιο διαλύτη. ($1,21 \times 10^{-5}$ M)

Έλεγχος επαναληψιμότητας παρασκευής δειγμάτων

Το διάλυμα εργασίας χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας της παρασκευής των τελικών διαλυμάτων στα φιαλίδια του χρωματογραφικού συστήματος. Σε 10 διαφορετικά φιαλίδια αυτόματου δειγματολήπτη χρωματογραφίας μεταφέρονται από 900 μ L του φωσφορικού –ρυθμιστικού διαλύματος του υδατικού μέρους της κινητής φάσης και προστίθενται από 200 μ L από το διάλυμα εργασίας. Τα διαλύματα εισάγονται στο σύστημα και καταγράφεται η επαναληψιμότητα του εμβადού των ανακτώμενων κορυφών από το κάθε φιαλίδιο.

Πειραματικό

Σε 4 κυψελίδες, που συμβολίζονται ως N1, N2, N3 και N5, μεταφέρονται από 4,0 mL του διαλύματος εργασίας και παρακολουθείται η φωτοχημική αποικοδόμησή τους.

Οι κυψελίδες υφίστανται ακτινοβολία για 3 h. Γίνεται δειγματοληψία 500 μ L από την κάθε κυψελίδα, και η έκθεσή τους στη ακτινοβολία συνεχίζεται και τερματίζεται στις 6h, οπότε και πραγματοποιείται η τελευταία δειγματοληψία.

Παρασκευή δειγμάτων από διαλύματα συγκέντρωσης της τάξης 10^{-5} M

Για κάθε ένα από τα δείγματα και πρότυπα διαλύματα, 200 μ L προστίθενται σε φιαλίδιο αυτόματου δειγματολήπτη HPLC που περιέχει 900 μ L από το φωσφορικό –ρυθμιστικό διάλυμα του υδατικού μέρους της κινητής φάσης για την παρακολούθηση των εμφανιζόμενων προϊόντων διάσπασης.

Αποτελέσματα και Υπολογισμοί

Τα εμβαδά των δέκα δειγμάτων του ίδιου διαλύματος για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας της παρασκευής τους δίνονται στον πίνακα ΙΑ.1.1.

Πίνακας ΙΑ.1.1. Χρωματογραφικά αποτελέσματα ελέγχου της επαναληψιμότητας του πρωτοκόλλου της παρασκευής των δειγμάτων στο τέλος της έκθεσης των δειγμάτων σε ακτινοβολία.

α / α	Εμβαδό καρβεδυλόλης	
1	384857	
2	388135	
3	383562	
4	359143	
5	392727	
6	380667	
7	377079	
8	377292	
9	375236	
10	376059	
	379476	Μέση τιμή
	2.41	rsd %

Για την παρακολούθηση και τη σύγκριση της φωτοχημικής αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης σε διαφορετικές κυψελίδες και διαφορετικές θέσεις μέσα στον θάλαμο, χρησιμοποιούνται τα δυο διαλύματα πρότυπης καρβεδιλόλης. Αυτά, δίνουν χρωματογραφικά τα εμβαδά του πίνακα ΙΑ.1.2.

Πίνακας ΙΑ.1.2. Πρότυπα διαλύματα καρβεδιλόλης και η χρωματογραφική τους απόκριση

Συγκέντρωση (M)	Επιφάνεια
$9,811 \times 10^{-6}$	269081
$2,001 \times 10^{-5}$	570072

Τα διαλύματα για την κάθε δειγματοληψία δίνονται στον παρακάτω πίνακα και φαίνεται πως και στις τέσσερις περιπτώσεις οι μεταβολές που υφίσταται το δραστικό μόριο από το χρόνο ακτινοβόλησης είναι ίδιες.

Πίνακας ΙΑ.1.3. Χρωματογραφικά δεδομένα σύγκρισης της πιθανής απορρόφησης από τις κυψελίδες κατά τη Φωτοχημική αποικοδόμηση διαλύματος καρβεδιλόλης.

Χρόνος (h)	Κυψελίδα	Εμβαδό κορυφής καρβεδιλόλης	Συγκέντρωση ($\times 10^{-6}$ M)
0		379476	13,55
3	N5	233119	8,34
	N2	230900	8,26
	N1	231660	8,29
6	N5	176420	6,13
	N2	178816	6,40
	N1	175615	6,28
	N3	189145	6,77

Σχόλια -Συμπεράσματα

Ο έλεγχος των κυψελίδων έδειξε πως οι κυψελίδες N1, N2 και N3 μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τα επόμενα πειράματα δίχως σημαντικές διαφορές στην απορροφούμενη ενέργεια, και πως οφείλουν να τοποθετούνται σε κοντινές θέσεις στην επιφάνεια της συσκευής, κάτω από τη λυχνία Ξένου.

ΙΑ.1.4. Περιγραφή διαδικασίας αλληλουχίας δειγματοληψιών

Οι κυψελίδες, συμπληρώνονται με 4,0 mL από μελετώμενο διάλυμα, τοποθετούνται στη συσκευή λυχνίας Ξένου και η φωτοχημική αποικοδόμησή τους διακόπτεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα για να πραγματοποιηθούν οι απαραίτητες δειγματοληψίες.

Σε κάθε δειγματοληψία που πραγματοποιείται, απομακρύνονται από την κυψελίδα 500 μL του διαλύματος και τοποθετούνται σε κατάλληλο πλαστικό περιέκτη των 1500 μL , με πώμα (tip), και φυλάσσεται μακριά από το φως. Εάν η ανάλυση των δειγμάτων δεν είναι προγραμματισμένη να πραγματοποιηθεί την ίδια εργαστηριακή ημέρα, αυτά αποθηκεύονται στο ψυγείο μέχρι την ανάλυσή τους.

Ο όγκος των 500 μL παραμένει ο ίδιος σε όλα τα πειράματα, ανεξάρτητα της συγκέντρωσης του φαρμακευτικού μορίου που μελετάται. Είναι αρκετός για να επιτρέψει, εάν χρειαστεί, την παρασκευή και ανάλυση δυο διαφορετικών δειγμάτων.

Μετά την πρώτη δειγματοληψία, στην κυψελίδα παραμένουν τα 3,5 mL της ονομαστικής της τιμής και είναι καλό να μην μειωθεί ο όγκος του δείγματος σε μικρότερες τιμές. Τα πρωτόκολλα δειγματοληψίας σχεδιάζονται έτσι ώστε από την κάθε κυψελίδα να πραγματοποιούνται μέχρι δύο δειγματοληψίες και να μη συνεχίζεται η ακτινοβολία της μετά τη 2^η απομάκρυνση δείγματος.

Συγκεκριμένα, για πρωτόκολλο που απαιτεί έξι συνολικά δειγματοληψίες, η πρώτη και η δεύτερη πραγματοποιούνται από την 1^η κυψελίδα, η τρίτη και η τέταρτη από τη 2^η ενώ η απομάκρυνση των κατάλληλων όγκων γίνονται από την 3^η κυψελίδα για τον έλεγχο στις δυο τελευταίες δειγματοληψίες. Εάν σχεδιάζονται δειγματοληψίες σε περισσότερες χρονικές στιγμές, οι κυψελίδες ξεπλένονται και συμπληρώνονται με το αρχικό διάλυμα, που δεν έχει υποστεί ακτινοβολία και στη συνέχεια υφίστανται ακτινοβολία για τον απαιτούμενο χρόνο.

ΙΑ.2. Παρακολούθηση της μεταβολής της συγκέντρωσης των εναντιομερών κατά την φωτοεπαγόμενη αποικοδόμηση μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης

Κάθε ζεύγος εναντιομερών, μοιράζεται κάποια κοινά χαρακτηριστικά αλλά έχει ένα σύνολο διαφορετικών ιδιοτήτων, που εξαρτώνται από τη στερεοχημεία του μορίου. Ο μηχανισμός αποικοδόμησης ενός μορίου είναι πολύ πιθανό να είναι διαφορετικός μεταξύ δυο εναντιομερών

Είναι γνωστό βιβλιογραφικά ό,τι τα εναντιομερή σε πολλές περιπτώσεις όταν υφίστανται φωτεινή ακτινοβολία συμπεριφέρονται με διαφορετικό τρόπο. Άλλοτε μετατρέπονται στο άλλο εναντιομερές τους, σε διαφορετικά μίγματα εναντιομερών και άλλοτε ρακεμοποιούνται.

Έχει αναφερθεί στη φαρμακολογική δράση της καρβεδιλόλης ότι χορηγείται ως ρακεμικό μίγμα, με τα δυο εναντιομερή να μη δρουν στους ίδιους υποδοχείς του νευρικού συστήματος. Είναι πιθανό η όποια διαφοροποίηση της αναλογίας τους κατά τη διάρκεια της φωτόλυσης να επηρεάζει μη προβλεπόμενα την δράση του φαρμάκου.

Θα πρέπει να ελεγχθεί, για τη συνέχιση των πειραμάτων της φωτόλυσης, εάν τα εναντιομερή φωτολύονται παράλληλα με την ίδια ταχύτητα κρατώντας την «ρακεμική» ιδιότητα της καρβεδιλόλης σταθερή.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός του παρακάτω πειράματος είναι να παρακολουθηθεί η πορεία των δυο εναντιομερών της καρβεδιλόλης κατά τη φωτοεπαγόμενη αποικοδόμηση μεθανολικού διαλύματος του ρακεμικού μίγματος.

ΙΑ.2.1. Ανάπτυξη Χρωματογραφικής Μεθόδου

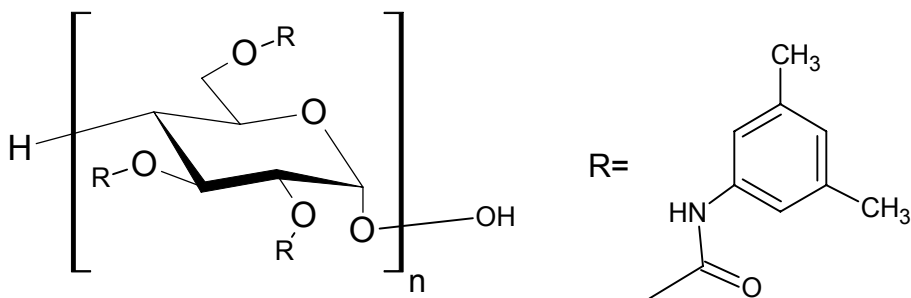
Στη βιβλιογραφική αναζήτηση χρωματογραφικής μεθόδου που να επιτρέπει την παρακολούθηση των εναντιομερών της καρβεδιλόλης, προέκυψαν κάποιες μέθοδοι με εφαρμογές σε οργανικά υγρά. Οι περισσότερες όμως προτείνουν παραγοντοποίηση των εναντιομερών με χειρόμορφο αντιδραστήριο.^{117 118 120 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143}

Πιο ενδιαφέρουσα και ευκολότερη στην εφαρμογή είναι η χρωματογραφία με χρήση χειρόμορφης στατικής φάσης. Στην δημοσίευση των Hanada et al.¹³⁴ δίνονται για την καρβεδιλόλη οι συνθήκες:

- στήλη Chiralpak 2,0×250 mm AD-H
- κινητή φάση: n-εξάνιο/ ισοπροπανόλη / διαιθυλαμίνη 78/22/1
- ροή 0,3 mL/min
- φθορισμομετρικός ανιχνευτής

Ο εργαστηριακός εξοπλισμός δεν επιτρέπει την άμεση εφαρμογή των παραπάνω συνθηκών, που θα διαχώριζε τα δυο επιμερή S και R στα 11 και 15 min. Υπάρχει στήλη με το ίδιο υλικό πλήρωσης (amylase tris 3,4-dimethylphenylcarbamate coated on 5µm silica-gel) αλλά διαφορετικών διαστάσεων, καθώς και ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού.

Με τον διαθέσιμο εξοπλισμό, γίνεται προσπάθεια να διαχωριστούν τα επιμερή της καρβεδιλόλης και να τροποποιηθούν, εάν χρειαστεί, οι συνθήκες ώστε να βελτιστοποιηθεί ο διαχωρισμός αυτός.



Σχήμα ΙΑ.2.1: Υλικό πλήρωσης στηλών ChiralPak AD, υποκατεστημένο με -τρις-3,4-διμεθυλοφαινυλοκαρβο-αμυλάση.

Περιορισμοί – Σημεία προσοχής στην εφαρμογή της μεθόδου

Σημειώνεται πως λόγω του υλικού πλήρωσης, η πίεση στις στήλες αυτές δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 700 psi ενώ η μέγιστη θερμοκρασία λειτουργίας θα πρέπει να είναι 40 °C. Έτσι εξασφαλίζεται ο μέγιστος χρόνος ζωής της στήλης. Επίσης, ο εισερχόμενος όγκος δείγματος δεν θα πρέπει να ξεπερνά τα 10 μL.

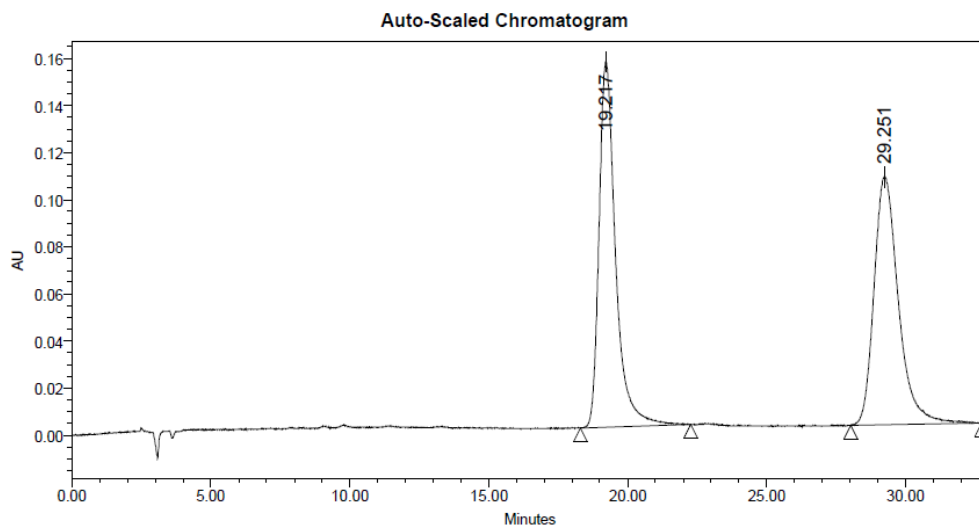
ΒΗΜΑ 1^ο

Για την προσαρμογή της μεθόδου χρησιμοποιείται πρόσφατο μεθανολικό διάλυμα καρβεδιλόλης (8×10^{-4} M) το οποίο προφυλάσσεται από το φως. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται ως το δείγμα του ρακεμικού μίγματος με το οποίο παρακολουθείται η χρωματογραφική συμπεριφορά των επιμερών. 4,0 mL από το ίδιο διάλυμα υφίστανται την επίδραση ακτινοβολίας για 3 h και χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της εμφάνισης προϊόντων διάσπασης.

Συνθήκες E1

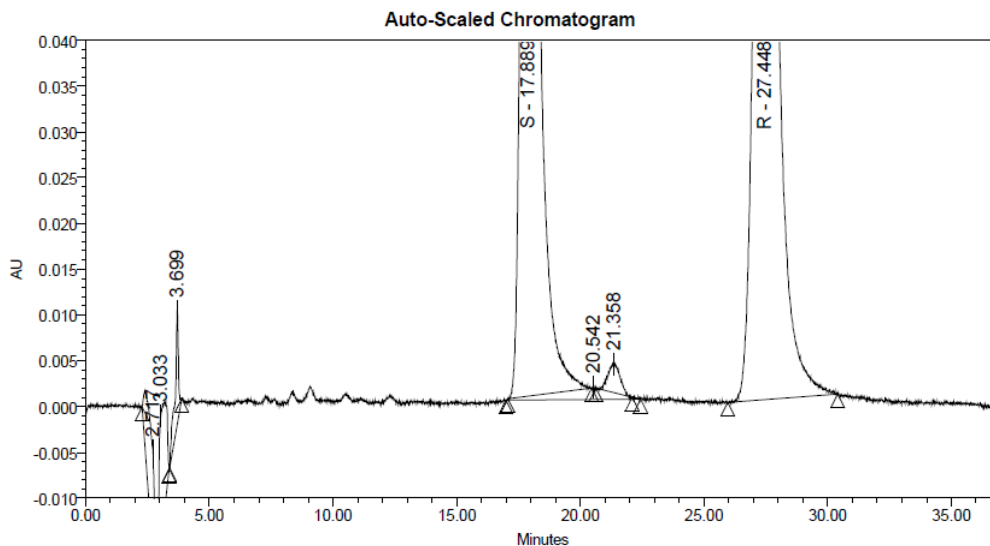
- Στήλη Chiralpak 4,6×150 mm AD-H, 5μm
- Θερμοκρασία στήλης 40 °C
- Κινητή φάση: n-εξάνιο/ ισοπροπανόλη / διαιθυλαμίνη 78/22/1 v/v
- Ροή κινητής φάσης 0,7 mL/min (πίεση συστήματος 430 psi)
- Ανιχνευτής με συστοιχία διόδων υπεριώδους-ορατού (περιοχή παρακολούθησης 350-200 nm)

Από την εισαγωγή 5 μL του διαλύματος της ρακεμικής καρβεδιλόλης παρατηρήθηκε πως το μέγιστο της απορρόφησης και των δυο εναντιομερών είναι στα 244 nm.



Σχήμα IA.2.2. Χρωματογράφημα διαδοχικής έκλουσης εναντιομερών καρβεδιλόλης με μεθανόλη ως διαλύτη. (Μέθοδος E1, ροή 0,7 ml/min, $\lambda=244$ nm)

Ο διαχωρισμός των δυο επιμερών είναι αρκετά καλός αλλά η διάρκεια παρακολούθησης της έκλουσής τους πολύ μεγάλη (35 min). Μεταβολή της ροής από 0,7 σε 0,8 mL/min δεν αύξησε την πίεση (~480 psi) ενώ κατάφερε να μειώσει τη διάρκεια της εισαγωγής κατά 2 περίπου λεπτά. Στις συνθήκες αυτές ελέγχεται χρωματογραφικά το διάλυμα που έχει υποστεί ακτινοβολία. Παρατηρείται εμφανώς ένα προϊόν διάσπασης στην αρχή, δίπλα από το μέτωπο του διαλύτη καθώς και ένα ακόμα μεταξύ των δυο εναντιομερών (σχήμα IA.2.3).



Σχήμα ΙΑ.2.3. Χρωματογράφημα διαχωρισμού εναντιομερών καρβενδιλόλης από δείγμα φωτοαποικοδομημένο για 3 h με τη μεθανόλη ως διαλύτη. (Μέθοδος E1, ροή 0,8 mL/min)

Η κορυφή όμως του ισομερούς που εκλούεται πρώτο (I), δεν είναι τόσο συμμετρική όπως θα αναμενόταν, σε αντίθεση με αυτό που εκλούεται στα 27 λεπτά (II), παρά την υστέρησή του στον χρόνο έκλουσης. Είναι πιθανό άλλη μια ένωση να συνεκλούεται ή η κινητή φάση να θέλει ακόμα τροποποιήσεις που να βελτιώσουν τη μορφή της.

ΒΗΜΑ 2^ο

Για την επέκταση της παρακολούθησης της φωτοεπαγόμενη αποικοδόμησης της καρβενδιλόλης σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, ο όγκος εισαγωγής αυξάνεται στο μέγιστο δυνατό για τη στήλη (10 μ L).

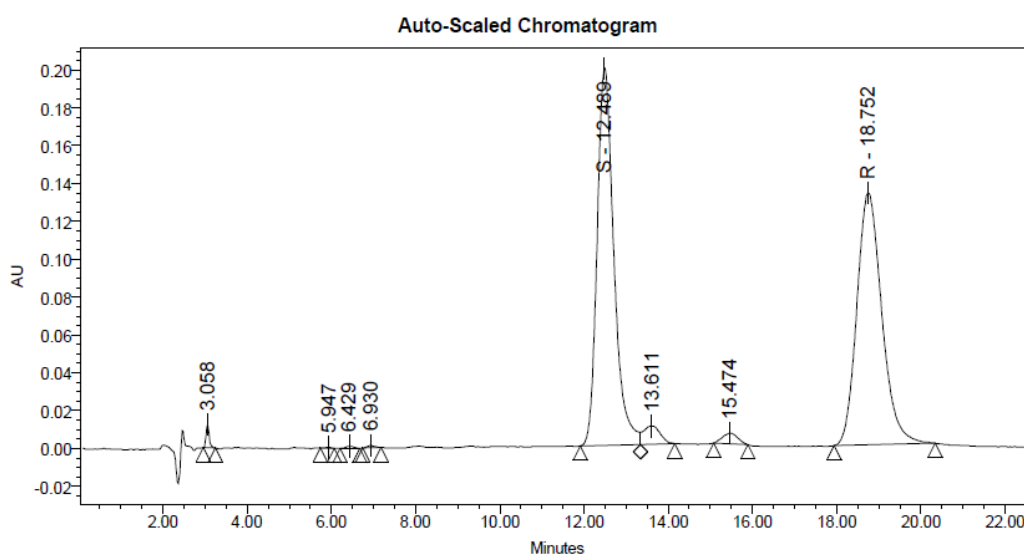
Χρωματογραφικά, για να μειωθεί η διάρκεια της κάθε εισαγωγής, προστίθεται στη κινητή φάση αιθανόλη, που έχει ισχυρότερη εκλουστική ικανότητα από την ισοπροπανόλη. Παράλληλα, η ροή της κινητής φάσης αυξάνεται από 0,8 σε 1,0 ml/min.

Συνθήκες E2

- Στήλη Chiralpak 4,6×150 mm AD-H, 5 μ m
- Θερμοκρασία στήλης 40 °C

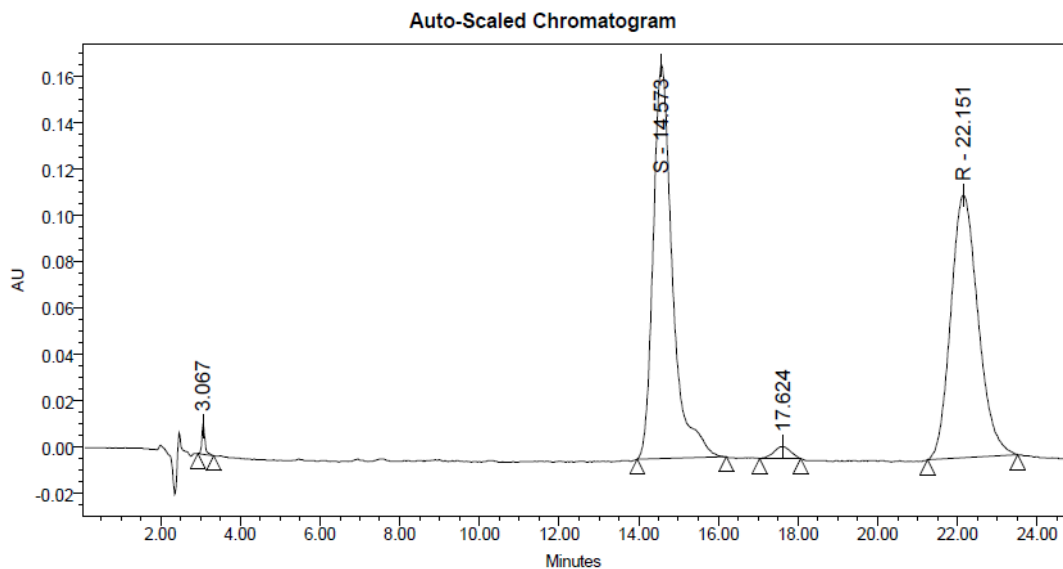
- Κινητή φάση: n-εξάνιο/ ισοπροπανόλη / αιθανόλη / διαιθυλαμίνη 75/21/2/1 v/v
- Ροή κινητής φάσης 1,0 mL/min (πίεση ~683 psi)
- Ανιχνευτής συστοιχία διόδων υπεριώδους-ορατού στα 244 nm.

Οι νέες χρωματογραφικές συνθήκες εμφανίζουν ένα ακόμα προϊόν της φωτοχημικής διάσπασης του ρακεμικού μίγματος της καρβεδιλόλης, το οποίο στη μέθοδο E1 θεωρούμε ότι εκλουόταν μαζί με το εναντιομερές I (σχήμα IA.2.4).



Σχήμα IA.2.4: Χρωματογράφημα διαχωρισμού εναντιομερών της καρβεδιλόλης από δείγμα φωτοαποικοδομημένο για 3 h με τη μεθανόλη ως διαλύτη. (Μέθοδος E2, ροή 1,0 ml/min)

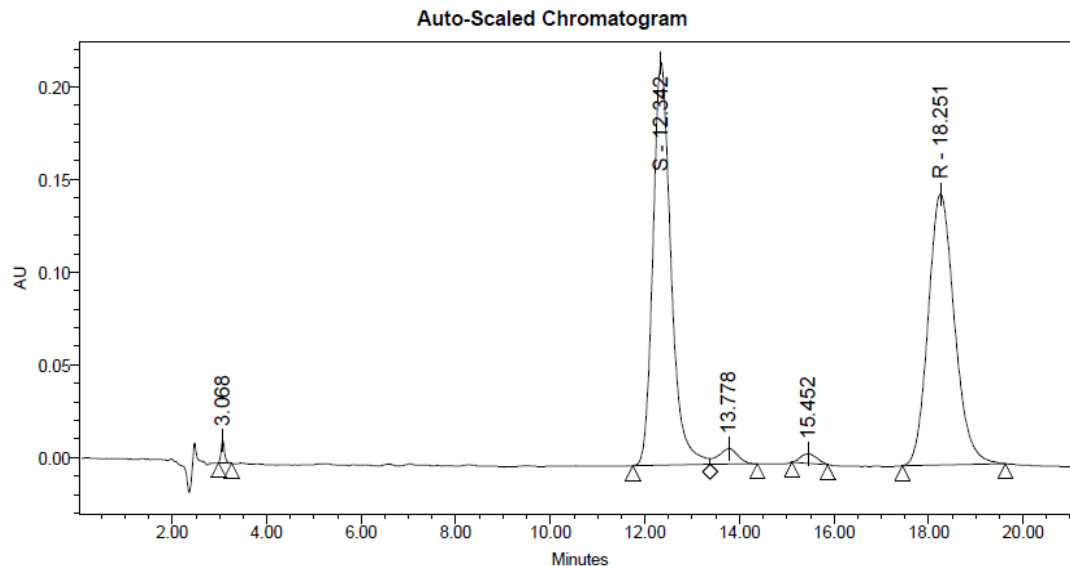
Στις συνθήκες της μεθόδου E2, γίνεται προσπάθεια να αυξηθεί ο χρόνος της ανάλυσης και να ελεγχθεί εάν βελτιώνεται με τον τρόπο αυτό ο διαχωρισμός των προϊόντων διάσπασης και των εναντιομερών. Η προσθήκη μικρής ποσότητας n-εξανίου στην κινητή φάση έδωσε το χρωματογράφημα του σχήματος IA.2.5.



Σχήμα ΙΑ.2.5. Χρωματογράφημα διαχωρισμού εναντιομερών καρβενδιλόλης από δείγμα φωτοαποικοδομημένο για 3 h με τη μεθανόλη ως διαλύτη. (Μέθοδος Ε2, ενισχυμένη κινητή φάση σε n-εξάνιο)

Η τροποποίηση αυτή της κινητής φάσης δεν μετέβαλε επιθυμητά τους χρόνους συγκράτησης των κορυφών, αντενδεικνύοντας την αύξηση του n-εξανίου στη σύστασή της.

Η αντίθετη κίνηση, η αύξηση της αιθανόλης στην κινητή φάση της μεθόδου Ε2, διαχώρισε ακόμα καλύτερα τις κορυφές που εμφανίζονται στο μερικώς φωτοαποικοδομημένο διάλυμα της καρβενδιλόλης, όπως φαίνεται στο σχήμα ΙΑ.2.6.



Σχήμα IA.2.6. Χρωματογράφημα διαχωρισμού εναντιομερών καρβεδιλόλης από δείγμα φωτοαποικοδομημένο για 3 h με τη μεθανόλη ως διαλύτη. (Μέθοδος E2, ενισχυμένη κινητή φάση σε αιθανόλη)

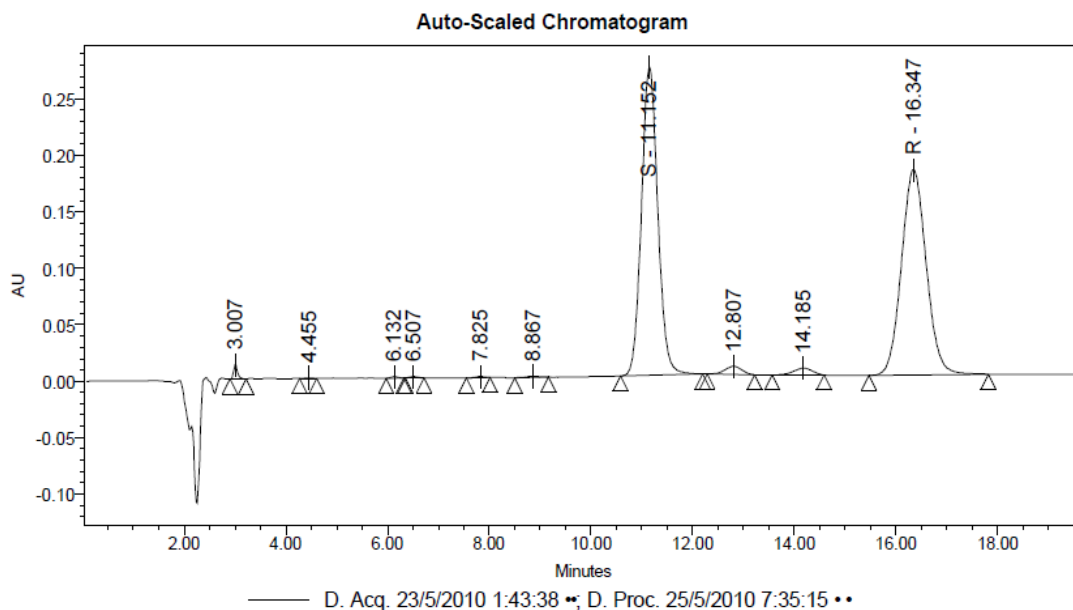
ΒΗΜΑ 3^ο

Η ενίσχυση της αιθανόλης βελτίωσε τον διαχωρισμό, είναι ενδιαφέρουσα και επιθυμητή. Σκοπός είναι να υπάρξει βελτίωση από την χρήση της αιθανόλης, χωρίς όμως να αυξηθεί σημαντικά ο χρόνος έκλουσης των εναντιομερών. Με το σκεπτικό αυτό, αυξάνεται το ποσοστό της αιθανόλης στην κινητή φάση, εις βάρος του αντίστοιχου ποσοστού ισοπροπανόλης. Το ποσοστό του n-εξανίου διατηρείται σταθερό διότι επηρεάζει πολύ περισσότερο από τους υπόλοιπους διαλύτες τη διάρκεια της χρωματογραφικής ανάλυσης.

Συνθήκες E3

- Στήλη Chiralpak 4,6×150 mm AD-H, 5μm
- Θερμοκρασία στήλης 40 °C
- Κινητή φάση: n-εξάνιο/ ισοπροπανόλη / αιθανόλη/ διαιθυλαμίνη 75/15/10/1 v/v
- Ροή κινητής φάσης 1,0 mL/min (πίεση 683 psi)
- Ανιχνευτής συστοιχίας διόδων υπεριώδους-ορατού στα 244 nm.

Ο διαχωρισμός που επιτυγχάνεται είναι ικανοποιητικός, όπως φαίνεται στο χρωματογράφημα του σχήματος ΙΑ.2.7, και η μέθοδος αυτή επιλέγεται για την παρακολούθηση της πορείας της φωτοεπαγόμενη αποικοδόμησης των εναντιομερών της καρβεδιλόλης.



Σχήμα ΙΑ.2.7. Χρωματογράφημα διαχωρισμού εναντιομερών καρβεδιλόλης από δείγμα φωτοαποικοδομημένο για 3 h με τη μεθανόλη ως διαλύτη. (Μέθοδος Ε3)

Η βιβλιογραφία από την οποία εφαρμόστηκε και τροποποιήθηκε η χρωματογραφική μέθοδος, αναφέρει ως S και μετά R, την σειρά έκλουσης των εναντιομερών. Οι συνολικές αλλαγές που έγιναν στη μέθοδο δεν είναι τόσο έντονες και θεωρείται πως δεν έχουν επηρεάσει τους χρόνους, επιτρέποντας στο S-επιμερές να εκλούεται στα 11,1 min και στο R-επιμερές στα 16,3 min. Ο ισχυρισμός αυτός χρειάζεται επαλήθευση αλλά δεν υπάρχει στο εργαστήριο μεμονωμένο κανένα από τα δυο επιμερή. Προσωρινά αναβάλλεται και εάν στην πορεία παρατηρηθεί κάποια συμπεριφορά που να διαφοροποιεί την φωτοχημική αποικοδόμηση των επιμερών, θα πρέπει να γίνει η επιβεβαίωση αυτή.

ΙΑ.2.2. Εκτίμηση της φωτοχημικής αποικοδόμησης των επιμερών της καρβεδιλόλης για μικρό χρονικό διάστημα

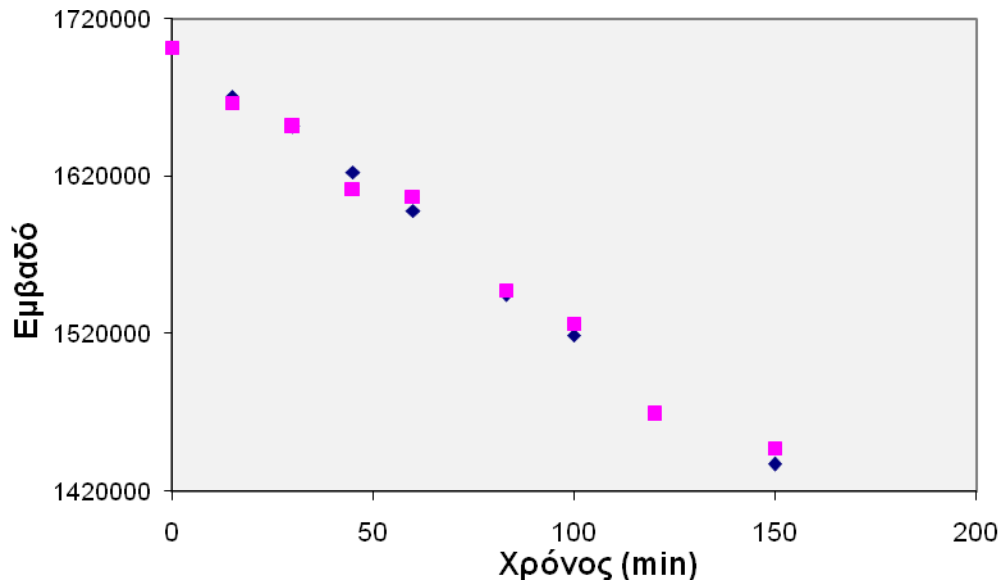
Ζυγίζονται 12,9 mg καρβεδιλόλης ($3,17 \times 10^{-5}$ mol) σε ογκομετρική φιάλη και αραιώνεται μέχρι τα 50,0 mL με μεθανόλη. Στη συνέχεια, 10,0 mL από το διάλυμα αυτό μεταφέρονται σε νέα ογκομετρική φιάλη και αραιώνονται μέχρι τα 50,0 mL με τον ίδιο διαλύτη ($1,27 \times 10^{-4}$ M). Μεταφέρονται από 4,0 mL του διαλύματος στις 4 κυψελίδες εργασίας και υφίστανται ακτινοβολία λυχνίας τόξου αερίου Ξένου για συνολικά 150 min. Η συχνότητα των δειγματοληψιών είναι 15-20 min και από κάθε κυψελίδα πραγματοποιούνται μέχρι 2 δειγματοληψίες των 500 μ L.

10 μ L από το δείγμα κάθε χρονικής στιγμής, εισάγονται στο χρωματογράφο και λαμβάνονται τα αποτελέσματα, σε εμβαδά των I και II εναντιομερών της καρβεδιλόλης. Παράλληλα, παρακολουθούνται τα εμβαδά των δύο κορυφών που εμφανίζονται μεταξύ των εναντιομερών και αυξάνονται κατά τη φωτοαποικοδόμηση. Όλα τα αποτελέσματα, τα εμβαδά των κορυφών σε κάθε χρονική στιγμή, βρίσκονται στον πίνακα 1.

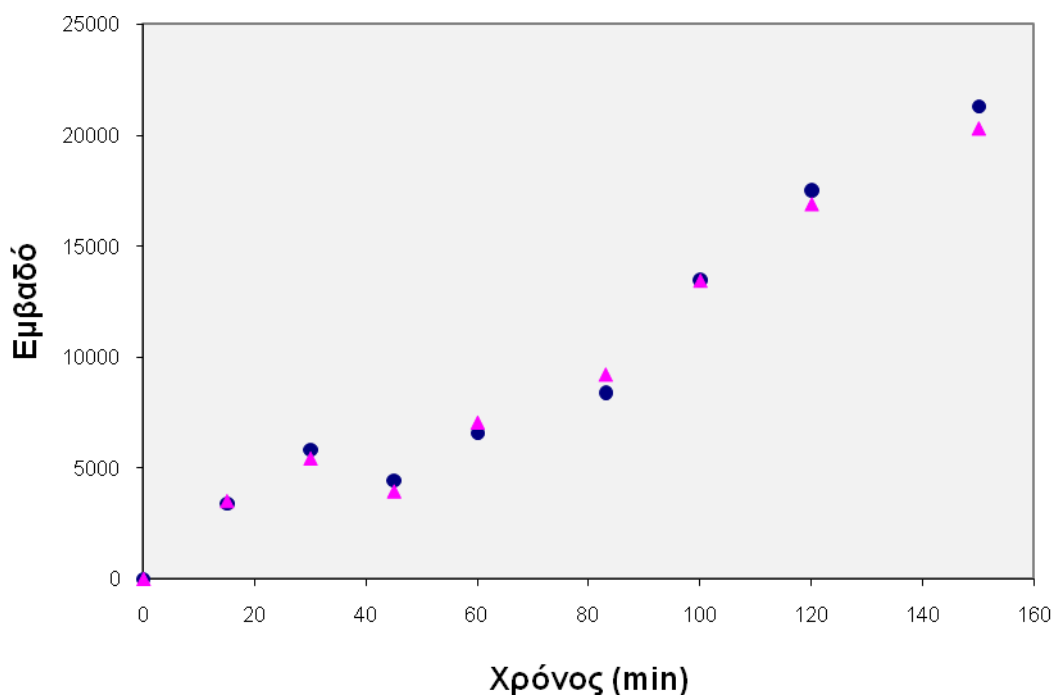
Σχόλιο: Στο παραπάνω πείραμα, η παρακολούθηση των εναντιομερών της καρβεδιλόλης πραγματοποιήθηκε όχι με την παρουσία κάποιου πρότυπου (ρακεμικής καρβεδιλόλης και γνωστής συγκέντρωσης διαλύματος) αλλά συγκρίνοντας τα εμβαδά των κορυφών με αυτά της αρχικής χρονικής στιγμής.

Πίνακας ΙΑ.2.1. Αποτελέσματα παρακολούθησης εναντιομερών κατά τη φωτοχημική διάσπαση $1,27 \times 10^{-4}$ M μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης, σε κυψελίδα όγκου 4 mL και ενέργεια ακτινοβολίας 750 W/m^2

	Διάρκεια ακτινοβολίας(min)								
	0	15	30	45	60	83	100	120	150
Εναντιομερές I (10,95 min)	1701837	1670714	1651585	1622543	1598236	1544885	1518993	1469390	1437071
Εναντιομερές II (16,04 min)	1701822	1666645	1651489	1612159	1607352	1547631	1526338	1469013	1447327
Λόγος I/II	1,000	1,002	1,000	1,006	0,994	0,998	0,995	1,000	0,993
Προϊόν Αποικοδόμησης A (12,6 min)	0	3417,5	5846,5	4446,5	6587,5	8412,5	13485	17538	21318,5
Προϊόν Αποικοδόμησης B (13,9 min)	0	3511	5432,5	3948,5	7050	9219	13452	16905,5	20315,5



Σχήμα ΙΑ.2.8. Παρακολούθησης των εναντιομερών της καρβεδιλόλης σε συνάρτηση με τον χρόνο, κατά τη φωτοεπαγόμενη αποικοδόμηση μεθανολικού διαλύματος $1,27 \times 10^{-4}$ M. ■ R- καρβεδιλόλη, ◆ S- καρβεδιλόλη



Σχήμα ΙΑ.2.9. Παρακολούθησης της εμφάνισης δυο προϊόντων φωτοχημικής αποικοδόμησης της καρβενδιλόλης σε χρόνους 12,6 min (●) και 13,9 min (▲), κατά τη φωτοεπαγόμενη αποικοδόμηση μεθανολικού διαλύματος $1,27 \times 10^{-4}$ M.

Αποτελέσματα - Συζήτηση

Η παρακολούθηση της φωτοχημικής αποικοδόμησης των εναντιομερών της καρβενδιλόλης και των εμφανιζόμενων προϊόντων θα πρέπει να γίνει για χρονικό διάστημα ικανό να εκτιμηθεί η τάξη της κινητικής που ακολουθεί η αποικοδόμηση. Παράλληλα, τα εμβαδά των κορυφών θα γίνει προσπάθεια να αντιστοιχηθούν σε συγκεντρώσεις.

ΙΑ.2.3. Παρακολούθηση φωτοχημικής αποικοδόμησης μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης για χρόνο ίσο με $t_{1/2}$

Στη χρωματογραφία αντιστρόφου φάσης, η εμφάνιση του χρωματογραφήματος είναι πολύ διαφορετική από αυτή της κανονικής φάσης, όσο αφορά στα προϊόντα φωτοεπαγόμενη αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης. Θα ήταν λοιπόν, ενδιαφέρον να παρακολουθηθεί η φωτοεπαγόμενη αποικοδόμηση των διαλυμάτων παράλληλα με τη χρωματογραφική μέθοδο αντιστρόφου φάσης, με την οποία έχουν πραγματοποιηθεί όλες οι μελέτες της καρβεδιλόλης για χρόνο ίσο με την ημίσεια ζωή του διαλύματος.

Ο διαλύτης που θα χρησιμοποιηθεί σε όλα τα διαλύματα θα πρέπει να είναι συμβατός και με τις δυο χρωματογραφικές μεθόδους, οπότε παραμένει η καθαρή μεθανόλη.

Παρασκευή διαλυμάτων καμπύλης αναφοράς

26,2 mg ($6,45 \times 10^{-5}$ mol) και 16,5 mg ($4,06 \times 10^{-5}$ mol) πρότυπης καρβεδιλόλης (98,7 %) μεταφέρονται σε φιάλες των 50,0 mL και αραιώνονται μέχρι χαραγής με μεθανόλη ($12,89$ και $8,12 \times 10^{-4}$ M αντίστοιχα).

Από τα διαλύματα αυτά παρασκευάζονται 6 διαλύματα συγκεντρώσεων από $2,58$ έως $10,31 \times 10^{-5}$ M τα οποία χρησιμοποιούνται για τις καμπύλες αναφοράς.

Σε κάθε μια από τις δυο χρωματογραφικές μεθόδους, από τα ίδια διαλύματα προκύπτουν οι καμπύλες αναφοράς.

Φωτοχημική αποικοδόμηση

Ζυγίζονται 25,5 mg καρβεδιλόλης ($6,27 \times 10^{-5}$ mol) σε ογκομετρική φιάλη των 50,0 mL και αραιώνονται μέχρι όγκου με μεθανόλη (Διάλυμα I). Στη συνέχεια 5,0 mL από το διάλυμα μεταφέρονται σε νέα ογκομετρική φιάλη των 100,0 mL και αραιώνονται μέχρι όγκου με τον ίδιο διαλύτη ($6,27 \times 10^{-5}$ M, διάλυμα II).

Μεταφέρονται από 4,0 mL του διαλύματος II σε 2 κυβελίδες εργασίας και υφίστανται ακτινοβολία λυχνίας τόξου αερίου Ξένου για 1 και 2 h αντίστοιχα. Την

προγραμματισμένη χρονική στιγμή, το περιεχόμενο της κάθε κυψελίδας αποθηκεύεται ενώ η ίδια ξεπλένεται και η κυψελίδα συμπληρώνεται εκ νέου με 4,0 mL του μη φωτολυμένου αρχικού διαλύματος. Η φωτοχημική αποικοδόμηση συνεχίζεται για 3 και 4 h αντίστοιχα. Επαναλαμβάνεται η απομάκρυνση των κυψελίδων, η διαφύλαξη των περιεχόμενων διαλυμάτων και η εκ νέου πλήρωσή τους μέχρι την ολοκλήρωση του πρωτοκόλλου, 14 διαλύματα καρβεδιλόλης που να έχουν διαδοχικά δεχθεί 1 h παραπάνω ακτινοβολία.

Για τη χειρόμορφη χρωματογραφία, δεν πραγματοποιείται καμία αραίωση των δειγμάτων της κάθε δειγματοληψίας και ο όγκος εισαγωγής παραμένει μικρός, όπως επιτάσσουν οι προδιαγραφές της στήλης.

Στη χρωματογραφία αντιστρόφου φάσης, για κάθε ένα από τα δείγματα, παρασκευάζονται τα διαλύματα που εισάγονται στο χρωματογράφο πραγματοποιώντας την ακόλουθη αραίωση: 200 μL δείγματος αραιώνονται με 900 μL του ρυθμιστικού διαλύματος της κινητής φάσης, σε φιαλίδιο της HPLC.

Παρακολούθηση Χρωματογραφίας

Στους πίνακες που ακολουθούν, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της φωτοεπαγόμενης αποικοδόμησης ανά χρωματογραφία.

Πίνακας ΙΑ.2.2: Αποτελέσματα παρακολούθησης με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης της φωτοχημικής διάσπασης $6,27 \times 10^{-5}$ M μεθανολικού διαλύματος ρακεμικής καρβεδιλόλης, σε κυψελίδα όγκου 4 mL και ενέργεια ακτινοβολίας 750 W/m^2

	Διάρκεια ακτινοβολίας (h)	Εμβαδό κορυφής HPLC	Συγκέντρωση καρβεδιλόλης (10^{-5} M)	% αρχικής συγκέντρωσης
1	0	1830510	6,212	100,00
2	1	1686269,2	5,720	92,08
3	3	1589457	5,390	86,77
4	4	1537198,3	5,212	83,90
5	5	1452895,7	4,924	79,27
6	7	1393068,6	4,720	75,98
7	8	1290055,5	4,369	70,33
8	9	1263564,8	4,279	68,87
9	10	1174565,8	3,975	63,99
10	11	1148652,3	3,887	62,56
11	12	1192304,5	4,035	64,96
12	14	1030273,8	3,483	56,07

Πίνακας ΙΑ.2.3. Αποτελέσματα παρακολούθησης εναντιομερών κατά τη φωτοχημική διάσπαση $6,27 \times 10^{-5}$ M μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης, σε κυψελίδα όγκου 4 mL και ακτινοβολία 750 W/m²

	Κυψελίδα	Διάρκεια ακτινοβολίας (h)	Εμβαδό HPLC κορυφών επιμερών		Συγκέντρωση επιμερών καρβεδιλόλης (10 ⁻⁵ M)		% αρχικής συγκέντρωσης		Εμβαδό κορυφής HPLC S+R	Συγκέντρωση καρβεδιλόλης (10 ⁻⁵ M) S+R	% αρχικής συγκέντρωσης S+R
			S	R	S	R	S	R			
1	-	0	636974,7	616809,6	3,653	3,563	100,00	100,00	1253784,3	6,407	100,00
2	2	1	597745,0	570837,6	3,478	3,358	95,21	94,24	1168582,6	6,026	94,06
3	1	2	556529,4	537271,7	3,294	3,208	90,17	90,04	1093801,1	5,692	88,85
4	1	3	526700,3	498013,7	3,161	3,033	86,53	85,12	1024714,0	5,384	84,04
5	2	4	499418,0	500718,8	3,039	3,045	83,19	85,46	1000136,8	5,274	82,33
6	2	5	460946,9	442953,7	2,867	2,787	78,49	78,22	903900,6	4,845	75,62
7	1	6	417666,9	402040,6	2,674	2,604	73,20	73,09	819707,5	4,469	69,75
8	2	7	417298,6	401862,2	2,673	2,604	73,16	73,07	819160,8	4,466	69,72
9	1	8	373059,3	349921,1	2,475	2,372	67,75	66,56	722980,4	4,037	63,02
10	1	9	375081,1	353146,1	2,484	2,386	68,00	66,97	728227,2	4,061	63,38
11	2	10	329877,7	326180,6	2,282	2,266	62,48	63,59	656058,3	3,738	58,35
12	1	11	285825,6	265370,7	2,086	1,994	57,09	55,97	551196,3	3,270	51,05
13	2	12	300504,8	279046,2	2,151	2,055	58,89	57,69	579551,0	3,397	53,02
14	2	14	236869,0	216079,5	1,867	1,774	51,11	49,80	452948,5	2,832	29,61

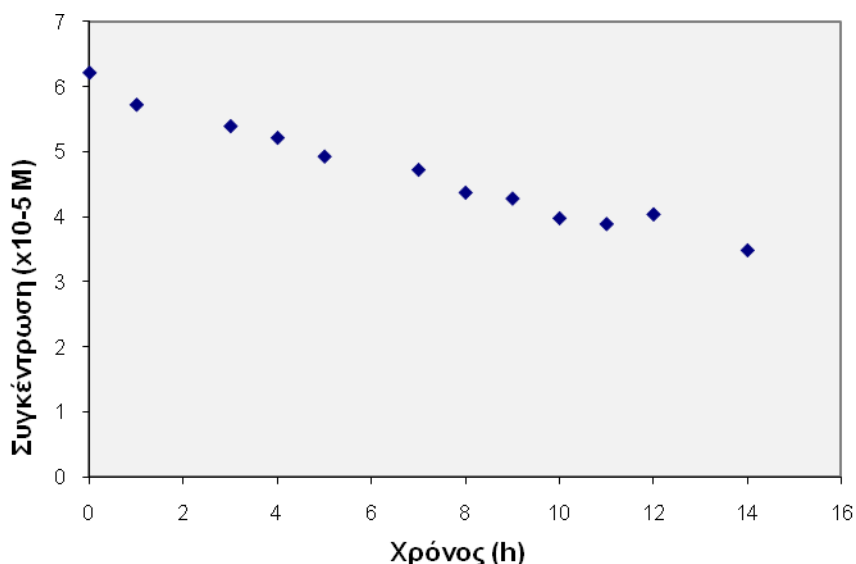
Υπολογισμοί και Αποτελέσματα

Από τα πρότυπα διαλύματα προκύπτει, για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων των δειγμάτων σε καρβεδιλόλη στη χρωματογραφία αντιστρόφου φάσης η εξίσωση:

$$C = 3,411 \times 10^{-11} \times [\text{εμβαδό}] - 3,103 \times 10^{-7} \quad (R^2=0,9998)$$

Από την παρακολούθηση της φωτοεπαγόμενη αποικοδόμησης, προκύπτει το σχήμα ΙΑ.2.10 και ο ρυθμός μείωσης της συγκέντρωσης της ακέραιης καρβεδιλόλης προκύπτει από την κλίση της ευθείας και είναι

$$k_{(6,2 \times 10^{-5} \text{ M})} = 1,83 (\pm 0,22) \times 10^{-6} \text{ M h}^{-1}$$



Σχήμα ΙΑ.2.10. Διάγραμμα παρακολούθησης της μεταβολής της συγκέντρωσης R+S εναντιομερών, σε συνάρτηση με τον χρόνο, κατά τη φωτοεπαγόμενη αποικοδόμηση μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης $6,27 \times 10^{-5} \text{ M}$, με χρωματογραφία αντιστροφής φάσης.

Στη χειρόμορφη χρωματογραφία, θεωρώντας πως τα δυο εναντιομερή έχουν τον ίδιο συντελεστή απορρόφησης στο μήκος κύματος της χρωματογραφικής

ανάλυσης, χρησιμοποιείται ως εμβαδό το άθροισμα των εμβαδών των δυο κορυφών, και προκύπτει η εξίσωση:

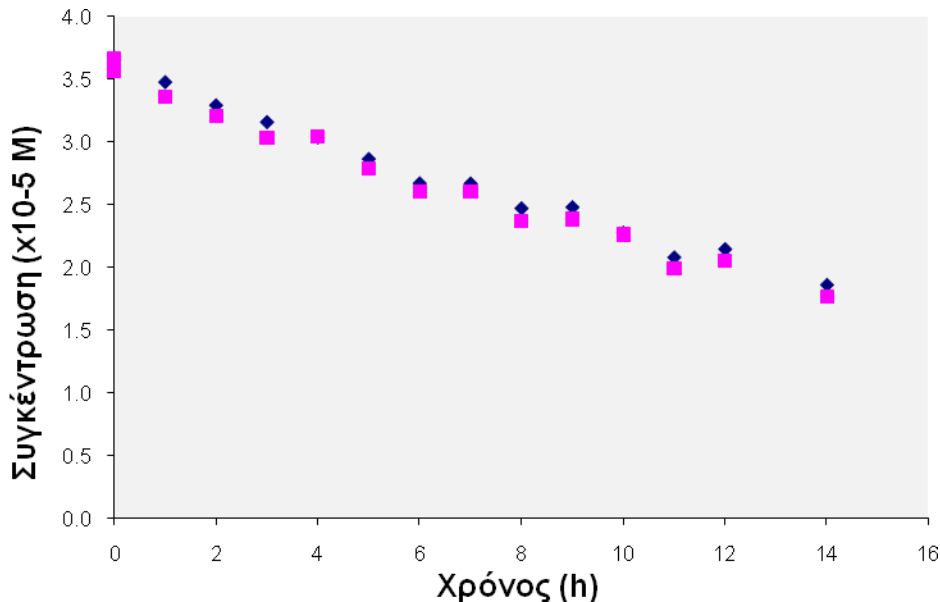
$$C = 4,463 \times 10^{-11} \times [\text{εμβαδό}] + 8,098 \times 10^{-6} \quad (R^2=0,999)$$

Από την παρακολούθηση της φωτοεπαγόμενη αποικοδόμησης για το κάθε εναντιομερές, προκύπτει το σχήμα IA.2.11 ενώ για το ρακεμικό μίγμα (άθροισμα εναντιομερών) το σχήμα IA.2.12. Σύμφωνα με τις γραφικές απεικονίσεις, η μείωση της συγκέντρωσης της καρβεδιλόλης σε συνάρτηση με τον χρόνο ακολουθεί μηδενοταξική κινητική και οι αντίστοιχες ταχύτητες δίνονται από την κλίση των ευθειών:

$$k_{nS+R(6,2 \times 10^{-5} M)} = 2,50 (\pm 0,20) \times 10^{-6} M h^{-1}$$

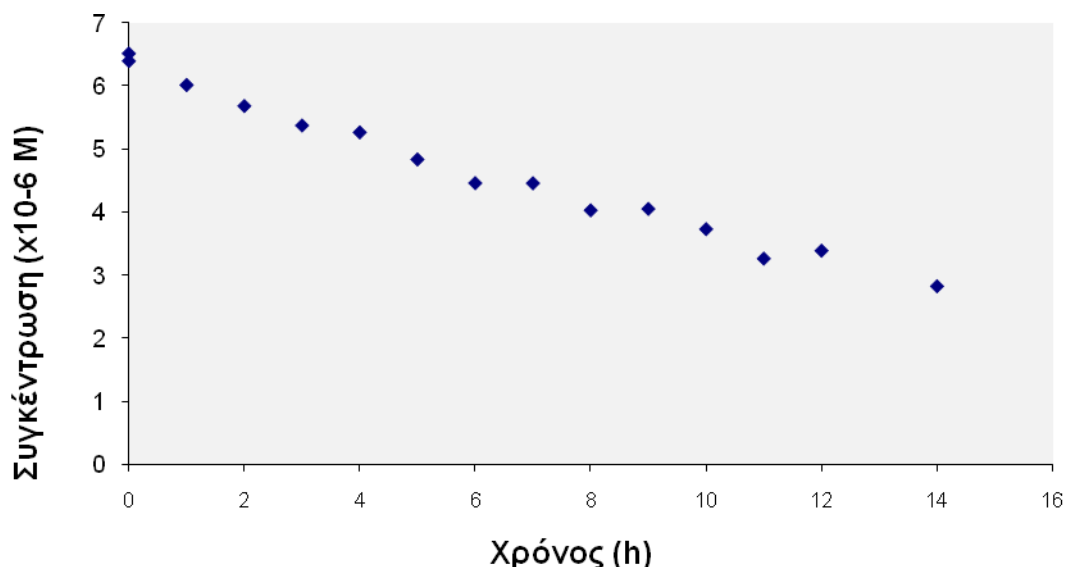
$$k_{nS(6,2 \times 10^{-5} M)} = 1,25 (\pm 0,10) \times 10^{-6} M h^{-1}$$

$$k_{nR(6,2 \times 10^{-5} M)} = 1,25 (\pm 0,11) \times 10^{-6} M h^{-1}$$



Σχήμα IA.2.11. Διάγραμμα παρακολούθησης της συγκέντρωσης των επιμερών της καρβεδιλόλης

(■ R- καρβεδιλόλη , ◆ S- καρβεδιλόλη) σε συνάρτηση με τον χρόνο, κατά τη φωτοεπαγόμενη αποικοδόμηση μεθανολικού διαλύματος αρχικής συγκέντρωσης ρακεμικού μίγματος $6,27 \times 10^{-5} M$, με χειρόμορφη χρωματογραφία.



Σχήμα ΙΑ.2.12. Διάγραμμα παρακολούθηση της συγκέντρωσης του αθροίσματος των επιμερών της καρβεδιλόλης σε σχέση με τον χρόνο, κατά τη φωτοεπαγόμενη αποικοδόμηση μεθανολικού διαλύματος αρχικής συγκέντρωσης ρακεμικού μίγματος $6,27 \times 10^{-5} \text{M}$, με χειρόμορφη χρωματογραφία.

Σχόλια

Η χρωματογραφική μέθοδος κανονικής φάσης, που διαχωρίζει τα S και R, δεν έχει επικυρωθεί, καθότι αυτό θα απαιτούσε την αντιμετώπιση των δυο επιμερών ως δυο ανεξάρτητων ουσιών, γεγονός που αναβάλλεται καθώς η αγορά τέτοιων προτύπων έχει υψηλό κόστος, θα πραγματοποιηθεί όμως εάν προσδιοριστεί διαφορετική συμπεριφορά στα R και S.. Έτσι, προσωρινά, χρησιμοποιείται για τους υπολογισμούς των εναντιομερών η καμπύλη που προκύπτει από το άθροισμα των εμβαδών των 2 επιμερών στα διαλύματα της πρότυπης καρβεδιλόλης.

ΙΑ.2.4. Αποτελέσματα - Συμπεράσματα

Τα δεδομένα που παρατίθενται στον πίνακα 1, δίνουν τις ακόλουθες βασικές πληροφορίες για τη χρωματογραφική παρακολούθηση των εναντιομερών στη φωτοεπαγόμενη αποικοδόμηση μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης:

- Στο ρακεμικό διάλυμα της καρβεδιλόλης, όπως είναι αναμενόμενο, η αναλογία των εμβαδών των δυο εναντιομερών είναι 1.
- Τα εναντιομερή, στις δυο πρώτες ώρες της ακτινοβολίας, αποικοδομούνται παράλληλα, διατηρώντας την αναλογία τους σταθερή και ίση με 1 (σχήμα ΙΑ.2.8).
- Εμφανίζονται δυο προϊόντα διάσπασης των οποίων τα εμβαδά αυξάνονται και αυτά παράλληλα (σχήμα ΙΑ.2.9).

Τα συμπεράσματα αυτά επιβεβαιώνονται με την δεύτερη παρακολούθηση της φωτοχημικής αποικοδόμησης των επιμερών της καρβεδιλόλης και εμπλουτίζονται με τα εξής:

- Κατά τις 14 πρώτες ώρες η φωτοαποικοδόμηση ακολουθεί κινητική μηδενοταξική για το κάθε εναντιομερές της καρβεδιλόλης.
- Καθόλη τη διάρκεια της διαδικασίας, ο λόγος των εμβαδών των δυο εναντιομερών παραμένει σταθερός.

Κατά τους *Chen et al.*, τα διμερή που έχουν βρεθεί στην κρυσταλλική μορφή της καρβεδιλόλης, αποτελούνται από ζεύγη εναντιομερών.

ΙΑ.3. Παρακολούθηση της φωτοχημικής αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης σε μεθανολικά διαλύματα

Η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης του δείγματος προκαλεί μεταβολές στην σταθερά ταχύτητας φωτοαποικοδόμησης των δραστικών μορίων. Σύμφωνα με τα μέχρι τώρα ερευνητικά αποτελέσματα, άλλοτε προκαλεί επιβράδυνση η οποία ερμηνεύεται ως αποτέλεσμα των φαινομένων εσωτερικού φίλτρου ή και ως αποτέλεσμα εντονότερου φαινομένου απόσβεσης που προκύπτει συχνά από σχηματισμό διμερών ή άλλου είδους συσσωματωμάτων. Άλλοτε προκαλεί επιτάχυνση των φωτοχημικών διεργασιών που αποδομούν το δραστικό συστατικό. Η επιτάχυνση αποδίδεται συνήθως σε καταλυτική δράση κάποιων προϊόντων αποικοδόμησης αλλά και διαμοριακών αλληλεπιδράσεων, το πλήθος των οποίων αυξάνεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις.

ΙΑ.3.1. Επίδραση αρχικής συγκέντρωσης του δείγματος στην ταχύτητα των φωτοχημικών διεργασιών

Σκοπός του πειράματος είναι να παρακολουθηθεί η φωτοχημική αποικοδόμηση της καρβεδιλόλης σε εννέα διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων, να υπολογισθούν και να συγκριθούν οι σταθερές ταχύτητας της αποικοδόμησης.

Τα επίπεδα συγκεντρώσεων που επιλέγονται διαφέρουν σε τάξη μεγέθους και κυμαίνονται από $1,10 \times 10^{-2}$ έως και $1,03 \times 10^{-6}$ M. Η αυξημένη δυσδιαλυτότητα της καρβεδιλόλης στο νερό υποχρεώνει τη χρήση οργανικού διαλύτη και η μεθανόλη επιλέγεται να χρησιμοποιηθεί ως καταλληλότερη.

Συγκεκριμένα, παρακολουθείται η αποικοδόμηση της καρβεδιλόλης στα διαλύματα με αρχική συγκέντρωση

- $1,10 \times 10^{-2}$ M
- $9,94 \times 10^{-4}$ M
- $1,09 \times 10^{-4}$ M
- $1,13 \times 10^{-5}$ M
- $1,03 \times 10^{-6}$ M
- $2,14 \times 10^{-6}$ M
- $3,92 \times 10^{-6}$ M

Κάθε διαφορετική ημέρα πειραμάτων, παρασκευάζεται καμπύλη αναφοράς με πρότυπη ουσία καρβεδιλόλης (M.B. 406,474) καθαρότητας 99,7 %. Στις περιπτώσεις χρήσης πρότυπης ουσίας διαφορετικής καθαρότητας, αυτή αναφέρεται. Η εξίσωση που προκύπτει είναι διαφορετική κάθε φορά και χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της συγκέντρωσης της εναπομείνουσας ουσίας στο διάλυμα.

ΙΑ.3.2. Μελέτη φωτοχημικής αποικοδόμησης μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης με αρχική συγκέντρωση $1,1 \times 10^{-2}$ M

Παρασκευή διαλυμάτων καμπύλης αναφοράς

Ζυγίζονται με ακρίβεια 19,0 mg ($4,66 \times 10^{-5}$ mol) της ουσίας και αραιώνονται στα 25,0 mL με μεθανόλη. Από το διάλυμα αυτό και με τις κατάλληλες αραιώσεις, παρασκευάζονται τα ακόλουθα 5 διαλύματα συγκεντρώσεων : $5,25 \times 10^{-6}$ M, 1,05, 1,58, 2,36 και $2,63 \times 10^{-5}$ M, τα οποία θα επιτρέπουν την χρωματογραφική παρακολούθηση της συγκέντρωσης της καρβεδιλόλης σε όλα τα δείγματα που θα παρασκευαστούν.

Για την παρακολούθηση της εμφάνισης των προϊόντων φωτοχημικής αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης, από το παραπάνω αρχικό διάλυμα παρασκευάζονται 2 διαλύματα συγκεντρώσεων 1,95 και $3,28 \times 10^{-5}$ M.

Φωτοχημική αποικοδόμηση

Ζυγίζονται 89,5 mg της δραστικής ουσίας ($2,20 \times 10^{-4}$ mol). Έπειτα διαλύονται σε 20,0 mL μεθανόλης (διάλυμα $1,10 \times 10^{-2}$ M). Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται ως μηδενικό δείγμα για τον έλεγχο της συγκέντρωσης της καρβεδιλόλης πριν τη διαδικασία της φωτόλυσης και από αυτό μεταφέρονται από 4,0 mL σε κάθε μια από τις 3 κυψελίδες (1, 2 και 3). Οι κυψελίδες πωματίζονται και μεταφέρονται στον θάλαμο της συσκευής Atlas-Suntest και υφίστανται ακτινοβολία. Από κάθε κυψελίδα γίνονται μέχρι και δύο δειγματοληψίες στις προσχεδιασμένες χρονικές στιγμές, προς αποφυγή της σημαντικής μεταβολής του όγκου του περιεχόμενου διαλύματος. Η κάθε δειγματοληψία αφορά απομάκρυνση 100 μ L και με αυτά, παρασκευάζεται το διάλυμα για τη

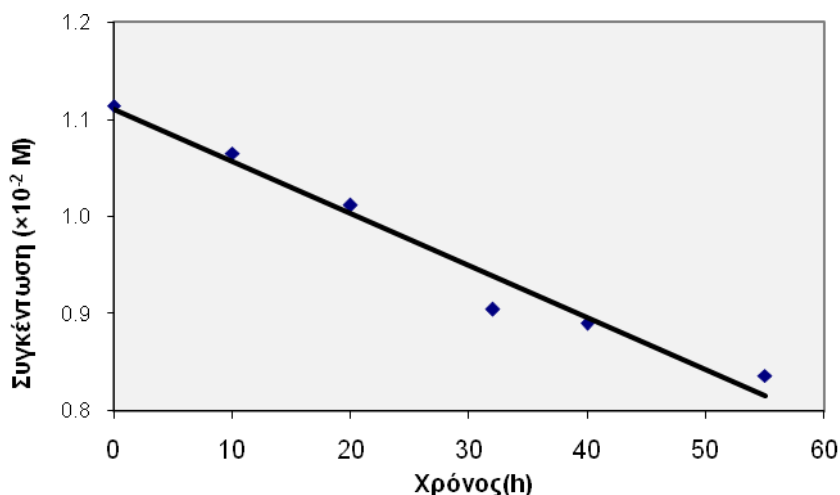
χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιώντας τις ακόλουθες αραιώσεις: τα 100 μL αραιώνονται με 1400 μL κινητής φάσης και το διάλυμα χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση των προϊόντων Φωτοχημικής αποικοδόμησης. 20 μL από το προηγούμενο διάλυμα μεταφέρονται σε φιαλίδιο αυτόματου HPLC δειγματολήπτη το οποίο περιέχει 1400 μL . Η τελική συγκέντρωση του δείγματος που χρησιμοποιείται στη χρωματογραφική ανάλυση για την παρακολούθηση της μεταβολής της συγκέντρωσης της καρβεδιλόλης αντιστοιχεί σε συγκέντρωση $1,03 \times 10^{-5}$ M.

Υπολογισμοί και Αποτελέσματα

Για την παρακολούθηση της συγκέντρωσης της καρβεδιλόλης, καταγράφονται τα εμβαδά των κορυφών στα 5 πρότυπα διαλύματα. Η συσχέτισή τους τις γνωστές συγκεντρώσεις τους δίνει η εξίσωση

$$C = 7,230 \times 10^{-11} \times [\text{εμβαδό}] + 3,207 \times 10^{-7} \quad R^2 = 0,996$$

Από την παρακολούθηση της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με το χρόνο προκύπτει το γράφημα του σχήματος IA.3.1.



Σχήμα IA.3.1.2 Διάγραμμα παρακολούθησης της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με το χρόνο, κατά τη φωτοεπαγόμενη αποικοδόμηση μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης $1,1 \times 10^{-2}$ M, σε κυψελίδα όγκου 4 mL και με ένταση ακτινοβολίας 750 W/m^2 .

Από τα πειραματικά δεδομένα, εκτιμάται πως η φωτοχημικά ενεργοποιημένη αποικοδόμηση μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης $1,1 \times 10^{-2}$ M, ακολουθεί για τις πρώτες 50 ώρες μηδενοταξική κινητική (σχήμα ΙΑ.3.1). Από την κλίση της ευθείας που απεικονίζει τα πειραματικά δεδομένα, υπολογίζεται η σταθερά ταχύτητας της αποικοδόμησης.

$$C_M = -5,36 (\pm 1,21) \times 10^{-5} \times [\text{χρόνος}] + 1,11 (\pm 0,04) \times 10^{-2} \quad R^2 = 0,97$$

$$k_{(10^{-2})} = -(\text{κλίση}) \quad \Rightarrow \quad k_{(10^{-2})} = 5,36 (\pm 1,20 \times 10^{-5}) \text{ M} \cdot \text{h}^{-1}$$

Για την παρακολούθηση της εμφάνισης των προϊόντων φωτοχημικής διάσπασης της καρβεδιλόλης, χρησιμοποιούνται τα εμβαδά των 2 πρότυπων διαλυμάτων $1,95$ και $3,28 \times 10^{-5}$ M, 2454604 και 3797925 αντίστοιχα.

Καταγράφονται και ολοκληρώνονται όλα τα χρωματογραφήματα των 5 δειγμάτων και υπολογίζεται το % της κάθε εμφανιζόμενης κορυφής σε συνάρτηση με την αρχική συγκέντρωση. Στον πίνακα που ακολουθεί καταγράφονται τα αποτελέσματα για τις χρωματογραφικές κορυφές που ξεπερνούν το 0,05 % και αυξάνονται με τον χρόνο.

Πίνακας ΙΑ.3.1. Συγκεντρώσεις κύριων προϊόντων διάσπασης κατά τη φωτοχημική αποικοδόμηση μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης, $1,1 \times 10^{-2}$ M, σε κυψελίδα όγκου 4 mL και με ένταση ακτινοβολίας 750 W/m^2

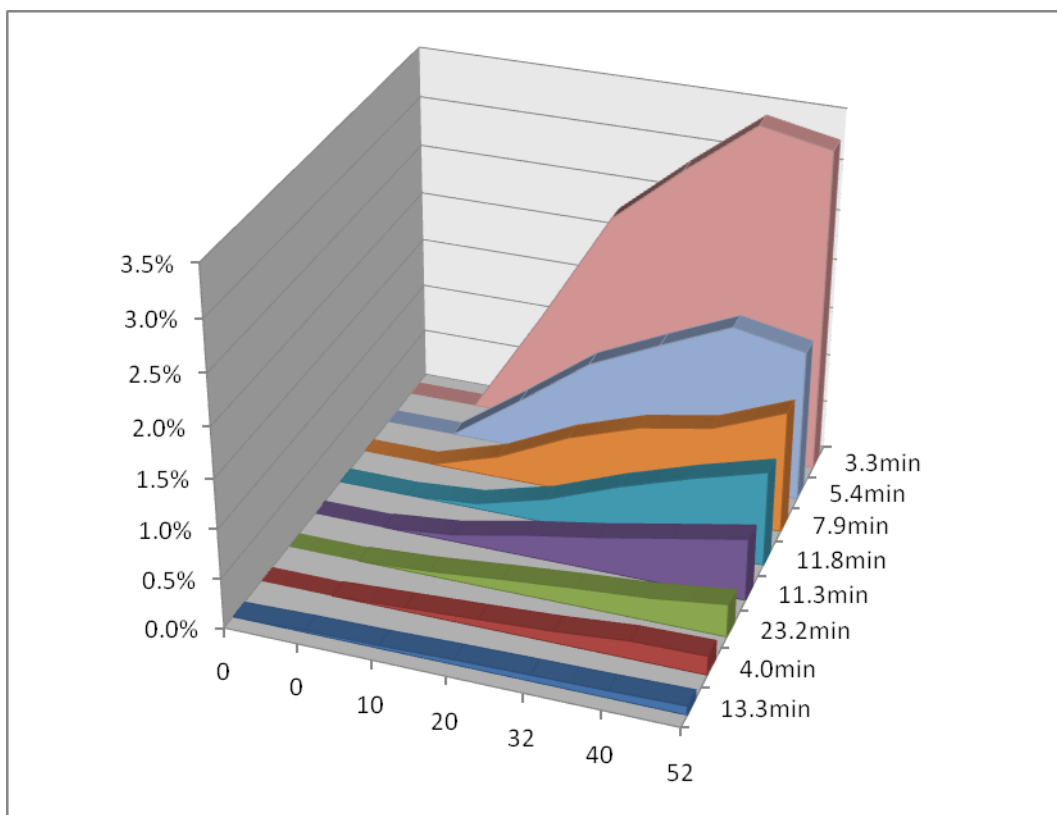
Χρόνος έκθεσης	Περιεκτικότητα προϊόντος διάσπασης (%)					
	0	10	20	32	40	52
3,3 min	0,00	1,09	2,25	2,85	3,40	3,26
4,0 min	0,00	0,04	0,08	0,12	0,18	0,20
5,4 min	0,00	0,50	1,03	1,36	1,67	1,54
7,9 min	0,00	0,22	0,57	0,81	0,95	1,24
11,3 min	0,00	0,07	0,22	0,35	0,49	0,63
11,8 min	0,04	0,06	0,25	0,53	0,76	0,97
13,3 min	0,02	0,03	0,05	0,06	0,08	0,09
23,2 min	0,00	0,05	0,12	0,18	0,24	0,34

Συμπεράσματα

Παρατηρείται μηδενοταξική κινητική. Σε τόσο υψηλές συγκεντρώσεις παρατηρείται πολύ συχνά η αποικοδόμηση να ακολουθεί μηδενοταξική κινητική.

Στη συνέχεια μελετήθηκε μικρότερη συγκέντρωση. Τα αραιότερα δείγματα πολλές φορές είτε ακολουθούν πρωτοταξική κινητική είτε εμφανίζουν μικτές κινητικές. Για τον λόγο αυτό θα πρέπει να μελετηθεί η κινητική αλλά και η ταχύτητα αποικοδόμησης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Τα κύρια προϊόντα διάσπασης που εμφανίζονται εκκλύονται πριν την καρβεδιλόλη, στα 3,3 και 5,4 min. Σημαντική είναι με το χρόνο η παρουσία των προϊόντων που εκκλύονται στα 7,9 και 11,3-11,8 min ενώ παρατηρείται η εμφάνιση μιας μικρότερης κορυφής με το χρόνο στα 23,2 min.



Σχήμα ΙΑ.3.2. Διάγραμμα με το σύνολο των προϊόντων φωτοχημικής αποικοδόμησης μεθανολικού διαλύματος της καρβεδιλόλης, σε συνάρτηση με το χρόνο ακτινοβολίας.

ΙΑ.3.3. Μελέτη φωτοχημικής αποικοδόμησης μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης με αρχική συγκέντρωση $9,94 \times 10^{-4}$ M

Παρασκευή διαλυμάτων καμπύλης αναφοράς

Ζυγίζονται 20,5 mg ($5,03 \times 10^{-5}$ mol) και 21,8 mg ($5,35 \times 10^{-5}$ mol) πρότυπης καρβεδιλόλης και μεταφέρονται σε ογκομετρικές φιάλες των 50,0 mL. Τα διαλύματα αραιώνονται μέχρι χαραγής με μεθανόλη. 2,0 mL από το κάθε διάλυμα μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη και αραιώνονται στα 20,0 mL ($1,01$ και $1,07 \times 10^{-4}$ M αντίστοιχα). Από τα διαλύματα αυτά και με τις κατάλληλες αραιώσεις, παρασκευάζονται τα διαλύματα που δίνουν την καμπύλη αναφοράς.

Για την παρακολούθηση της εμφάνισης των προϊόντων φωτοχημικής αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης, από το παραπάνω αρχικό διάλυμα παρασκευάζονται 2 διαλύματα συγκεντρώσεων $4,03$ και $4,29 \times 10^{-6}$ M.

Φωτοχημική αποικοδόμηση

Ζυγίζονται 20,2 mg δραστικής ($4,97 \times 10^{-5}$ mol), διαλύονται σε 50,0 mL μεθανόλης και από το τελευταίο διάλυμα ($9,94 \times 10^{-4}$ M) μεταφέρονται 4,0 mL σε κάθε μια από τις κυψελίδες εργασίας. Από κάθε κυψελίδα γίνονται μέχρι και 2 δειγματοληψίες σε τακτά χρονικά διαστήματα. Το ίδιο διάλυμα χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της συγκέντρωσης της καρβεδιλόλης πριν τη διαδικασία της φωτόλυσης.

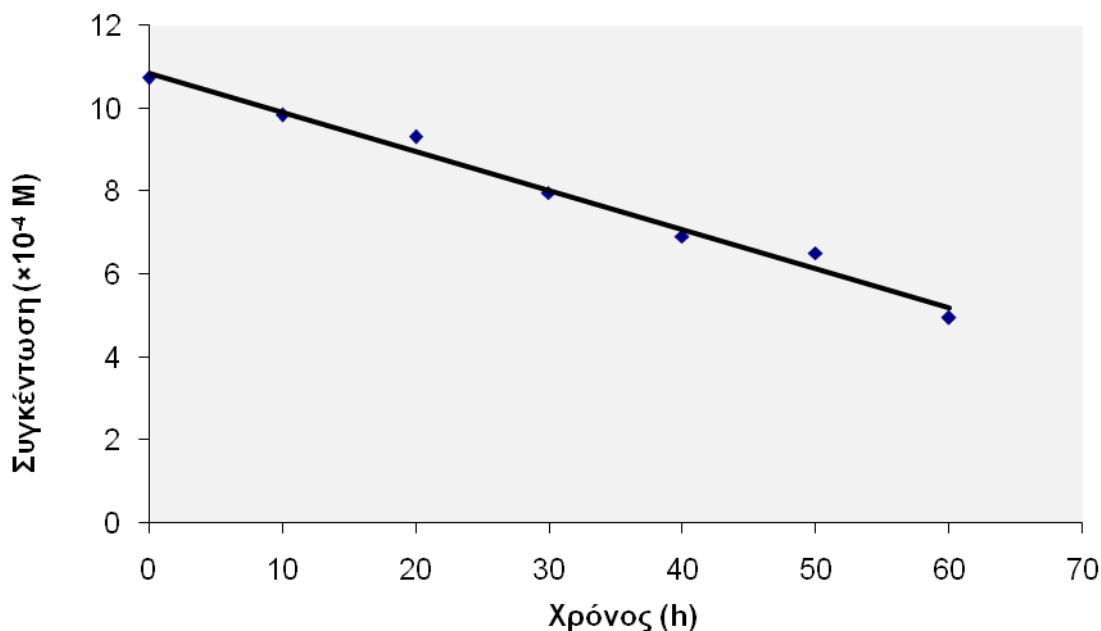
Από το δείγμα της κάθε χρονικής στιγμής, παρασκευάζεται το διάλυμα που εισάγεται στον χρωματογράφο πραγματοποιώντας τις κατάλληλες αραιώσεις.

Υπολογισμοί και Αποτελέσματα

Η καμπύλη αναφοράς που χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της φωτοεπαγόμενη αποικοδόμησης είναι:

$$C = 4,118 \times 10^{-8} \times [\text{εμβαδό}] + 5,739 \times 10^{-4}$$

Το σχήμα που ακολουθεί προέρχεται από την παρακολούθηση της φωτοεπαγόμενη αποικοδόμησης.



Σχήμα ΙΑ.3.3. Διάγραμμα παρακολούθησης της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με τον χρόνο, κατά τη φωτοεπαγόμενη αποικοδόμηση μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης $9,94 \times 10^{-4}$ M, σε κυψελίδα όγκου 4 mL και με ένταση ακτινοβολίας 750 W/m^2 .

Σε μεθανολικό διάλυμα με αρχική συγκέντρωση $9,94 \times 10^{-4}$ M, η φωτοχημική αποικοδόμηση της καρβεδιλόλης ακολουθεί αναμενόμενη μηδενοταξική κινητική για τις πρώτες 60 ώρες και από την κλίση της ευθείας του γραφήματος ΙΑ.3.3 υπολογίζεται η σταθερά της ταχύτητας.

$$C = -8,03 (\pm 1,06) \times 10^{-6} \times [\text{χρόνος}] + 1,03 (\pm 0,04) \times 10^{-3} \quad R^2 = 0,98$$

$$k_{(10^{-3})} = -(\text{κλίση}) \quad \Rightarrow k_{(10^{-3})} = 8,03 (\pm 1,06) \times 10^{-6} \text{ M}\cdot\text{h}^{-1}$$

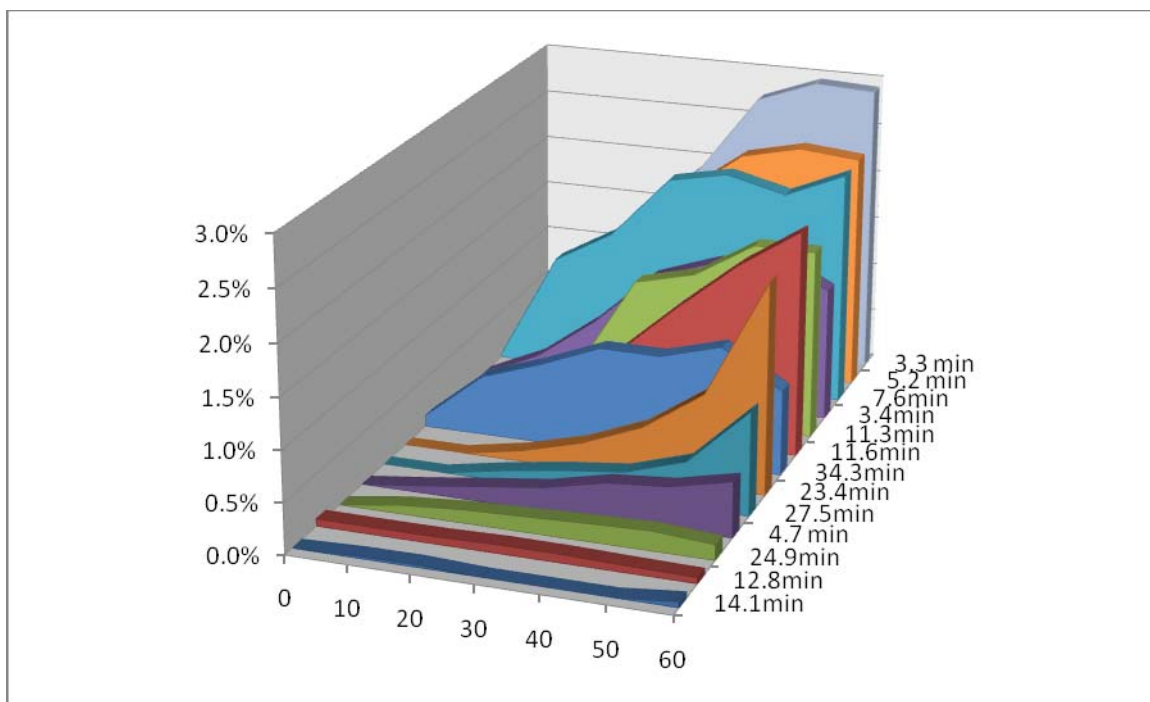
Για την παρακολούθηση της εμφάνισης των προϊόντων φωτοχημικής διάσπασης της καρβεδιλόλης, χρησιμοποιούνται τα εμβαδά των 2 πρότυπων διαλυμάτων $4,03$ και $4,29 \times 10^{-6}$ M, 47054 και 42633 αντίστοιχα.

Καταγράφονται και ολοκληρώνονται όλα τα χρωματογραφήματα των 5 δειγμάτων και υπολογίζεται το % της κάθε εμφανιζόμενης κορυφής σε συνάρτηση με την αρχική συγκέντρωση. Στον πίνακα που ακολουθεί καταγράφονται τα αποτελέσματα για τις χρωματογραφικές κορυφές που ξεπερνούν το 0,05 % και αυξάνονται με τον χρόνο.

Πίνακας ΙΑ.3.2. Αποτελέσματα παρακολούθησης σχηματιζόμενων προϊόντων φωτοχημικής αποικοδόμησης μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης, συγκέντρωσης $9,94 \times 10^{-4} \text{ M}$.

	Περιεκτικότητα προϊόντων διάσπασης (%)						
	10	20	30	40	50	60	
3,3 min	0,43	1,43	1,93	2,73	2,95	2,92	
3,4 min	0,27	0,71	1,26	1,47	1,63	1,33	
4,7 min	0,07	0,15	0,23	0,36	0,41	0,55	
5,2 min	0,61	1,29	1,84	2,28	2,42	2,36	
7,6 min	1,14	1,48	2,11	2,23	2,09	2,35	
11,3 min	0,14	0,41	1,37	1,52	1,88	1,88	
11,6 min	0,00	0,32	0,82	1,36	1,85	2,25	
12,8 min	0,07	0,07	0,09	0,08	0,07	0,06	
14,1 min	0,02	0,03	0,00	0,00	0,00	0,06	
23,4 min	0,00	0,11	0,27	0,51	0,92	2,09	
24,9 min	0,09	0,13	0,15	0,18	0,20	0,15	
27,5 min	0,00	0,11	0,20	0,27	0,45	1,03	
34,3 min	0,60	0,80	1,04	1,04	1,21	0,85	

Τα προϊόντα που εμφανίζονται και αυξάνονται σημαντικά και συνεχώς είναι αυτά που εκλύονται στα 3,3 min, 3,4 min, 5,2 min, 7,6 min, 11,6 min και 23,4 min.



Σχήμα ΙΑ.3.4. Διάγραμμα με τα αποτελέσματα των προϊόντων που εμφανίζονται κατά τη φωτοχημική αποικοδόμηση μεθανολικού διαλύματος καρβενδιόλης συγκέντρωσης $9,94 \times 10^{-4}$ M.

ΙΑ.3.4. Μελέτη φωτοχημικής αποικοδόμησης μεθανολικού διαλύματος καρβενδιόλης με αρχική συγκέντρωση $1,09 \times 10^{-4}$ M

Παρασκευή διαλυμάτων καμπύλης αναφοράς

Ζυγίζονται 5,2 mg πρότυπης καρβενδιόλης ($1,27 \times 10^{-5}$ mol), μεταφέρονται σε φιάλη των 20,0 mL και αραιώνονται μέχρι χαραγής με μεθανόλη. Από το διάλυμα αυτό με τις κατάλληλες αραιώσεις παρασκευάζονται τα διαλύματα της καμπύλης αναφοράς.

Φωτοχημική αποικοδόμηση

Ζυγίζονται 17,7 mg δραστικής ($4,36 \times 10^{-5}$ mol) σε φιάλη 20,0 mL και αραιώνονται στη χαραγή με μεθανόλη. Στη συνέχεια, 1,0 mL μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 20,0 mL και αραιώνεται μέχρι όγκου με τον ίδιο διαλύτη ($1,09 \times 10^{-4}$ M). Από το διάλυμα που προκύπτει πραγματοποιείται ο έλεγχος της συγκέντρωσης της καρβενδιόλης πριν τη διαδικασία της φωτόλυσης και από αυτό μεταφέρονται 4,0 mL σε κάθε μια από τις 3 κυψελίδες. Οι

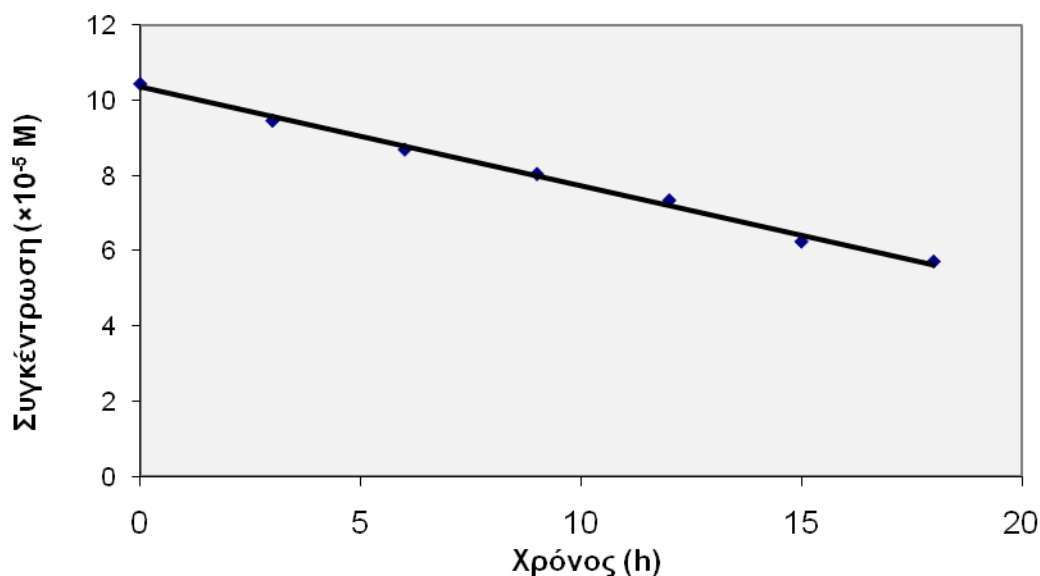
δειγματοληψίες πραγματοποιούνται όπως σχεδιάστηκαν στο προηγούμενο πείραμα. Από το δείγμα της κάθε χρονικής στιγμής παρασκευάζεται το διάλυμα για τη χρωματογραφική ανάλυση μεταφέροντας 150 μL σε φιαλίδιο αυτόματου HPLC δειγματολήπτη και αραιώνοντάς τα με 1400 μL κινητής φάσης.

Υπολογισμοί και Αποτελέσματα

Η καμπύλη αναφοράς που χρησιμοποιείται για την εύρεση των συγκεντρώσεων είναι:

$$C = 6,586 \times 10^{-10} \times [\text{εμβαδό}] + 2,352 \times 10^{-6}$$

Το γράφημα που ακολουθεί προκύπτει από την χρονική παρακολούθηση της συγκέντρωσης.



Σχήμα ΙΑ.3.5. Διάγραμμα παρακολούθησης της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με τον χρόνο, κατά τη φωτοεπαγόμενη αποικοδόμηση μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης $1,09 \times 10^{-4}$ M, σε κυψελίδα όγκου 4 mL και με ένταση ακτινοβολίας 750 W/m^2 .

Η συσχέτιση της συγκέντρωσης της καρβεδιλόλης κατά τη φωτοχημική αποικοδόμηση μεθανολικού διαλύματός $1,09 \times 10^{-4}$ M της με τον χρόνο είναι γραμμική και εκφράζεται από την εξίσωση:

$$C = -2,63 (\pm 0,20) \times 10^{-6} \times [\text{χρόνος}] + 1,04 (\pm 0,02 \times 10^{-4}) \quad R^2 = 0,995$$

Για τη μηδενοταξική κινητική, η κλίση της ευθείας δίνει την σταθερά ταχύτητας της αντίδρασης.

$$k_{(10^{-4})} = -(\text{κλίση}) \quad \Rightarrow \quad k_{(10^{-4})} = 2,63 (\pm 0,20 \times 10^{-6}) \text{ M} \cdot \text{h}^{-1}$$

ΙΑ.3.5. Μελέτη φωτοχημικής αποικοδόμησης μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης με αρχική συγκέντρωση $1,1 \times 10^{-5} \text{ M}$

Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

Από 15,4 mg πρότυπης καρβεδιλόλης ($3,79 \times 10^{-5} \text{ mol}$) και με τις κατάλληλες αραιώσεις παρασκευάζονται τα διαλύματα της καμπύλης αναφοράς.

Φωτοχημική αποικοδόμηση

Ζυγίζονται 23,0 mg δραστικής ($5,66 \times 10^{-5} \text{ mol}$), μεταφέρονται σε φιάλη των

50,0 mL και αραιώνονται με μεθανόλη μέχρι χαραγής. Από το διάλυμα που προκύπτει 500 μL αραιώνονται στα 50,0 mL με τον ίδιο διαλύτη ($1,13 \times 10^{-5} \text{ M}$).

Από το νέο διάλυμα που προκύπτει μεταφέρονται 4,0 mL σε κάθε μια από τις κυψελίδες εργασίας και από κάθε κυψελίδα γίνονται μέχρι 2 δειγματοληψίες τις σχεδιασμένες χρονικές στιγμές. Το ίδιο διάλυμα χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της συγκέντρωσης της καρβεδιλόλης πριν τη διαδικασία της φωτόλυσης.

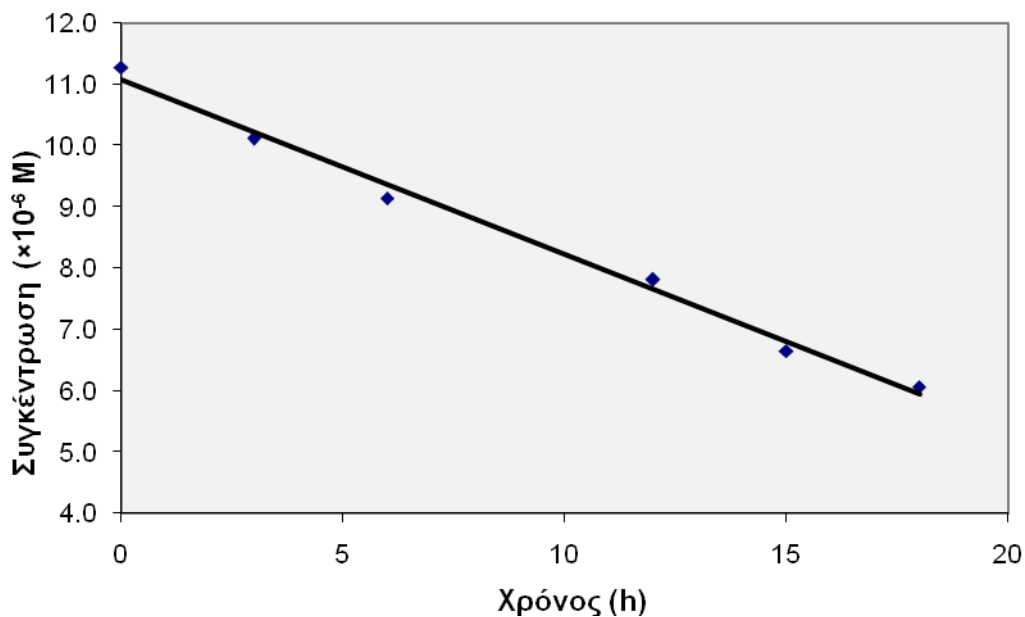
Από το δείγμα της κάθε χρονικής στιγμής, 200 μL μεταφέρονται σε φιαλίδιο της HPLC και αραιώνονται στα 1100 μL με το ρυθμιστικό διάλυμα της κινητής φάσης, πριν την εισαγωγή τους στον χρωματογράφο.

Υπολογισμοί και Αποτελέσματα

Η καμπύλη αναφοράς που χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων είναι:

$$C = 3,493 \times 10^{-11} \times [\text{εμβαδό}] + 2,251 \times 10^{-7}$$

Το γράφημα που ακολουθεί προκύπτει από την χρονική παρακολούθηση της συγκέντρωσης.



Σχήμα ΙΑ.3.6. Διάγραμμα παρακολούθησης της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με τον χρόνο, κατά τη φωτοεπαγόμενη αποικοδόμηση μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης $1,1 \times 10^{-5}$ M, σε κυψελίδα όγκου 4 mL και με ένταση ακτινοβολίας 750 W/m^2 .

Η φωτοχημική διάσπαση της καρβεδιλόλης ακολουθεί και στη συγκέντρωση $1,1 \times 10^{-5}$ M μηδενοταξική κινητική, οπότε από την κλίση της ευθείας του γραφήματος υπολογίζεται η σταθερά της ταχύτητας.

$$C = -2,85 (\pm 0,33 \times 10^{-7}) \times [\text{χρόνος}] + 1,11 (\pm 0,04 \times 10^{-5}) \quad R^2 = 0,99$$

$$k_{(10^{-5})} = -(\text{κλίση}) \quad \Rightarrow k_{(10^{-5})} = 2,85 (\pm 0,33 \times 10^{-7}) \text{ M} \cdot \text{h}^{-1}$$

ΙΑ.3.6. Μελέτη φωτοχημικής αποικοδόμησης μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης με αρχική συγκέντρωση $1,0 \times 10^{-6}$ M

Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

Από ζύγιση 21,2 mg πρότυπης καρβεδιλόλης ($5,22 \times 10^{-5}$ mol) και με τις κατάλληλες αραιώσεις παρασκευάζονται τα διαλύματα της καμπύλης αναφοράς.

Φωτοχημική αποικοδόμηση

Ζυγίζονται 20,9 mg δραστικής ($5,14 \times 10^{-5}$ mol), μεταφέρονται σε φιάλη των 20,0 mL και αραιώνονται μέχρι χαραγής με μεθανόλη. Ακολουθεί αραιώση 500 μ L του διαλύματος στα 25 mL μεθανόλης και από το τελευταίο 500 μ L διάλυμα στα 25,0 mL του ίδιου διαλύτη ($1,03 \times 10^{-6}$ M).

Από το διάλυμα που προκύπτει μεταφέρονται 4,0 mL σε κάθε μια από 3 κυψελίδες και πραγματοποιούνται δειγματοληψίες του διασπασμένου διαλύματος της καρβεδιλόλης σε τακτά χρονικά διαστήματα. Το ίδιο διάλυμα χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της συγκέντρωσης της καρβεδιλόλης πριν τη διαδικασία της φωτόλυσης.

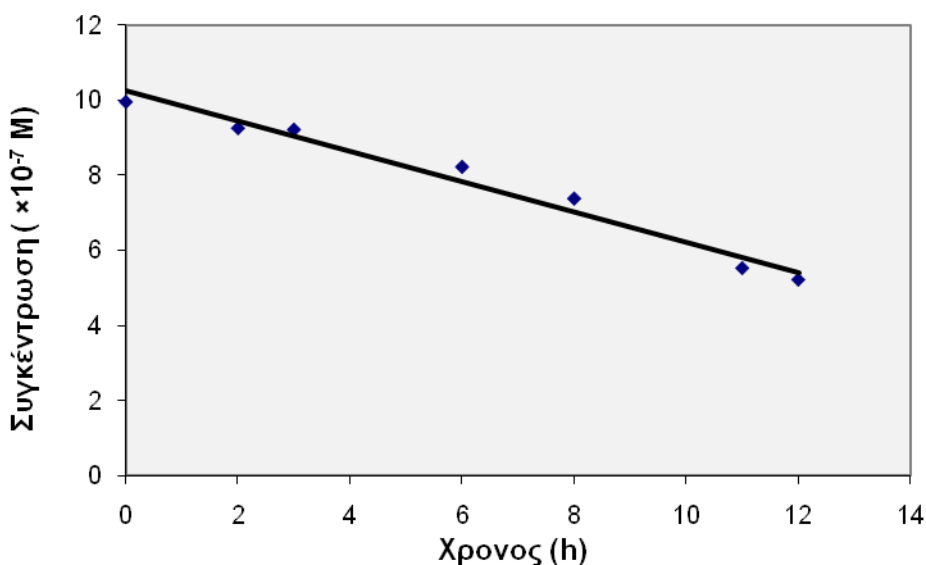
Από το δείγμα της κάθε χρονικής στιγμής, 200 μ L μεταφέρονται σε φιαλίδιο της HPLC και αραιώνονται στα 1100 μ L του ρυθμιστικού διαλύματος της κινητής φάσης, πριν την εισαγωγή τους στον χρωματογράφο.

Υπολογισμοί και Αποτελέσματα

Η καμπύλη αναφοράς που χρησιμοποιείται στον υπολογισμό των συγκεντρώσεων είναι:

$$C = 3,303 \times 10^{-11} \times [\text{εμβαδό}] + 2,920 \times 10^{-8}$$

Το γράφημα που ακολουθεί προκύπτει από την χρονική παρακολούθηση της συγκέντρωσης.



Σχήμα ΙΑ.3.7. Διάγραμμα παρακολούθησης της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με τον χρόνο, κατά τη φωτοεπαγόμενη αποικοδόμηση μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης $1,0 \times 10^{-6}$ M, σε κυψελίδα όγκου 4 mL και με ένταση ακτινοβολίας 750 W/m^2 .

Τα πειραματικά δεδομένα για τη συγκέντρωση της καρβεδιλόλης κατά τη Φωτοχημική διάσπαση μεθανολικού διαλύματος συγκέντρωσης $1,0 \times 10^{-6}$ M, δείχνουν μεγάλη διακύμανση, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στην πολύ μικρή συγκέντρωση των δειγμάτων. Η γραμμική όμως απόδοση της εξάρτησης της συγκέντρωσης από το χρόνο είναι η καλύτερη δυνατή και αυτό σημαίνει πως για όλο το διάστημα της ημίσειας ζωής της, η αποικοδόμηση είναι κινητικά μηδενοταξική.

$$C = -4,039 \times 10^{-8} (\pm 7,276 \times 10^{-9}) \times [\text{χρόνος}] + 1,025 \times 10^{-6} (\pm 5,347 \times 10^{-8}) \quad R^2 = 0,97$$

Η σταθερά ταχύτητας εκφράζεται από την κλίση.

$$k_{(10^{-6})} = -(\text{κλίση}) \quad \Rightarrow k_{(10^{-6})} = 4,04 (\pm 0,73 \times 10^{-8}) \text{ M} \cdot \text{h}^{-1}$$

ΙΑ.3.7. Παρακολούθηση της Φωτοχημικής αποικοδόμησης μεθανολικών διαλυμάτων καρβεδιλόλης σε συγκεντρώσεις από 10^{-6} έως 10^{-5} M.

Η προηγούμενη σειρά πειραμάτων, καλύπτει ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων, ενδιαφέρον για την προσέγγιση των ιδιοτήτων της καρβεδιλόλης. Οι συγκεντρώσεις όμως των φαρμάκων, όταν αυτά φθάνουν στην κυκλοφορία του αίματος, είναι πολύ πιο χαμηλές. Παρουσιάζει ενδιαφέρον η παρακολούθηση του φαινομένου της φωτοχημικής διάσπασης να επεκταθεί στις μικρές συγκεντρώσεις.

Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων

21,0 mg ($5,17 \times 10^{-5}$ mol) και 17,6 mg ($4,33 \times 10^{-5}$ mol) πρότυπης καρβεδιλόλης (98,7 %) μεταφέρονται σε φιάλες των 50 mL και από τα διαλύματα αυτά παρασκευάζονται με τις κατάλληλες αραιώσεις τα πρότυπα διαλύματα της καμπύλης αναφοράς με τελικές συγκεντρώσεις από $5,16 \times 10^{-7}$ έως $1,29 \times 10^{-5}$ M.

Παρασκευή δειγμάτων

Για τη φωτόλυση, ζυγίζονται 21,4 mg ($5,26 \times 10^{-5}$ mol) καρβεδιλόλης σε φιάλη 50 mL, αραιώνονται μέχρι όγκου με μεθανόλη και από το διάλυμα αυτό ακολουθεί αραιώση 5 mL στα 50 mL με τον ίδιο διαλύτη (διάλυμα Σ1 $1,05 \times 10^{-4}$ M).

Από το διάλυμα αυτό παρασκευάζονται τα ακόλουθα διαλύματα, έχοντας τη μεθανόλη ως διαλύτη:

Διάλυμα A: 1 mL από το διάλυμα Σ1 αραιώνονται στα 50 mL ($2,11 \times 10^{-6}$ M)

Διάλυμα B: 2 mL από το διάλυμα Σ1 αραιώνονται στα 50 mL ($4,21 \times 10^{-6}$ M)

Παρακολούθηση φωτοχημικής αποικοδόμησης

4,0 mL από το κάθε διάλυμα μεταφέρονται σε κυψελίδα και υφίστανται ακτινοβολία από λυχνία τόξου αερίου Ξένου για χρονικό διάστημα 2 h. Η διαδικασία διακόπτεται για δειγματοληψία 500 μ L και η φωτόλυση συνεχίζεται για άλλες 2 h, οπότε και λαμβάνονται άλλα 500 μ L. Το πείραμα επαναλαμβάνεται με 4,0 mL του ίδιου αρχικού διαλύματος τα οποία

ακτινοβολούνται για 6 h και για 8 h αντίστοιχα. Η πορεία επαναλαμβάνεται 3 φορές ακόμα, με 4,0 mL του ίδιου αρχικού διαλύματος κάθε φορά, τα οποία υφίστανται ακτινοβολία για 10 h και 12 h, για 14 h και 16 h αντίστοιχα.

Για κάθε ένα από τα δείγματα και πρότυπα διαλύματα, 200 μL αραιώνονται στα 1100 μL με το υδατικό μέρος της κινητής φάσης (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών).

Υπολογισμοί και αποτελέσματα

Από τα πρότυπα διαλύματα και για τους υπολογισμούς στα δείγματα που προέρχονται από τη φωτόλυση των διαλυμάτων Α και Β, προκύπτει η καμπύλη αναφοράς:

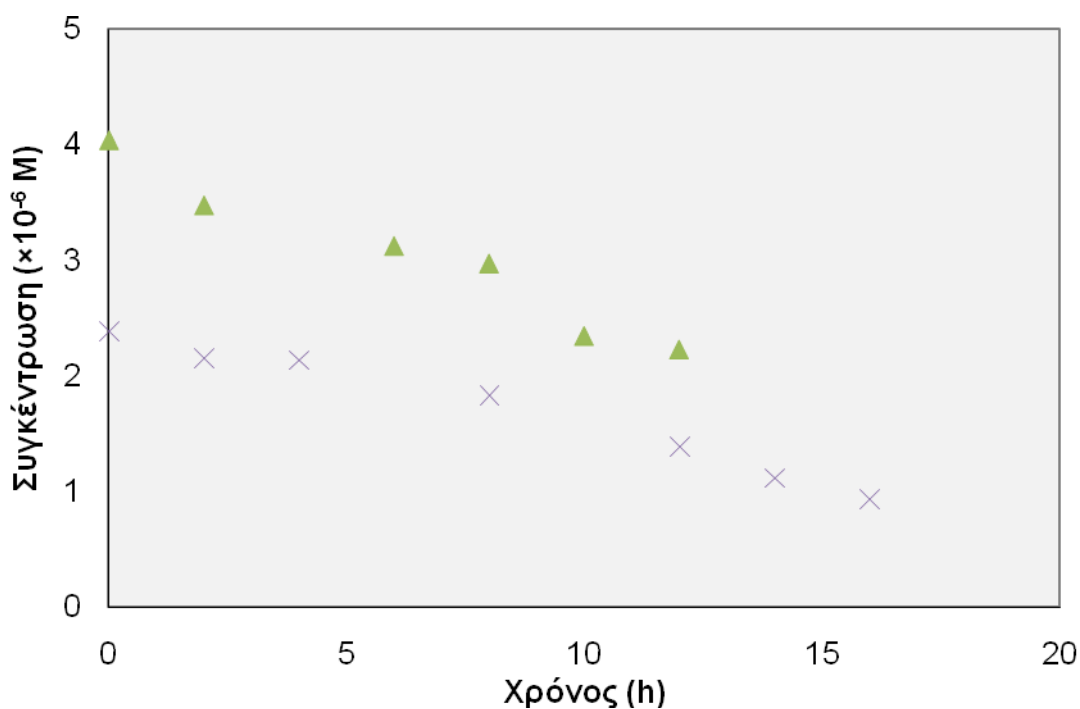
$$C = 2,321 \times 10^{-11} [\text{εμβαδό}] + 6,612 \times 10^{-7} \quad R^2 = 0,995$$

Πίνακας ΙΑ.3.3. Φωτοχημική αποικοδόμηση διαλύματος Α ($2,1 \times 10^{-6}$ M) καρβεδιλόλης

Διάρκεια ακτινοβολίας (h)	Εμβαδό κορυφής HPLC	Συγκέντρωση καρβεδιλόλης (10^{-6} M)	% αρχικής συγκέντρωσης
0	74636,9	2,39	100,0
2	64487,8	2,16	90,2
4	63613,1	2,13	89,3
8	50410,4	1,83	76,5
12	31270,1	1,39	57,9
14	11486,3	1,12	46,6
16	9932,2	0,93	38,8

Πίνακας ΙΑ.3.4. Φωτοχημική αποικοδόμηση διαλύματος Β ($4,2 \times 10^{-6}$ M) καρβεδιλόλης

Διάρκεια ακτινοβολίας (h)	Εμβαδό κορυφής HPLC	Συγκέντρωση καρβεδιλόλης (10^{-6} M)	% αρχικής συγκέντρωσης
0	145446,9	4,04	100,0
2	121249,9	3,47	86,1
6	106156,6	3,12	77,4
8	99607,5	2,97	73,6
10	72649,4	2,35	58,1
12	67599,7	2,23	55,2



Σχήμα IA.3.8. Διάγραμμα παρακολούθησης της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με το χρόνο κατά τη φωτοεπαγόμενη αποικοδόμηση μεθανολικών διαλυμάτων καρβεδιόλης σε κυψελίδα όγκου 4 mL και με ένταση ακτινοβολίας 750 W/m². Αρχική συγκέντρωση 4,21×10⁻⁶ M (▲), 2,11×10⁻⁶ M (×).

Η φωτοχημική διάσπαση και των τεσσάρων διαλυμάτων ακολουθεί μηδενοταξική κινητική και από την κλίση της ευθείας που συνδέει την συγκέντρωση με τον χρόνο που υφίστανται την ακτινοβολία της λυχνίας τόξου αερίου Ξένου, υπολογίζονται οι αντίστοιχες σταθερές ταχύτητας.

Πίνακας IA.3.5. Σταθερές ταχύτητας για την φωτοχημική αποικοδόμηση μεθανολικών διαλυμάτων καρβεδιόλης σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

Συγκέντρωση (M)	Ταχύτητα (M·h ⁻¹)
2,11×10 ⁻⁶	9,04 (±1,38) ×10 ⁻⁸
4,21×10 ⁻⁶	14,41 (±3,94) ×10 ⁻⁸

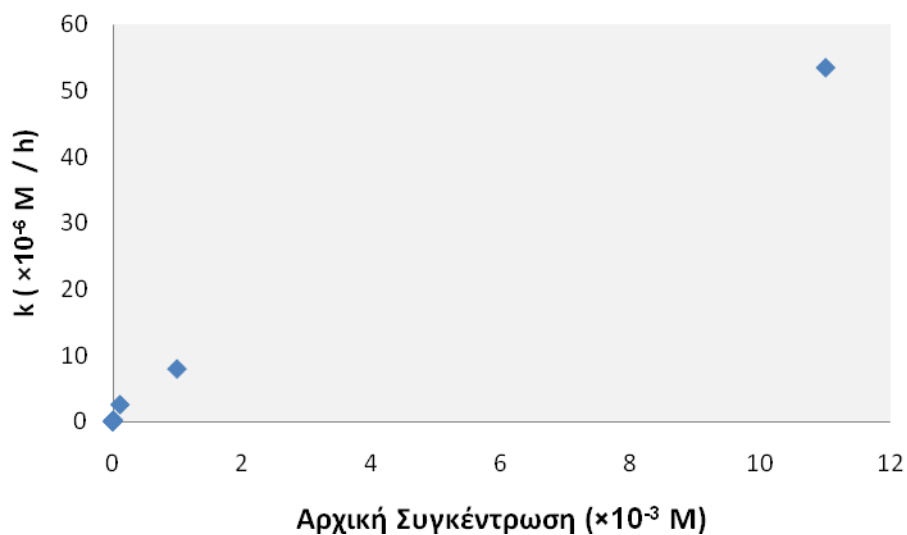
ΙΑ.3.8. Αποτελέσματα - Συμπεράσματα

Στον πίνακα ΙΑ.3.8 παρατίθενται όλα τα αποτελέσματα των πειραμάτων φωτοεπαγόμενη αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης.

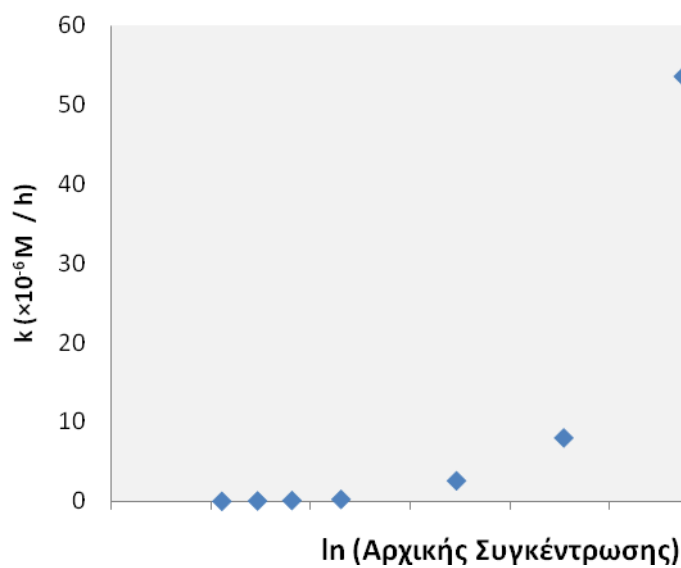
Πίνακας ΙΑ.3.8. Συγκεντρωτικός πίνακας των σταθερών ταχύτητας που προκύπτουν από τη Φωτοχημική αποικοδόμηση μεθανολικών διαλυμάτων καρβεδιλόλης διαφορετικών αρχικών συγκεντρώσεων.

Αρχική συγκέντρωση (M)	Σταθερά ταχύτητας ($M \cdot h^{-1}$)
$1,10 \times 10^{-2}$	$5,36 (\pm 1,21) \times 10^{-5}$
$9,94 \times 10^{-4}$	$8,03 (\pm 1,06) \times 10^{-6}$
$1,15 \times 10^{-4}$	$2,63 (\pm 0,20) \times 10^{-6}$
$1,13 \times 10^{-5}$	$2,85 (\pm 0,33) \times 10^{-7}$
$4,21 \times 10^{-6}$	$1,44 (\pm 0,40) \times 10^{-7}$
$2,11 \times 10^{-6}$	$9,04 (\pm 1,38) \times 10^{-8}$
$1,03 \times 10^{-6}$	$4,04 (\pm 0,73) \times 10^{-8}$

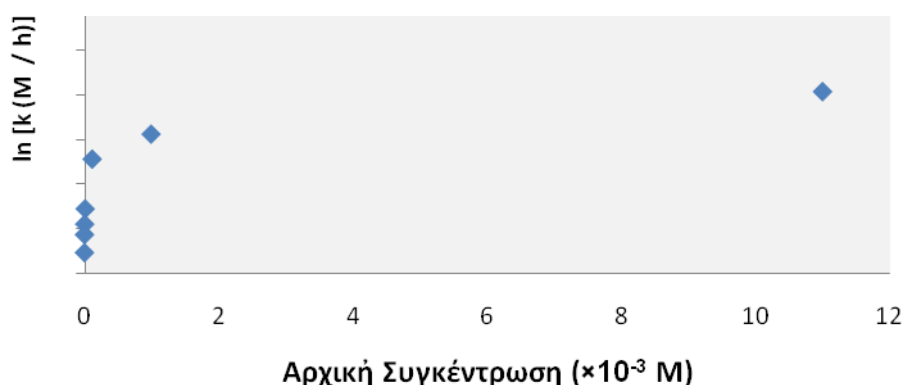
Η απόδοση των δεδομένων του πίνακα ΙΑ.3.8 σε διάγραμμα παρουσιάζεται στο σχήμα ΙΑ.3.9. Στο σχήμα συμπεριλαμβάνονται όλα τα σημεία αλλά δεν μπορούν να φανούν λόγω της διαφοράς τάξης μεγέθους που έχουν μεταξύ τους. Η λογαρίθμιση των δεδομένων είναι ένας τρόπος να εξαλειφθούν οι διαφορές αυτές και δοκιμάζεται αρχικά η λογαρίθμιση των συγκεντρώσεως και μετά των υπολογισμένων σταθερών ταχύτητας (σχήμα ΙΑ.3.10).



Σχήμα ΙΑ.3.9. Γραφική απεικόνιση των πειραματικών τιμών για τη σταθερά ταχύτητας της φωτοχημικής αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης σε συνάρτηση με την αρχική συγκέντρωση του μεθανολικού διαλύματος.

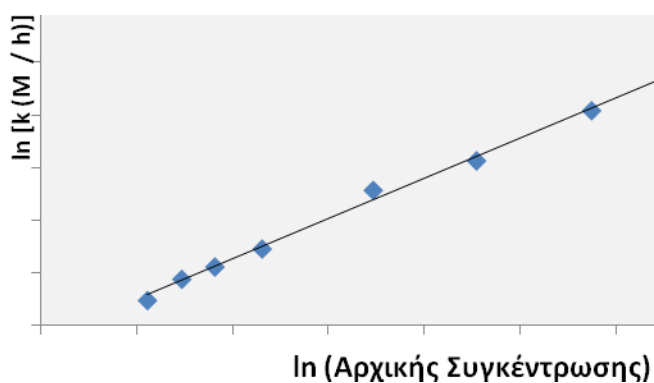


Σχήμα ΙΑ.3.10α. Γραφική απεικόνιση των πειραματικών τιμών για τη σταθερά ταχύτητας της φωτοχημικής αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης σε συνάρτηση με τον φυσικό λογάριθμο της αρχικής συγκέντρωσης του μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης.



Σχήμα ΙΑ.3.10β. Γραφική απεικόνιση των πειραματικών τιμών για τον φυσικό λογάριθμο της σταθεράς ταχύτητας της φωτοχημικής αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης σε συνάρτηση με την αρχική συγκέντρωση του μεθανολικού διαλύματος.

Καθότι τα γραφήματα του σχήματος ΙΑ.3.10 δεν αποκαλύπτουν κάποια πληροφορία για τη συσχέτιση των δεδομένων, επιχειρείται η λογαρίθμιση των τιμών και των δυο αξόνων. Το αποτέλεσμα της πράξης αυτής αποτυπώνεται στο σχήμα ΙΑ.3.11, το οποίο είναι πιο ενδεικτικό για τη φύση της σχέσης που έχουν τα δυο μεγέθη.



Σχήμα ΙΑ.3.11: Γραφική απεικόνιση των λογαρίθμων των πειραματικών τιμών για τη σταθερά ταχύτητας της φωτοχημικής αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης σε συνάρτηση με τον λογάριθμο της αρχικής συγκέντρωσης του μεθανολικού διαλύματος .

Παρατηρήσεις

Η παρακολούθηση της φωτοεπαγόμενης αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης χαρακτηρίζεται από τα ακόλουθα:

- Η συγκέντρωση της καρβεδιλόλης μεταβάλλεται γραμμικά σε συνάρτηση με το χρόνο που υφίσταται ακτινοβολία, σε όλα τα μεθανολικά διαλύματα που μελετήθηκαν. Ο μηχανισμός της φωτοχημικής αποικοδόμησης στο εύρος συγκεντρώσεων $1,10 \times 10^{-2}$ M έως $1,03 \times 10^{-6}$ M ακολουθεί μηδενοταξική κινητική.
- Αυτή η διαπίστωση θα μπορούσε να υποστηρίξει την άποψη πως σε αυτά τα πειράματα η συγκέντρωση της καρβεδιλόλης αποτελεί σημαντική παράμετρο.
- Αυτά μας οδηγούν στην κλασσική ερμηνεία των μηδενοταξικών κινητικών όπου σε κάθε περίπτωση τμήμα της αρχικής συγκέντρωσης παίρνει μέρος στις αντιδράσεις που συντελούνται.
- Η υπολογιζόμενη φαινόμενη σταθερά ταχύτητας μηδενοταξικής κινητικής (kz) μειώνεται όσο μικρότερη είναι η αρχική συγκέντρωση του διαλύματος. Από το διάγραμμα των kz σε συνάρτηση με τις αρχικές συγκεντρώσεις των διαλυμάτων που υφίστανται την ακτινοβολία προκύπτει πως η σχέση τους με την αρχική συγκέντρωση του διαλύματος δεν είναι ευθύγραμμη.
- Η συσχέτιση της σταθεράς ταχύτητας της φωτοχημικής αποικοδόμησης με την αρχική συγκέντρωση και για τις επτά μελετώμενες συγκεντρώσεις, οδηγεί σε ευθεία γραμμή εάν χρησιμοποιηθούν σε διάγραμμα οι νεπέριοι λογάριθμοι και των δυο μεγεθών.

Συμπεράσματα

Η παραπάνω σχέση είναι αρκετά ενδιαφέρουσα διότι επιτρέπει την πολύ καλή πρόβλεψη της σταθεράς ταχύτητας της φωτοχημικής αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης και σε συγκεντρώσεις που δεν έχουν μελετηθεί, ακολουθώντας βεβαίως τις συγκεκριμένες συνθήκες (ενέργεια λυχνίας, απόσταση από την πηγή και θερμοκρασία θαλάμου, όγκος διαλύματος και κυψελίδας, διαλύτης).

Σε ό,τι αφορά στις σταθερές ταχύτητας των αποικοδομήσεων που υπολογίστηκαν η παρουσία της μεθανόλης ως διαλύτη δεν πρέπει να αγνοείται, διότι είναι γνωστή η ιδιότητά της:

(α) να δρα ανταγωνιστικά στην απορρόφηση ακτινοβολίας και ως εκ τούτου να επηρεάζει αρνητικά την ταχύτητα της αποικοδόμησης της όποιου ουσίας μελετάται.

(β) να μεταβιβάζεται στην μεθανόλη την ενέργεια που έχουν απορροφήσει οι δραστικές ουσίες και έχουν ήδη μεταβεί στη διεγερμένη κατάσταση με αποτέλεσμα να οδηγούνται σε εκτόνωση δίχως να έχουν υποστεί φωτοχημικές μετατροπές.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι γνωστά τόσο ο διμερισμός της καρβεδιλόλης όσο και η επίδραση της μεθανόλης ως διαλύτη σε αυτόν. Γίνεται αντιληπτό πως ο διμερισμός επηρεάζει την αποικοδόμηση της καρβεδιλόλης..

Είναι αναμενόμενο, παρουσία άλλου διαλύτη, με μικρότερη παρεμβολή στην όλη διαθέσιμη ενέργεια ακτινοβολίας να αλλάζει η σταθερά της ταχύτητας ή να μεταβάλλει την κινητική.

Κατά συνέπεια, θα πρέπει να εκτιμηθεί η συμπεριφορά της καρβεδιλόλης όταν αυτή υφίσταται ακτινοβολία σε υδατικό περιβάλλον.

Ως πρώτο βήμα, θα μελετηθεί η επίδραση του διαλύτη στη φωτοχημική αποικοδόμηση. Οι φωτοχημικές μετατροπές του φαρμάκου παρουσιάζουν ενδιαφέρον όταν μελετώνται σε νερό, που προσομοιάζει πολύ περισσότερο τις συνθήκες στις οποίες είναι διαλυμένη μια ουσία όταν χορηγείται στον ασθενή, όταν βρίσκεται στον οργανισμό αλλά και όταν απορρίπτεται στο περιβάλλον. Θα γίνει προσπάθεια πρόβλεψης της συμπεριφοράς της καρβεδιλόλης σε υδατικό περιβάλλον, μελετώντας τον τρόπο που οι σταθερές ταχύτητας μεταβάλλονται όσο αντικαθίσταται μέρος της μεθανόλης του διαλύτη με νερό.

ΙΑ.4. Μελέτη της επίδραση του διαλυτικού μέσου στις φωτοεπαγόμενες διεργασίες αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης

Εισαγωγή

Ο ρυθμός και το αποτέλεσμα μιας φωτοχημικής μετατροπής εξαρτάται από την παρεχόμενη ακτινοβολία, δηλαδή από τη φασματική κατανομή και την ένταση της ακτινοβολίας, όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως. Παράλληλα με αυτά, επηρεάζεται σε πολύ σημαντικό βαθμό και από περιβαλλοντικές παραμέτρους, όπως είναι η θερμοκρασία, το διαλυτικό μέσο καθώς και η πιθανή παρουσία άλλων ουσιών στο ίδιο διάλυμα.

Το διαλυτικό μέσο, το οποίο βρίσκεται πάντα σε τεράστια μοριακή αναλογία ως προς την μελετούμενη ουσία, μετατρέπεται πολλές φορές σε καθοριστικό παράγοντα καθώς επηρεάζει τον ρυθμό και την έκταση της αποδιέγερσης ατόμων ή μορίων που έχουν μεταβεί στη διεγερμένη κατάσταση, αποτέλεσμα της απορρόφησης ενέργειας από την ακτινοβολία που υφίστανται. Κατά συνέπεια είναι πολύ σημαντικό να ερευνηθεί κατά πόσο θα επιδράσει το διαλυτικό μέσο στον ρυθμό της φωτοεπαγόμενης αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης στα διαλύματά της.

Η καρβεδιλόλη χαρακτηρίζεται ως δυσδιάλυτη στο νερό φαρμακευτική ουσία, 0,583 mg/l και η παρακολούθηση της φωτόλυσής της επιλέχθηκε να γίνει με διαλύτη τη μεθανόλη, στην οποία η ουσία διαλύεται πλήρως. Η παρουσία της μεθανόλης διαφοροποιεί την ταχύτητα του φαινομένου της φωτοχημικής αποικοδόμησης σε σχέση με το υδατικό περιβάλλον.

Η δυσδιαλυτότητα της καρβεδιλόλης στο νερό δεν επιτρέπει να επαναληφθούν τα πειράματα στον διαλύτη αυτό στο ίδιο εύρος των συγκεντρώσεων με αυτά της μεθανόλης του κεφαλαίου ΙΑ.3. Προκειμένου να γίνει δυνατή η εκτίμηση της έκτασης του φαινομένου φωτόλυσης σε πλήρως υδατικό περιβάλλον επιλέγεται να μελετηθεί η ταχύτητα των φωτοεπαγόμενων μετατροπών της καρβεδιλόλης σε διαλύματα διαφορετικής αναλογίας μεθανόλης και νερού. Τα φωσφορικά είναι γνωστά για την ιδιότητά τους να επιταχύνουν τις φωτοεπαγόμενες χημικές διαδικασίες. Στη συνέχεια θα εκτιμηθεί η επίδραση

ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 7.4, στην σταθερά ταχύτητας των φωτοαποικοδομήσεων.

ΙΑ.4.1. Παρακολούθηση της φωτοχημικής αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης σε μίγμα μεθανόλης/νερού και μεθανόλης/ρυθμιστικού διαλύματος

Διάλυμα φωσφορικών pH 7,4

Το διάλυμα των φωσφορικών παρασκευάζεται σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία: 250 mL KH_2PO_4 0,2 M αναμιγνύονται με 393,4 mL NaOH 0,1 M.

Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων

17,8 mg (0,0437 mmol) και 23,4 mg (0,0574 mmol) πρότυπης καρβεδιλόλης (99,8 %) μεταφέρονται σε φιάλες των 25 mL και αραιώνονται με μεθανόλη. Διαλύματα $1,75$ και $2,30 \times 10^{-3}$ M αντίστοιχα.

Από τα διαλύματα αυτά παρασκευάζονται τα πρότυπα διαλύματα. Καθώς είναι σημαντικό να έχουν τον ίδιο διαλύτη με τα ελεγχόμενα δείγματα χρησιμοποιείται η ίδια σειρά αραιώσεων. Έτσι, χρησιμοποιείται ως διαλύτης διάλυμα 20 % μεθανόλης στην πρώτη περίπτωση σε νερό και στη δεύτερη σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.4.

Οι αραιώσεις που πραγματοποιούνται είναι: 200μL από τα παραπάνω διαλύματα στα 25 mL με τον κατάλληλο διαλύτη (διαλύματα Σ1: $1,40 \times 10^{-5}$ M και διαλύματα Σ2: $1,84 \times 10^{-5}$ M).

Παρασκευή δειγμάτων για τον έλεγχο φωτοσταθερότητας

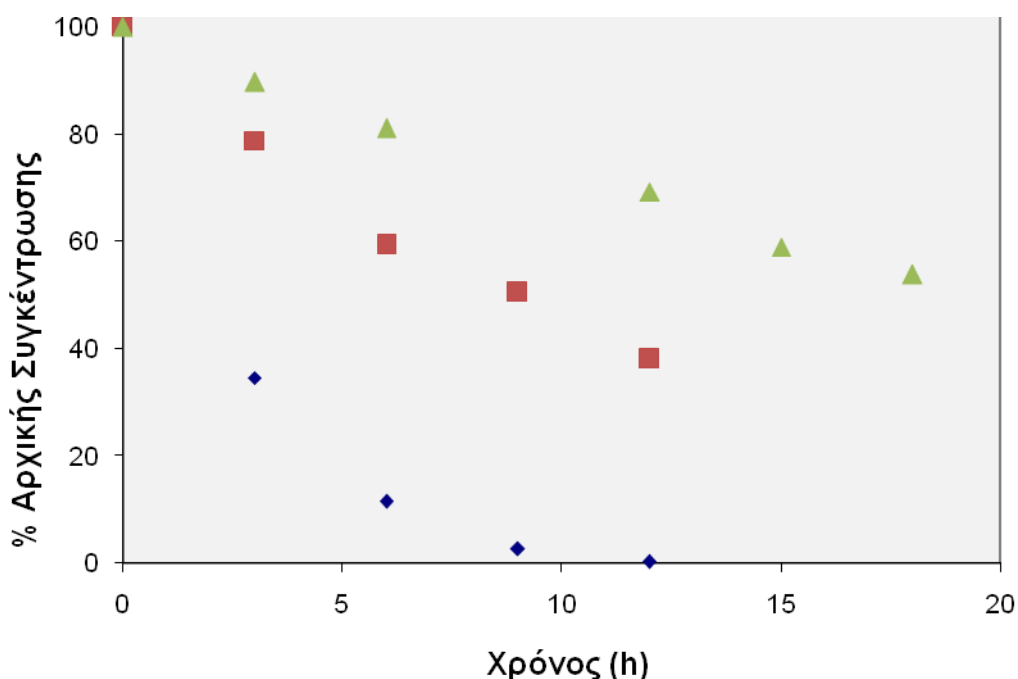
Για τη φωτόλυση, ζυγίζονται 22,6 mg καρβεδιλόλης και αραιώνονται στα 25 mL με μεθανόλη (διάλυμα Α). Από το διάλυμα αυτό προκύπτουν τα διαλύματα Α1 και Α2 συγκέντρωσης $1,77 \times 10^{-5}$ M ως εξής:

Διάλυμα Α1: 200 μL διαλύματος Α μεταφέρονται σε φιάλη των 25 mL, προστίθενται 5 mL μεθανόλης και αραιώνονται σε όγκο με νερό.

Διάλυμα A2: 200 μL διαλύματος A μεταφέρονται σε φιάλη των 25 mL, προστίθενται 5 mL μεθανόλης και αραιώνονται σε όγκο με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4.

Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα της παρακολούθησης των συγκεντρώσεων καρβεδιλόλης δίνονται στο γράφημα που ακολουθεί, χρησιμοποιώντας το ποσοστό της αρχικής συγκέντρωσης που υπολογίζεται για την κάθε χρονική στιγμή. Στο ίδιο διάγραμμα και για συγκριτικούς λόγους προστίθενται και τα αποτελέσματα παρακολούθησης διαλύματος καρβεδιλόλης αντίστοιχης συγκέντρωσης.



Σχήμα ΙΑ.4.1. Μεταβολή της συγκέντρωσης της καρβεδιλόλης ($1,77 \times 10^{-5} \text{ M}$) σε συνάρτηση με τον χρόνο ακτινοβολίας (λυχνία τόξου Ξένου σε 750 W/m^2). Με διαλύτη μεθανόλη/ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 20:80 (◆), με διαλύτη μεθανόλη/νερό 20:80 (■), με διαλύτη μεθανόλη 100 % από τα δεδομένα του κεφαλαίου ΙΑ.3 (▲).

Από το σχήμα γίνεται εμφανές ότι η γραμμική έκφραση της μεταβολής της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με τον χρόνο δεν είναι η καταλληλότερη και

στις δυο περιπτώσεις. Ιδιαίτερα στην περίπτωση του ρυθμιστικού φαίνεται πως η κινητική εξίσωση πρώτης τάξης δίνει καλύτερα αποτελέσματα.

Συμπεράσματα

Η αντικατάσταση μέρους του μεθανολικού διαλύτη της καρβεδιλόλης με νερό αυξάνει την ταχύτητα της φωτοχημικής αποικοδόμησής της. Η επιτάχυνση είναι ακόμα μεγαλύτερη όταν στο υδατικό περιβάλλον υπάρχουν ιόντα φωσφορικών.

Από τα διαλύματα που δέχθηκαν ακτινοβολία και διαφέρουν μόνο στη σύσταση του διαλύτη, έχουμε για τη επίδραση της περιεκτικότητας του διαλύτη σε νερό:

- ✓ Η μεθανόλη είναι 100 % στο ένα και 20 % στο άλλο και στη διαφορά αυτή μπορούν να αποδοθούν οι διαφορετικές απεικονίσεις στο διάγραμμα IA.4.1.
- ✓ Η φωτοεπαγόμενη αποικοδόμηση της καρβεδιλόλης παρουσία μεθανόλης είναι μηδενοταξική αλλά τα αποτελέσματα μεταβάλλονται σε σημαντικό βαθμό όταν μειώνεται το ποσοστό της στον διαλυτικό μέσο.
- ✓ Η διάσπαση ακολουθεί πρωτοταξική κινητική όταν η μεθανόλη έχει περιοριστεί στο 20 % του διαλύτη. Είναι γνωστό πως η μεθανόλη έχει την ιδιότητα να απορροφά ακτινοβολία και να βοηθά στην αποδιέγερση των μορίων.

IA.4.2. Παρακολούθηση της φωτοχημικής αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης στα επίπεδα συγκέντρωσης 10^{-4} και 10^{-5} M σε μίγματα μεθανόλης νερού σε διαφορετικές αναλογίες

Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων

18,1 mg (0,0444 mmol) και 20,9 mg (0,0513 mmol) πρότυπης καρβεδιλόλης (99,7 %) μεταφέρονται σε φιάλες των 50 mL και αραιώνονται με μεθανόλη. Από τα διαλύματα αυτά παρασκευάζονται 2 σειρές προτύπων δειγμάτων.

Σειρά A: 2 mL του κάθε διαλύματος μεταφέρονται σε φιάλες των 10 mL, αραιώνονται με μεθανόλη και χρησιμοποιούνται ως πρότυπα για τους υπολογισμούς στη σειρά δειγμάτων της τάξης 10^{-4} M (1,78 και $2,05 \times 10^{-4}$ M).

Σειρά B: 4 mL του κάθε διαλύματος μεταφέρονται σε φιάλες των 25 mL και αραιώνονται με μεθανόλη. 2 mL από τα διαλύματα αυτά μεταφέρονται σε φιάλες των 20 mL και αφού αραιωθούν με τον ίδιο διαλύτη, χρησιμοποιούνται ως πρότυπα για τους υπολογισμούς στη σειρά δειγμάτων της τάξης 10^{-5} M (διαλύματα $1,42$ και $1,64 \times 10^{-5}$ M).

Παρασκευή δειγμάτων για τον έλεγχο φωτοσταθερότητας

Για τη φωτόλυση, ζυγίζονται 22,8 mg (0,0561 mmol) καρβεδιλόλης, αραιώνονται με μεθανόλη στα 25 mL ($2,24 \times 10^{-3}$ M, Σ1) και ακολουθεί αραιώση 4,0 mL στα 50 mL με τον ίδιο διαλύτη ($1,80 \times 10^{-4}$ M, Σ2). Από τα διαλύματα αυτά παρασκευάζονται με τις κατάλληλες αραιώσεις δυο σειρές διαλυμάτων με διαφορετικό ποσοστό μεθανόλης. Ο πίνακας που ακολουθεί περιγράφει τις αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν για την κάθε σειρά

Πίνακας ΙΑ.4.1. Σειρά δειγμάτων καρβεδιλόλης συγκέντρωσης $1,79 \times 10^{-4}$ M με διαφορετική αναλογία μεθανόλης στον διαλύτη

Διάλυμα	Όγκος διαλύματος $2,24 \times 10^{-3}$ M (mL)	Όγκος μεθανόλης (mL)	Τελικός όγκος (mL) (συμπλήρωση με H ₂ O)	% μεθανόλης
A-20	2	3	25	20
A-40	2	8	25	40
A-60	2	13	25	60
A-80	2	18	25	80
A-100	2	25	-	100

Πίνακας ΙΑ.4.2. Σειρά δειγμάτων καρβεδιλόλης συγκέντρωσης $1,8 \times 10^{-5}$ M με διαφορετική αναλογία μεθανόλης στον διαλύτη

Διάλυμα	Όγκος διαλύματος $1,8 \times 10^{-4}$ M (mL)	Όγκος μεθανόλης (mL)	Τελικός όγκος (mL) (συμπλήρωση με H ₂ O)	% μεθανόλης
B-20	5	5	50	20
B-40	5	15	50	40
B-60	5	25	50	60
B-80	5	35	50	80

Πειραματικό

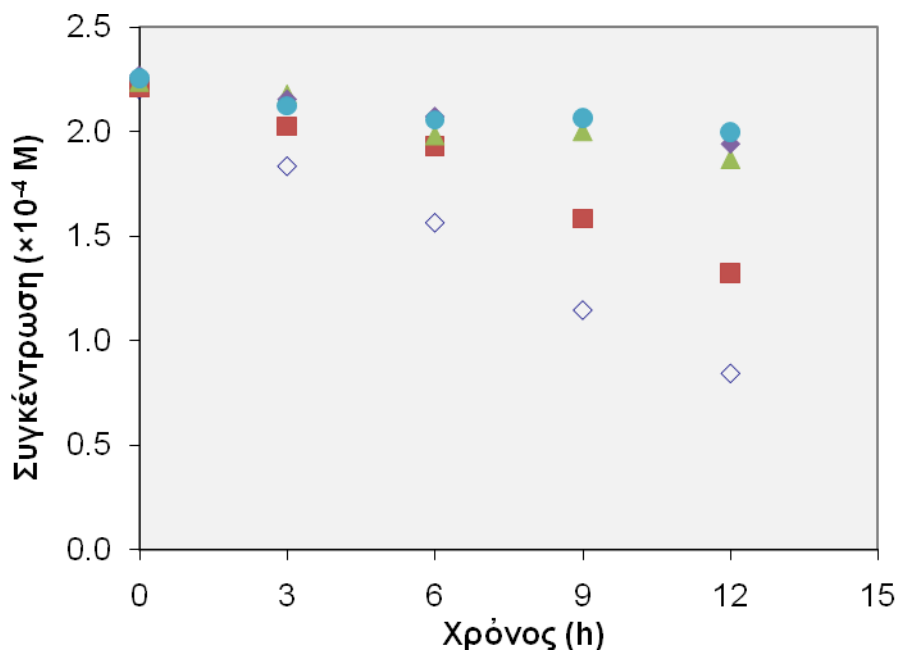
4,0 mL από το κάθε διάλυμα μεταφέρονται σε κυψελίδα και υφίστανται ακτινοβολία για 3 h. Διακόπτεται η ακτινοβολία για δειγματοληψία 500 μ L, και συνεχίζεται για άλλες 3 h, όπου στο τέλος δειγματοληπτούνται άλλα 500 μ L. Το περιεχόμενο της κάθε κυψελίδας απορρίπτεται και μεταφέρονται στην κάθε μία, εκ νέου, άλλα 4,0 mL του ίδιου αρχικού διαλύματος. Τα δείγματα υφίστανται ακτινοβολία για 9 h, απομακρύνονται 500 μ L από το καθένα, και η έκθεσή τους στην ακτινοβολία συνεχίζεται και τερματίζεται τις 12 h, με την τελευταία δειγματοληψία.

Τα δείγματα εισάγονται στον χρωματογράφο δίχως κάποια αραίωση.

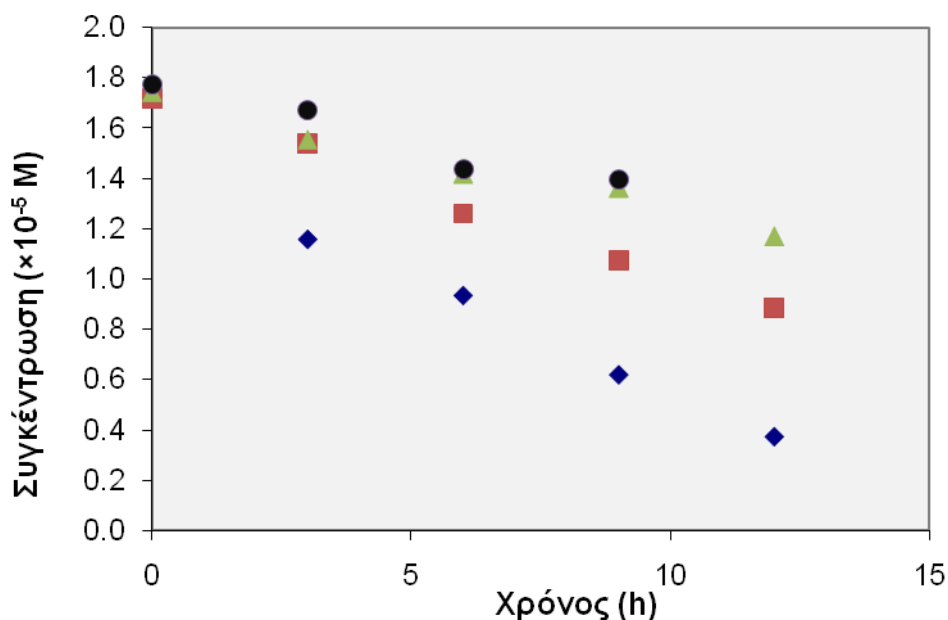
Αποτελέσματα και Υπολογισμοί

Από τα υπολογιζόμενα αποτελέσματα προκύπτουν τα διαγράμματα ΙΑ.4.2 και ΙΑ.4.3 για το κάθε επίπεδο συγκέντρωσης.

Στις γραφικές απεικονίσεις των δεδομένων είναι εμφανής η πιο γρήγορη φωτοχημική αποικοδόμηση της καρβεδιλόλης όταν μειώνεται η περιεκτικότητα του διαλύτη σε μεθανόλη.



Σχήμα ΙΑ.4.2. Μεταβολή της συγκέντρωσης της καρβειδιλόλης σε συνάρτηση με τον χρόνο ακτινοβολίας (λυχνία τόξου Ξένου σε 750 W/m^2) με αρχική συγκέντρωση $1,79 \times 10^{-4} \text{ M}$ και σε διαλύτη μεθανόλη/νερό 20/80 (◇), 40/60 (■), 60/40 (▲), 80/20 (◆), 100/0 (●).

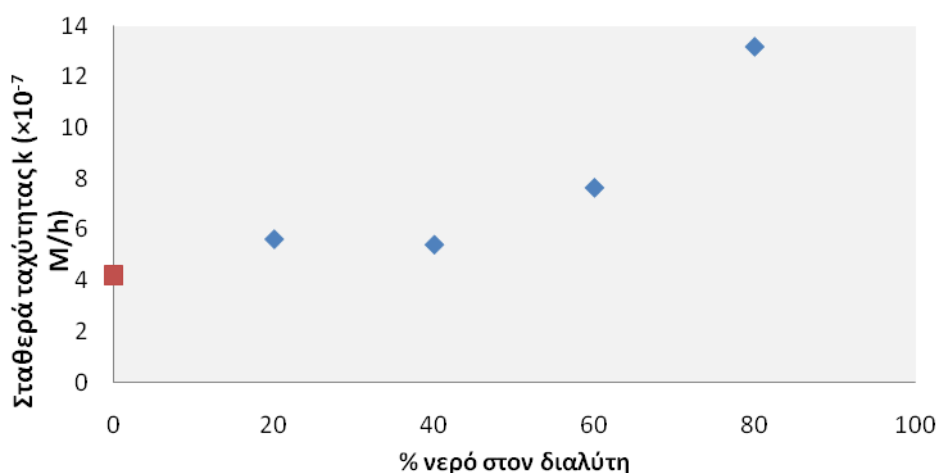


Σχήμα ΙΑ.4.3. Μεταβολή της συγκέντρωσης της καρβειδιλόλης σε συνάρτηση με τον χρόνο ακτινοβολίας (λυχνία τόξου Ξένου σε 750 W/m^2) με αρχική συγκέντρωση $1,80 \times 10^{-5} \text{ M}$ και σε διαλύτη μεθανόλη/νερό 20/80 (◆), 40/60 (■), 60/40 (▲), 80/20 (●).

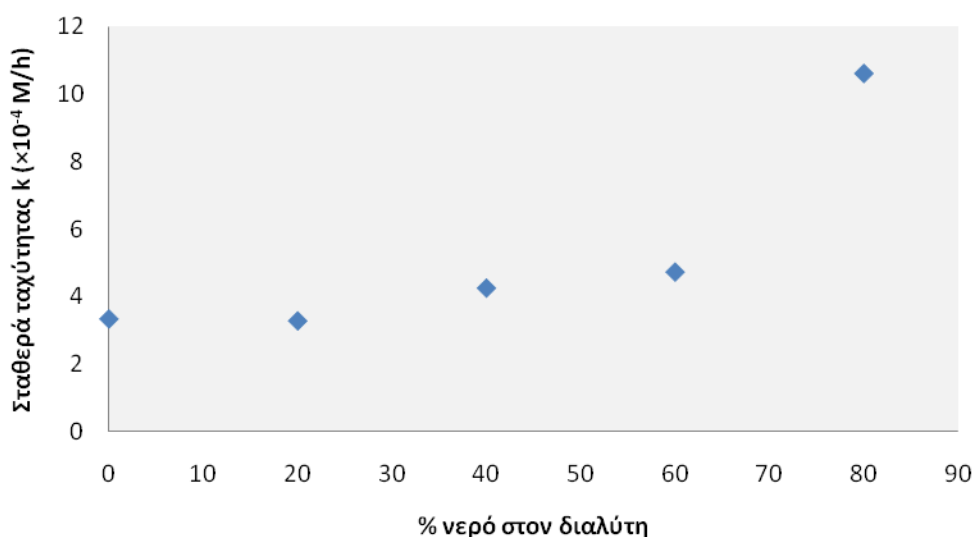
Για τις 6 πρώτες ώρες, όλα τα διαλύματα ακολουθούν μηδενοταξική κινητική και οι υπολογιζόμενες σταθερές ταχύτητας (κλίση του αντίστοιχου διαγράμματος) είναι:

Διάλυμα	k (M/h)
A-20	$1,06 \times 10^{-5}$
A-40	$4,72 \times 10^{-6}$
A-60	$4,25 \times 10^{-6}$
A-80	$3,28 \times 10^{-6}$
A-100	$3,33 \times 10^{-6}$
B-20	$1,32 \times 10^{-6}$
B-40	$7,65 \times 10^{-7}$
B-60	$5,42 \times 10^{-7}$
B-80	$5,64 \times 10^{-7}$

Έχοντας υπολογίσει την σταθερά ταχύτητας (k) της φωτοχημικής αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης με διαλύτη διαφορετικά μίγματα μεθανόλης/νερού μπορεί να δοθεί γραφικά το διάγραμμα που θα απεικονίζει την k ως προς την περιεκτικότητα του διαλύτη σε νερό. Ακολουθούν τα σχήματα ΙΑ.4.4 και ΙΑ.4.5 που αφορούν στη μεταβολή της k με τη σύσταση του διαλύτη, για τις αρχικές συγκεντρώσεις $1,80 \times 10^{-5}$ και $1,79 \times 10^{-4}$ M.



Σχήμα ΙΑ.34.4. Γραφική απεικόνιση της σταθεράς ταχύτητας φωτοχημικής αποικοδόμησης διαλυμάτων καρβεδιλόλης, αρχικής συγκέντρωσης $1,80 \times 10^{-5}$ M, ως προς την περιεκτικότητα του διαλύτη σε νερό (έκθεση σε λυχνία αερίου Ξένου 750 W/m^2). Στο γράφημα έχει προστεθεί και η αναμενόμενη τιμή σταθεράς ταχύτητας φωτοχημικής αποικοδόμησης για μεθανολικό διάλυμα καρβεδιλόλης ίδιας συγκέντρωσης.



*

Σχήμα ΙΑ.4.5. Γραφική απεικόνιση της σταθεράς ταχύτητας φωτοχημικής αποικοδόμησης διαλυμάτων καρβεδιλόλης, αρχικής συγκέντρωσης $1,79 \times 10^{-4}$ M , ως προς την περιεκτικότητα του διαλύτη σε νερό (έκθεση σε λυχνία αερίου Ξένου 750 W/m^2)

Παρατηρήσεις - Συμπεράσματα

Από τη σύγκριση των τιμών που έχει η σταθερά ταχύτητας φωτοαποικοδόμησης της καρβεδιλόλης όταν ως διαλυτικό μέσο χρησιμοποιούνται μίγματα νερού και μεθανόλης παρατηρείται πως η φωτοχημική αποικοδόμηση επηρεάζεται από το % της μεθανόλης όταν αυτό ξεπερνά το ~50 % του όγκου του διαλύτη. Σε υψηλότερη του 50 % περιεκτικότητα μεθανόλης, η ταχύτητα της φωτοχημικής αποικοδόμησης δεν μεταβάλλεται σημαντικά

Ενώ ο αρχικός σκοπός του πειράματος ήταν να εκτιμηθεί η ταχύτητα της φωτοχημικής αποικοδόμησης σε υδατικό περιβάλλον, η αλλαγή της συμπεριφοράς στο μέσο των πειραματικών δεδομένων, δεν επιτρέπει την εύρεση του μοντέλου που θα μπορούσε να προβλέψει τον ρυθμό στο 100 % νερό.

ΙΑ.5. Η επίδραση της παρουσίας εκδόχων στη φωτοχημική αποικοδόμηση της καρβεδιλόλης

Έχοντας διερευνήσει σε κάποιον βαθμό τη ταχύτητα της φωτοχημικής αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης, αρκετά σημαντική για τη χρήση και χορήγησή της, θα ήταν η μελέτη της αποικοδόμησης παρουσία ουσιών που μεταβάλλουν τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις. Ως τέτοιες ουσίες επιλέγονται ένα πολύ συνηθισμένο έκδοχο των στερεών σκευασμάτων της καρβεδιλόλης, το PVP, και ένα μεγαλομόριο όπως η κυκλοδεξτρίνη ή παράγωγό της, η HP-β-CD. Από τα προηγούμενα πειράματα, είναι γνωστή η αλληλεπίδραση της καρβεδιλόλης με το PVP¹⁴⁴ αλλά και ο εγκλωβισμός της στην κοιλότητα της HP-β-CD.

Σκοπός των επόμενων πειραμάτων είναι να παρακολουθηθεί και να αξιολογηθεί η φωτόλυση της καρβεδιλόλης παρουσία του πολυμερούς PVP και της HP-β-CD.

Επίδραση παρουσίας PVP στο διάλυμα καρβεδιλόλης που υφίσταται την ακτινοβολία

Η μελέτη της επίδρασης του PVP στην φωτοχημική αποικοδόμηση της καρβεδιλόλης γίνεται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκδόχου ώστε να μπορούν να συγκριθούν οι σταθερές ταχύτητας με αυτές που έχουν προσδιοριστεί για την καθαρή καρβεδιλόλη, στις ίδιες συνθήκες. Η μεθανόλη παραμένει ως διαλύτης ενώ η ενέργεια της λυχνίας αερίου Ξένου είναι και στην περίπτωση αυτή 750 W/m².

Τα επίπεδα συγκέντρωσης της καρβεδιλόλης που επιλέγονται είναι της τάξης των 10⁻³ και 10⁻⁵ M για να είναι εντός της περιοχής των πειραμάτων σε καθαρή καρβεδιλόλη που έχουν προηγηθεί (10⁻⁶ έως 10⁻² M). Ως διαλύτης στην παρασκευή των διαλυμάτων, αντί απλής μεθανόλης επιλέγεται να χρησιμοποιηθούν τρία διαφορετικά μεθανολικά διαλύματα PVP.

Το πολυμερές PVP δεν έχει κάποιο συγκεκριμένο μοριακό βάρος αλλά ένα εύρος μαζών, οπότε ο υπολογισμός των μοριακότητων δεν είναι εφικτός. Στους υπολογισμούς του PVP αντί μοριακής συγκέντρωσης χρησιμοποιείται η μάζα ως προς όγκο (w/v).

Διαλύματα PVP

Οι συγκεντρώσεις των μεθανολικών διαλυμάτων PVP που χρησιμοποιούνται αρχικά είναι

PVP-C1: 4,2 g/L

PVP-C2: 9,7 g/L

PVP-C3: 0,19 g/L

Σε ένα δεύτερο βήμα για την επίδραση του PVP σε αραιότερα διαλύματα καρβεδιλόλης, παρασκευάζονται άλλα δυο μεθανολικά διαλύματα:

PVP-C4: 4,3 g/L.

PVP-C5: 0,17 g/L

Τα διαλύματα αυτά χρησιμοποιούνται ως διαλύτες στην παρασκευή των δειγμάτων καρβεδιλόλης που θα υποστούν την ακτινοβολία.

HP-β-CD

Η μελέτη της επίδρασης της HP-β-CD επιλέγεται να πραγματοποιηθεί λόγω του εφικτού εγκλεισμού της καρβεδιλόλης στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης. Η διαλυτότητα σε νερό του συμπλόκου είναι πολύ μεγαλύτερη της σκέτης καρβεδιλόλης και αυτό επιτρέπει την παρακολούθηση της διαδικασίας σε υδατικό περιβάλλον.

ΙΑ.5.1. Παρακολούθηση της φωτοχημικής αποικοδόμησης μεθανολικού διαλύματος της καρβεδιλόλης με αρχική συγκέντρωση $2,61 \times 10^{-3}$ M και παρουσία 4,2 g/L PVP.

Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

15,9 mg (0,0390 mmol) και 20,7 mg (0,0508 mmol) πρότυπης καρβεδιλόλης μεταφέρονται σε φιάλες των 25 mL και διαλύονται με μεθανόλη (συγκεντρώσεις $1,56$ και $2,03 \times 10^{-3}$ M). Τα διαλύματα αυτά χρησιμοποιούνται στην παρακολούθηση της συγκέντρωσης της ακέραιης καρβεδιλόλης στο διάλυμα.

Μετά από αραιώση του πρώτου διαλύματος προκύπτει διάλυμα συγκέντρωσης $1,56 \times 10^{-6}$ M το οποίο χρησιμοποιείται ως πρότυπο διάλυμα για

την παρακολούθηση των προϊόντων φωτοχημικής αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης παρουσία PVP.

Παρασκευή δείγματος παρακολούθησης φωτοχημικής αποικοδόμησης

21,2 mg της δραστικής καρβεδιλόλης (0,0522 mmol) ζυγίζονται και μεταφέρονται σε φιάλη των 20 mL και αραιώνονται μέχρι όγκου με διάλυμα PVP-C1 και από το τελευταίο διάλυμα μεταφέρονται 4,0 mL σε κάθε μια από τις 2 κυψελίδες εργασίας.

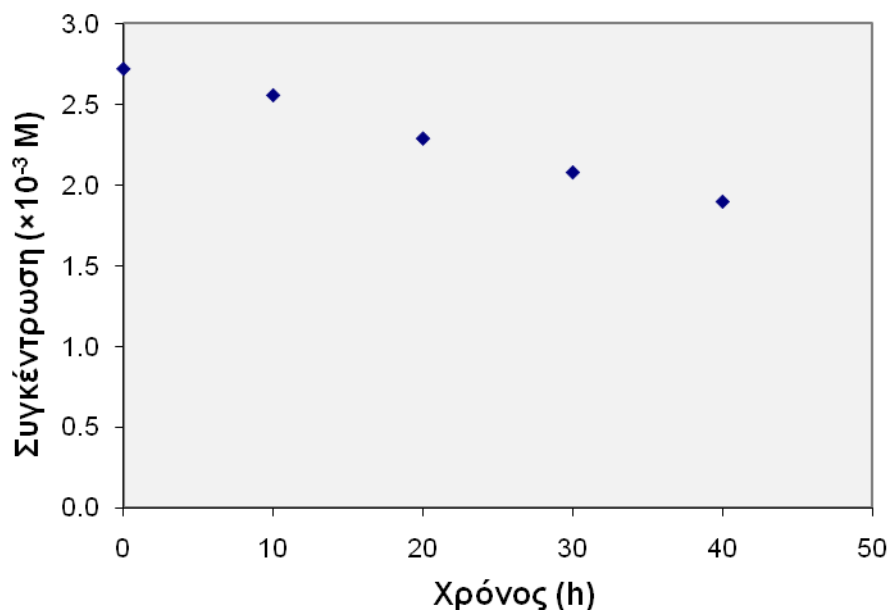
Τα δείγματα υφίστανται την ακτινοβολία από λυχνία αερίου Ξένου και ανά 10 h πραγματοποιείται δειγματοληψία 500 μ L, τα οποία αποθηκεύονται σε μικρό, σφραγιζόμενο περιέκτη (tip) και μακριά από το φως.

Παρασκευή δειγμάτων χρωματογραφικής ανάλυσης από διαλύματα της τάξης 10^{-3} M που έχουν υποστεί ακτινοβολία

Για κάθε ένα από τα δείγματα που δειγματοληπτούνται κατά τη διάρκεια της φωτοαποικοδόμησης αλλά και τα δυο πρότυπα διαλύματα για την κάθε περίπτωση, ακολουθείται η ίδια διαδικασία παρασκευής των διαλυμάτων της χρωματογραφίας. 200 μ L από τα 500 μ L δείγματος αραιώνονται με 1400 μ L κινητής φάσης σε φιαλίδιο της HPLC και το δείγμα αυτό χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της εμφάνισης των προϊόντων διάσπασης. Από το τελευταίο δείγμα 20 μ L αραιώνονται με 1400 μ L κινητής φάσης επίσης και το δείγμα αυτό χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της συγκέντρωσης της καρβεδιλόλης.

Αποτελέσματα και Υπολογισμοί

Από τη γραφική απεικόνιση των υπολογισμένων αποτελεσμάτων για την φωτοχημική αποικοδόμηση του διαλύματος καρβεδιλόλης αρχικής συγκέντρωσης $2,61 \times 10^{-3}$ M, παίρνουμε το γράφημα IA.5.1.



Σχήμα ΙΑ.5.1.: Διάγραμμα παρακολούθησης της συγκέντρωσης σε συνάρτηση τον χρόνο, κατά τη φωτοεπαγόμενη αποικοδόμηση μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης $2,61 \times 10^{-3}$ M παρουσία 4,2 g/L PVP, σε κυψελίδα όγκου 4 mL και με ένταση ακτινοβολίας 750 W/m^2 .

Η μορφή του διαγράμματος ΙΑ.5.1 παραπέμπει σε μηδενοταξική κινητική της αποικοδόμησης, οπότε από την κλίση της ευθείας υπολογίζεται η αντίστοιχη σταθερά ταχύτητας.

$$k_{(10^{-3} \text{ σε PVP } 4,2 \text{ g/L})} = -(\text{κλίση}) \Rightarrow$$

$$k_{(10^{-3} \text{ σε PVP } 4,2 \text{ g/L})} = 2,12 (\pm 0,25) \times 10^{-5} \text{ M h}^{-1}$$

Από την παρακολούθηση των προϊόντων διάσπασης που εμφανίζονται στα παραπάνω διαλύματα προκύπτει ο ακόλουθος πίνακας, στον οποίον συμπεριλαμβάνονται οι χρωματογραφικές κορυφές που ξεπερνούν το 0,05 % της αρχικής συγκέντρωσης της καρβεδιλόλης και αυξάνονται με το χρόνο έκθεσης στη λυχνία αερίου Ξένου.

Πίνακας ΙΑ.5.1. Συγκέντρωση προϊόντων φωτοχημικής αποικοδόμησης μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης, $2,61 \times 10^{-3}$ M παρουσία 4,2 g/L PVP, σε κυψελίδα όγκου 4 mL και με ένταση ακτινοβολίας 750 W/m^2

Rt (min)	% προϊόντων αποικοδόμησης ως προς την αρχική συγκέντρωση της καρβεδιλόλης			
	10h	20h	30h	40h
3,3	0,92	1,92	2,80	2,99
3,8	0,04	0,11	0,10	0,14
4,7	0,14	0,22	0,38	0,52
5,2	0,58	1,18	1,79	2,17
6,8	0,00	0,21	0,44	0,68
7,6	0,23	0,53	0,83	1,17
11,4	0,11	0,27	0,56	0,74
11,7	0,39	0,41	0,83	1,14
12,8	0,00	0,00	0,00	0,11
31,0	0,00	0,39	0,46	0,47

Συμπεράσματα

(α) Από τα αποτελέσματα της μηδενταξικής φωτοαποικοδόμησης καρβεδιλόλης συγκέντρωσης $2,61 \times 10^{-3}$ M, παρατηρείται πως η προσθήκη 4,2 g/L PVP δεν επηρεάζει σημαντικά το ρυθμό φωτοχημικής αποικοδόμησης. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα από τα μεθανολικά διαλύματα της καρβεδιλόλης, για αρχική συγκέντρωση $2,7 \times 10^{-3}$ M η αναμενόμενη σταθερά ταχύτητας φωτοχημικής αποικοδόμησης είναι $\sim 2,0 \times 10^{-5} \text{ M h}^{-1}$, τιμή παραπλήσια στην πειραματική τιμή παρουσία PVP.

Είναι πιθανό η όποια επίδραση του PVP να μην γίνεται αντιληπτή λόγω της χαμηλής του συγκέντρωσης ή λόγω της υψηλής συγκέντρωσης της καρβεδιλόλης. Προτείνεται να ελεγχθεί η επίδραση του ίδιου διαλύματος PVP σε μικρότερη αρχική συγκέντρωση καρβεδιλόλης.

(β) Από την καταγραφή των προϊόντων διάσπασης, παρατηρείται πως ενώσεις που εμφανίζονται με μεγαλύτερη συγκέντρωση και αυξάνονται με τον χρόνο είναι προϊόντα με χρόνο έκλουσης 3,3 min, 5,2 min, 7,6 min και 11,7 min. Πρόκειται για τα ίδια κύρια προϊόντα διάσπασης που παρατηρήθηκαν στα μεθανολικά διαλύματα καρβεδιλόλης δίχως PVP.

ΙΑ.5.2. Παρακολούθηση της φωτοχημικής αποικοδόμησης μεθανολικού διαλύματος της καρβεδιλόλης με αρχική συγκέντρωση $2,08 \times 10^{-5}$ M και παρουσία 4,2 g/L PVP

Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

Από 15,9 mg (0,0390 mmol) και 20,7 mg (0,0508 mmol) πρότυπης καρβεδιλόλης παρασκευάζονται τα πρότυπα διαλύματα με κατάλληλες αραιώσεις.

Παρασκευή δείγματος παρακολούθησης φωτοχημικής αποικοδόμησης

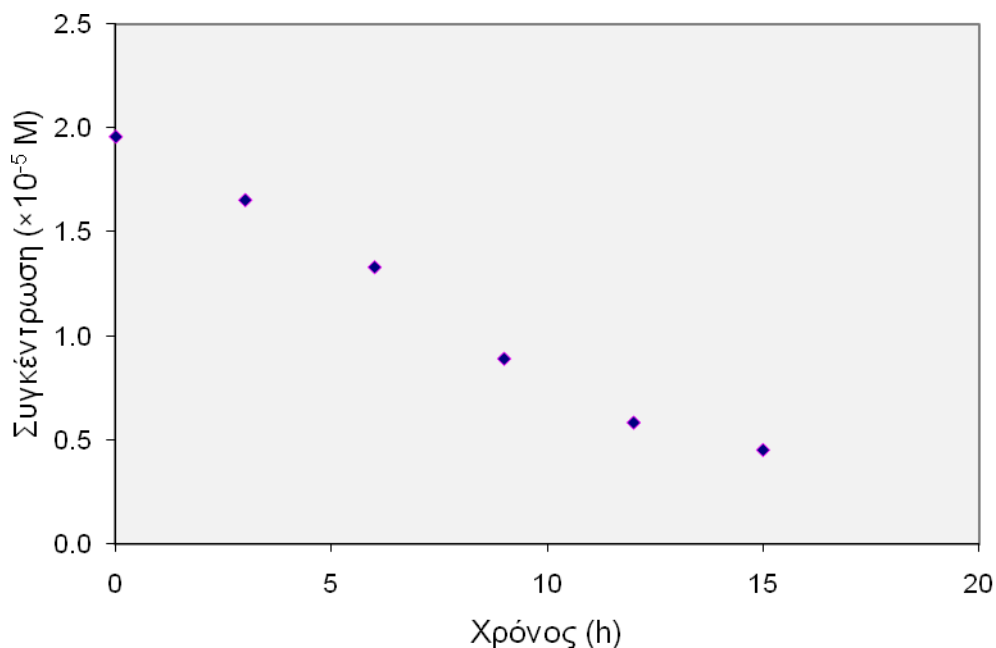
21,2 mg της δραστικής καρβεδιλόλης (0,0522 mmol) ζυγίζονται σε φιάλη των 20 mL και αραιώνονται μέχρι όγκου με διάλυμα 4,2 g/L PVP. Ακολουθεί αραιώση 200 μ L στα 25 mL του ίδιου διαλύτη. Από το τελευταίο διάλυμα μεταφέρονται 4,0 mL σε κάθε μια από τις 2 κυψελίδες εργασίας. Τα δείγματα υφίστανται την ακτινοβολία από λυχνία αερίου Ξένου και ανά 3 h πραγματοποιείται δειγματοληψία 500 μ L.

Παρασκευή δειγμάτων χρωματογραφικής ανάλυσης από διαλύματα της τάξης 10^{-5} M που έχουν υποστεί ακτινοβολία

Κατά τη διάρκεια ελέγχου της φωτοαποικοδόμησης για κάθε ένα από τα δείγματα που έχουν δεχθεί ακτινοβολία αλλά και στα δυο πρότυπα διαλύματα, ακολουθείται η ίδια διαδικασία παρασκευής των διαλυμάτων της χρωματογραφίας. 200 μ L προστίθενται σε HPLC φιαλίδιο δειγματοληψίας που έχουν ήδη μεταφερθεί αν 900 μ L από ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, το υδατικό μέρος της κινητής φάσης.

Αποτελέσματα και Υπολογισμοί

Τα αποτελέσματα που υπολογίζονται για την συγκέντρωση της καρβεδιλόλης την κάθε χρονική στιγμή απεικονίζονται στο γράφημα ΙΑ.5.2.



Σχήμα ΙΑ.5.2.: Διάγραμμα παρακολούθησης της συγκέντρωσης σε συνάρτηση τον χρόνο, κατά τη φωτοεπαγόμενη αποικοδόμηση μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης $2,08 \times 10^{-5} \text{ M}$ παρουσία 4,2 g/L PVP, σε κυψελίδα όγκου 4 mL και με ένταση ακτινοβολίας 750 W/m^2 .

Από τα σημεία, εκτιμάται πως η διάσπαση της καρβεδιλόλης στη συγκέντρωση αυτή ακολουθεί μηδενοταξική κινητική, οπότε από την κλίση της ευθείας του γραφήματος υπολογίζεται η σταθερά ταχύτητας.

$$k_{(10^{-5} \text{ σε PVP } 4,2 \text{ g/L})} = -(\text{κλίση}) \Rightarrow$$

$$k_{(10^{-5} \text{ σε PVP } 4,2 \text{ g/L})} = 1,07 (\pm 0,17) \times 10^{-6} \text{ M h}^{-1}$$

Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα της μηδενοταξικής φωτοαποικοδόμησης της παρατηρείται πως η προσθήκη 4,2 g/L PVP επηρεάζει το φωτοχημικό αποτέλεσμα. Ανατρέχοντας στα τα πειραματικά δεδομένα από τα μεθανολικά διαλύματα της καρβεδιλόλης, για αρχική συγκέντρωση $2,08 \times 10^{-5} \text{ M}$ η αναμενόμενη σταθερά ταχύτητας φωτοχημικής αποικοδόμησης ήταν περίπου $4,8 \times 10^{-7} \text{ M h}^{-1}$, δηλαδή τιμή κατά 50 % μικρότερη από την τιμή που προκύπτει παρουσία PVP.

Σε σύγκριση με το προηγούμενο πείραμα, η χαμηλή συγκέντρωση της καρβεδιλόλης επιτρέπει στην ποσότητα 4,2 g/L PVP να προκαλέσει σημαντική μεταβολή στο ρυθμό φωτοαποικοδόμησης του δραστικού συστατικού.

Προτείνεται να ελεγχθεί η επίδραση PVP υψηλότερης συγκέντρωσης στη φωτοχημική αποικοδόμηση διαλύματος καρβεδιλόλης, τόσο σε χαμηλή όσο και σε υψηλή αρχική συγκέντρωση.

ΙΑ.5.3. Παρακολούθηση της φωτοχημικής αποικοδόμησης μεθανολικού διαλύματος της καρβεδιλόλης με αρχική συγκέντρωση $2,14 \times 10^{-3}$ M και παρουσία 9,7 g/L PVP

Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

Χρησιμοποιούνται 19,0 mg (0,0466 mmol) και 20,2 mg (0,0495 mmol) πρότυπης καρβεδιλόλης για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων.

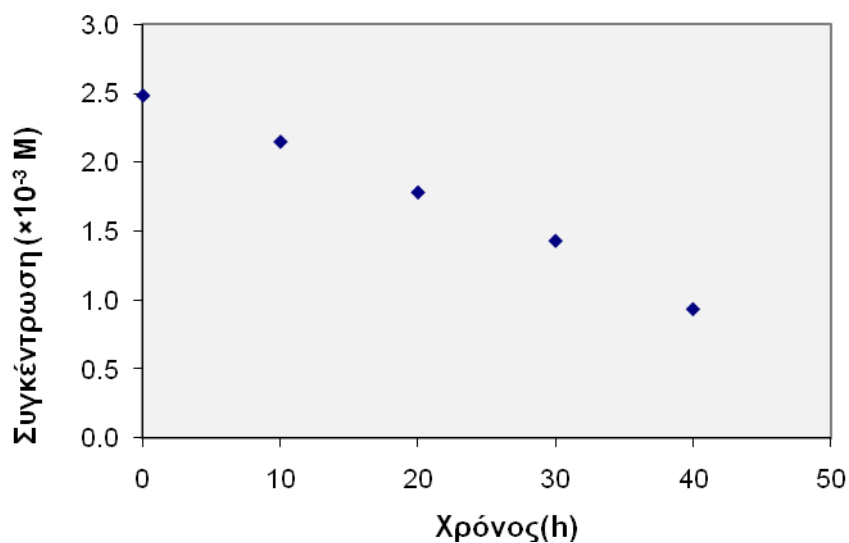
Παρασκευή δείγματος φωτόλυσης

Παρασκευάζεται το διάλυμα καρβεδιλόλης για φωτόλυση, ζυγίζοντας 21,8 mg (0,0536 mmol) δραστικής σε φιάλη των 25 mL και αραιώνονται με διάλυμα 9,7 g/L PVP. Από το τελευταίο διάλυμα μεταφέρονται 4,0 mL σε κάθε μια από 2 κυψελίδες.

Τα δείγματα υφίστανται την ακτινοβολία από λυχνία αερίου Ξένου και ανά 10 h πραγματοποιείται δειγματοληψία 500 μ L, τα οποία αποθηκεύονται σε μικρό, σφραγιζόμενο περιέκτη (tip) και μακριά από το φως. Τα δείγματα αραιώνονται καταλλήλως για την ανάλυσή τους.

Αποτελέσματα και Υπολογισμοί

Από τη γραφική απεικόνιση των υπολογισμένων αποτελεσμάτων παρακολούθησης της φωτοχημικής αποικοδόμησης, παίρνουμε το γράφημα ΙΑ.5.3.



Σχήμα ΙΑ.5.3. Διάγραμμα παρακολούθησης της συγκέντρωσης σε συνάρτηση τον χρόνο, κατά τη φωτοεπαγόμενη αποικοδόμηση μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης $2,14 \times 10^{-3} \text{ M}$ παρουσία 9,7 g/L PVP, σε κυψελίδα όγκου 4 mL και με ένταση ακτινοβολίας 750 W/m^2 .

Η ξεκάθαρη μορφή του διαγράμματος ΙΑ.34 παραπέμπει σε μηδενοταξική κινητική της αποικοδόμησης, οπότε για την σταθερά ταχύτητας έχουμε:

$$k_{(10^{-3} \text{ σε PVP } 9,7 \text{ g/L})} = -(\text{κλίση}) \Rightarrow$$

$$k_{(10^{-3} \text{ σε PVP } 9,7 \text{ g/L})} = 3,82 (\pm 0,47) \times 10^{-5} \text{ M h}^{-1}$$

Συμπεράσματα

Η προσθήκη 9,7 g/L PVP δείχνει να επηρεάζει περισσότερο τη φωτοχημική αποικοδόμηση της καρβεδιλόλης σε σύγκριση με την προσθήκη 4,2 g/L που μελετήθηκε νωρίτερα [$2,12 (\pm 0,25) \times 10^{-5} \text{ M h}^{-1}$].

Το αποτέλεσμα συγκρίνεται με την αναμενόμενη τιμή για την φωτοχημική αποικοδόμηση μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης αρχικής συγκέντρωσης $2,14 \times 10^{-3} \text{ M}$. Η αναμενόμενη σταθερά ταχύτητας φωτοχημικής αποικοδόμησης είναι $\sim 1,7 \times 10^{-5} \text{ M h}^{-1}$, και είναι πολύ μικρότερη από την πειραματική τιμή παρουσία PVP.

Η ένδειξη της επίδρασης του PVP στην φωτοχημική αποικοδόμηση της καρβεδιλόλης που παρατηρήθηκε στο προηγούμενο πείραμα επιβεβαιώνεται και

στην υψηλή συγκέντρωση της καρβεδιλόλης, όταν η συγκέντρωση του PVP σχεδόν διπλασιάζεται. Θα είναι ενδιαφέρον να μελετηθεί η επίδραση της ίδιας συγκέντρωσης PVP και σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης καρβεδιλόλης, τόσο διότι μπορεί να επιβεβαιώσει την παρατήρηση για την επίδραση του PVP όσο και διότι μπορεί να προσφέρει κάποια επιπλέον πληροφορία για την ένταση του φαινομένου.

ΙΑ.5.4. Παρακολούθηση της φωτοχημικής αποικοδόμησης μεθανολικού διαλύματος της καρβεδιλόλης με αρχική συγκέντρωση $1,72 \times 10^{-5}$ M και παρουσία 9,7 g/L PVP

Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

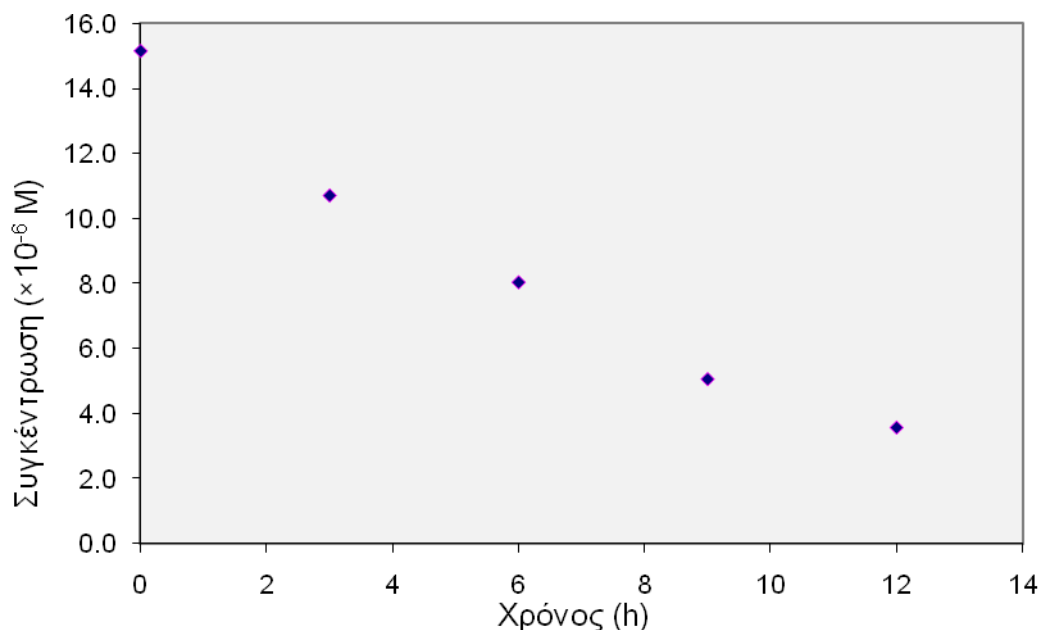
Τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάζονται με 17,7 mg (0,0434 mmol) και 20,3 mg (0,0498 mmol) πρότυπης καρβεδιλόλης καταλλήλως αραιωμένα σε μεθανόλη

Παρασκευή δείγματος φωτόλυσης

Παρασκευάζεται το διάλυμα καρβεδιλόλης για φωτόλυση, ζυγίζοντας 21,8 mg (0,0536 mmol) δραστικής σε φιάλη των 25 mL και αραιώνονται με διάλυμα 9,7 g/L PVP. Ακολουθεί αραιώση 200 μ L στα 25 mL με τον ίδιο διαλύτη και από το τελευταίο μεταφέρονται 4,0 mL σε κάθε μια από τις 2 κυψελίδες εργασίας.

Αποτελέσματα και Υπολογισμοί

Τα πειραματικά δεδομένα της φωτόλυσης απεικονίζονται στο γράφημα ΙΑ.5.4.



Σχήμα ΙΑ.5.4. Διάγραμμα παρακολούθησης της συγκέντρωσης σε συνάρτηση τον χρόνο, κατά τη φωτοεπαγόμενη αποικοδόμηση μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης $1,72 \times 10^{-5}$ M παρουσία 9,7 g/L PVP, σε κυψελίδα όγκου 4 mL και με ένταση ακτινοβολίας 750 W/m^2

Ερμηνεύοντας την κινητική του διαγράμματος ΙΑ.5.4 ως μηδενοταξική, προκύπτει εξίσωση ευθείας με συντελεστή συσχέτισης (R^2) 0,985. Από την κλίση της ευθείας του γραφήματος υπολογίζεται η σταθερά ταχύτητας.

$$k_{(10^{-5} \text{ σε PVP } 9,7 \text{ g/L})} = -(\text{κλίση}) \Rightarrow$$

$$k_{(10^{-5} \text{ σε PVP } 9,7 \text{ g/L})} = 9,62 (\pm 2,66) \times 10^{-7} \text{ M h}^{-1}$$

Η μορφή της γραμμικής απεικόνισης και η τιμή της R^2 (μικρότερη του 0,99) μας υποδεικνύει την πιθανότητα πρωτοταξικής κινητικής στη φωτόλυση, οπότε η σχέση που συνδέει την συγκέντρωση με τον χρόνο είναι εκθετική:

$$\ln C = \ln C_0 - k \times t \Rightarrow \ln C = -11,07 - 0,123 \times t \text{ με } R^2 = 0,997$$

$$k'_{(10^{-5} \text{ σε PVP } 9,7 \text{ g/L})} = 0,123 \text{ h}^{-1}$$

Συμπεράσματα

Η αναμενόμενη σταθερά ταχύτητας φωτοχημικής αποικοδόμησης μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης συγκέντρωσης $1,72 \times 10^{-5}$ M εκτιμάται να είναι $4,2 \times 10^{-7} \text{ M h}^{-1}$ και αφορά μηδενοταξική κινητική.

Στην ερμηνεία του μηχανισμού αποικοδόμησης με μηδενοταξική κινητική, ο συνδυασμός της χαμηλής συγκέντρωσης καρβεδιλόλης με την υψηλή συγκέντρωση PVP προκαλεί τον σχεδόν διπλασιασμό της μετρούμενης σταθεράς ταχύτητας. Η συμπεριφορά αυτή παρατηρήθηκε και σε προηγούμενο πείραμα, στην παρακολούθηση της χαμηλής συγκέντρωσης καρβεδιλόλης παρουσία PVP μικρότερης συγκέντρωσης.

Στο συγκεκριμένο πείραμα ενδιαφέρον παρουσιάζει η ερμηνεία του μηχανισμού αποικοδόμησης ως πρωτοταξικού. Τα αποτελέσματα επιτρέπουν την επεξεργασία τους ως δεδομένα λογαριθμικής συνάρτησης, με καλύτερο, μάλιστα, συντελεστή συσχέτισης από τη γραμμική συνάρτηση.

Είναι πολύ πιθανό η επίδραση που έχει το PVP στην αποικοδόμηση της καρβεδιλόλης να αντισταθμίζει τις παραμέτρους που κρατούν την αποικοδόμηση μηδενοταξική και να επιτρέπει στα περισσότερα μόρια της να συμμετέχουν ενεργά.

Από τα πειραματικά αποτελέσματα γίνεται φανερό πως οι υψηλές συγκεντρώσεις PVP έχουν επίδραση στην ταχύτητα αποικοδόμησης μεθανολικών διαλυμάτων της καρβεδιλόλης. Επιλέγεται να επιβεβαιωθεί η διαπίστωση αυτή μελετώντας την επίδραση μικρής συγκέντρωσης του πολυμερούς σε αντίστοιχης συγκέντρωσης διαλύματα καρβεδιλόλης (τόσο $2,1 \times 10^{-3}$ M όσο και $1,8 \times 10^{-7}$ M).

ΙΑ.5.5. Παρακολούθηση της φωτοχημικής αποικοδόμησης μεθανολικού διαλύματος της καρβεδιλόλης με αρχική συγκέντρωση $2,12 \times 10^{-3}$ M και παρουσία 0,19 g/L PVP

Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

19,8 mg (0,0456 mmol) και 16,1 mg (0,0395 mmol) πρότυπης καρβεδιλόλης χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων.

Παρασκευή δείγματος φωτόλυσης

Παρασκευάζεται το διάλυμα φωτόλυσης, ζυγίζοντας 21,5 mg (0,0529 mmol) δραστικής σε 25 mL διαλύματος 0,19 g/L PVP και από αυτό μεταφέρονται 4,0 mL σε κάθε μια από τις 2 κυψελίδες εργασίας.

Παρασκευή δειγμάτων χρωματογραφικής ανάλυσης από διαλύματα της τάξης 10^{-3} M που έχουν υποστεί ακτινοβολία

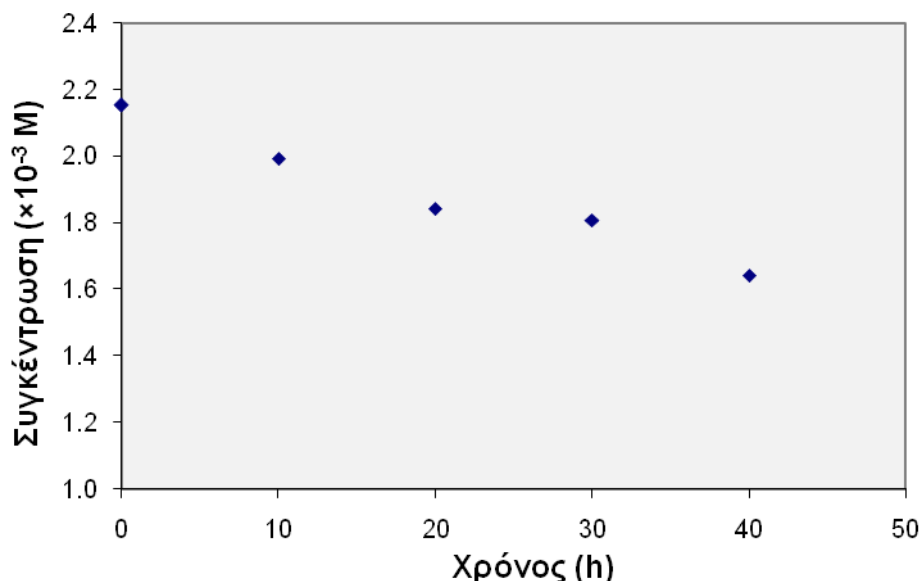
Για κάθε ένα από τα δείγματα που απομακρύνονται από τη συσκευή φωτόλυσης και αποθηκεύονται μακριά από το φως, 200 μ L δείγματος αραιώνονται με 1400 μ L κινητής φάσης σε φιαλίδιο της HPLC.

Από τα πρότυπα διαλύματα μεταφέρονται 1000 μ L σε φιάλη των 10 mL και αραιώνονται με τον ίδιο διαλύτη.

Τόσο από τα διαλύματα αυτά των αραιωμένων δειγμάτων αλλά και από τα δυο πρότυπα διαλύματα, ακολουθείται η ίδια διαδικασία παρασκευής των τελικών διαλυμάτων της χρωματογραφίας. 20 μ L δείγματος μεταφέρονται σε φιαλίδιο της HPLC στο οποίο έχουν προστεθεί 1400 μ L κινητής φάσης.

Αποτελέσματα και Υπολογισμοί

Το διάγραμμα ΙΑ.5.5 παρουσιάζει γραφικά τα αποτελέσματα της κινητικής του πειράματος.



Σχήμα ΙΑ.5.5. Διάγραμμα παρακολούθησης της συγκέντρωσης σε συνάρτηση τον χρόνο, κατά τη φωτοεπαγόμενη αποικοδόμηση μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης $2,12 \times 10^{-3}$ M παρουσία 0,19 g/L PVP, σε κυψελίδα όγκου 4 mL και με ένταση ακτινοβολίας 750 W/m^2 .

Από τα σημεία, εκτιμάται πως η διάσπαση της καρβεδιλόλης στη συγκέντρωση αυτή είναι μηδενοταξική, οπότε από την κλίση της ευθείας του γραφήματος υπολογίζεται η σταθερά ταχύτητας.

$$k_{(10^{-3} \text{ σε PVP } 0,19 \text{ g/L})} = -(\text{κλίση}) \Rightarrow$$

$$k_{(10^{-3} \text{ σε PVP } 0,19 \text{ g/L})} = 1,21 (\pm 0,34) \times 10^{-5} \text{ M h}^{-1}$$

Συμπεράσματα

Η αναμενόμενη σταθερά ταχύτητας φωτοχημικής αποικοδόμησης μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης συγκέντρωσης $2,12 \times 10^{-3}$ M εκτιμάται να είναι $1,7 \times 10^{-5} \text{ M h}^{-1}$, τιμή που βρίσκεται να είναι παραπλήσια με αυτή που υπολογίστηκε από τα αποτελέσματα του πειράματος. Φαίνεται πως η τόσο μικρή συγκέντρωση του PVP δεν επηρεάζει τη φωτοχημική αποικοδόμηση της καρβεδιλόλης.

Με βάση τα μέχρι στιγμής δεδομένα, δεν αναμένεται η ίδια μικρή συγκέντρωση PVP να επηρεάζει καθόλου την σταθερά ταχύτητας φωτοχημικής αποικοδόμησης διαλύματος καρβεδιλόλης μικρότερης συγκέντρωσης. Η επιβεβαίωση θα έρθει μόνο με το σχετικό πείραμα.

ΙΑ.5.6. Παρακολούθηση της φωτοχημικής αποικοδόμησης μεθανολικού διαλύματος της καρβεδιλόλης με αρχική συγκέντρωση $1,69 \times 10^{-5}$ M και παρουσία 0,19 g/L PVP

Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων

19,8 mg (0,0456 mmol) και 16,1 mg (0,0395 mmol) πρότυπης καρβεδιλόλης χρησιμοποιούνται στα πρότυπα διαλύματα.

Παρασκευή δείγματος φωτόλυσης

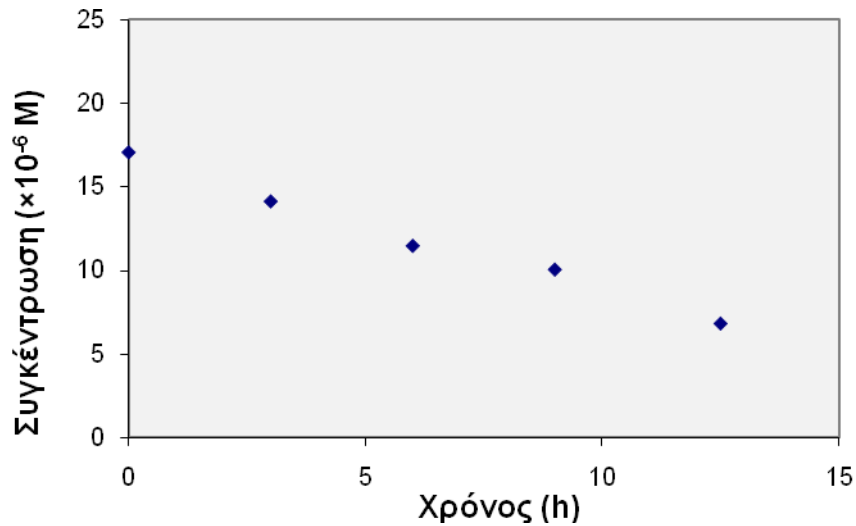
Παρασκευάζεται το διάλυμα φωτόλυσης, ζυγίζοντας 21,5 mg (0,0529 mmol) δραστικής σε 25 mL διαλύματος 0,19 g/L PVP. Ακολουθεί αρραίωση 200 μ L στα 25 mL με τον ίδιο διαλύτη και από το τελευταίο μεταφέρονται 4,0 mL σε κάθε μια από τις 2 κυψελίδες εργασίας.

Παρασκευή δειγμάτων χρωματογραφικής ανάλυσης από διαλύματα της τάξης 10^{-5} M που έχουν υποστεί ακτινοβολία

Για κάθε ένα από τα δείγματα και τα πρότυπα διαλύματα, 200 μ L προστίθενται σε HPLC φιαλίδιο δειγματοληψίας που περιέχει 900 μ L από το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών της κινητής φάσης.

Αποτελέσματα και Υπολογισμοί

Τα δεδομένα παρακολούθησης της συγκέντρωσης της καρβεδιλόλης κατά τη φωτοχημική αποικοδόμηση απεικονίζονται στο γράφημα ΙΑ.5.6.



Σχήμα ΙΑ.5.6. Διάγραμμα παρακολούθησης της συγκέντρωσης σε συνάρτηση τον χρόνο, κατά τη φωτοεπαγόμενη αποικοδόμηση μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης $1,69 \times 10^{-5}$ M παρουσία 0,19 g/L PVP, σε κυψελίδα όγκου 4 mL και με ένταση ακτινοβολίας 750 W/m^2 .

Από τα σημεία, εκτιμάται πως η διάσπαση της καρβεδιλόλης στη συγκέντρωση αυτή είναι μηδενοταξική, οπότε από την κλίση της ευθείας του γραφήματος υπολογίζεται ο συντελεστής ταχύτητας.

$$k_{(10^{-5} \text{ σε PVP } 0,19 \text{ g/L})} = -(\text{κλίση}) \Rightarrow k_{(10^{-5} \text{ σε PVP } 0,19 \text{ g/L})} = 7,89 \times 10^{-7} \text{ M}^1 \text{ h}^{-1}$$

ΙΑ.5.7. Παρατηρήσεις -Συμπεράσματα

Από τα παραπάνω πειράματα, συγκεντρώνουμε στους πίνακες ΙΑ.5.2 και ΙΑ.5.3, τα αποτελέσματα που είναι αξιοσημείωτα.

Πίνακας ΙΑ.5.2. Εκτιμώμενες σταθερές φωτοχημικής αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης σε μεθανολικά διαλύματα συγκέντρωσης 2×10^{-3} M δίχως PVP και αντίστοιχες τιμές παρουσία διαφορετών συγκεντρώσεων PVP

PVP g/L-	Αρχική συγκέντρωση ($\times 10^{-3}$)	Σταθερά ταχύτητας k ($M h^{-1}$)		Λόγος πειρ/αναμ
		Τιμή με PVP	Αναμενόμενη τιμή δίχως PVP	
0,19	2,12	$1,208 \times 10^{-5}$	$1,7 \times 10^{-5}$	0,7
4,2	2,61	$2,122 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-5}$	1,1
9,7	2,14	$3,815 \times 10^{-5}$	$1,7 \times 10^{-5}$	2,2

Πίνακας ΙΑ.5.3. Εκτιμώμενες σταθερές φωτοχημικής αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης σε μεθανολικά διαλύματα συγκέντρωσης 2×10^{-5} M δίχως PVP και αντίστοιχες τιμές παρουσία διαφορετών συγκεντρώσεων PVP

PVP g/L	Αρχική συγκέντρωση ($\times 10^{-5}$)	Σταθερά ταχύτητας k ($M h^{-1}$)		Λόγος πειρ/αναμ
		Τιμή με PVP	Αναμενόμενη τιμή δίχως PVP	
0,19	~1,70	$7,89 \times 10^{-7}$	$4,1 \times 10^{-7}$	1,9
4,2	~2,09	$1,066 \times 10^{-6}$	$4,8 \times 10^{-7}$	2,2
9,7	~1,72	$9,62 \times 10^{-7}$	$4,2 \times 10^{-7}$	2,3

Συμπεράσματα

- ✓ Η παρουσία του PVP επηρεάζει τον ρυθμό των φωτοεπαγόμενων διεργασιών της καρβεδιλόλης.
- ✓ Επίπεδο συγκεντρώσεων καρβεδιλόλης 10^{-3} M
 - Η επίδραση της παρουσίας του PVP φαίνεται ότι μεταβάλλεται με τη μεταβολή της συγκέντρωσης της προστιθέμενης ποσότητάς του.
 - Όσο αυξάνει η συγκέντρωση του PVP στο διάλυμα, επιταχύνεται και η φωτολυτική αποικοδόμηση, ένδειξη για κάποιον πιθανό μηχανισμό ο οποίος την ευνοεί, είτε μεταφέροντας την

προσροφημένη ενέργεια στα μόριά της είτε άμεσα συμμετέχοντας στον μηχανισμό διάσπασης με αποτέλεσμα μικρότερες απαιτήσεις σε ενέργεια.

- Η συνεισφορά όμως του PVP στη σταθερά ταχύτητας δεν είναι αναλογική, όπως φαίνεται από τις 2 υψηλές αναλογίες του. Ίσως διότι όταν η συγκέντρωση υπερβαίνει κάποιο σημείο ισορροπίας ή κορεσμού, η συμβολή του PVP στη διαδικασία παραμένει αμετάβλητη. Η μη αναλογική συνεισφορά μπορεί ακόμη να ερμηνευθεί ως καταλυτική συμβολή του PVP στην αποικοδόμηση. Η όποια επιτάχυνση προκαλείται από την παρουσία του PVP ίσως να αντισταθμίζεται από την πυκνότητα που προκαλούν οι αυξημένες συγκεντρώσεις του (inner filter effect)

✓ Επίπεδο συγκεντρώσεων καρβεδιλόλης 10^{-5} M

- Το διάλυμα είναι αρκετά αραιότερο σε σύγκριση με τα προηγούμενα πειράματα με την καρβεδιλόλη στα 10^{-3} M, οι απόλυτες όμως συγκεντρώσεις του πολυμερούς είναι οι ίδιες με το προηγούμενο πείραμα, συνεπώς οι αναλογίες είναι πολύ διαφορετικές και σίγουρα μη συγκρίσιμες με την 1^η σειρά.
- Η παρουσία του PVP στο διάλυμα έχει σχεδόν διπλασιάσει την ταχύτητα φωτοχημικής αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης σε κάθε περίπτωση.
- Δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο μοντέλο από τις συγκεντρώσεις του PVP και τις αντίστοιχες ταχύτητες φωτοχημικής αποικοδόμησης. Υπάρχουν 2 εκδοχές:
 - (α) το PVP συνεχίζει να ευνοεί τις αντιδράσεις φωτοαποικοδόμησης αλλά στην πολύ μεγάλη του συγκέντρωση (9,7 g/L) βρίσκεται σε πλατό
 - (β) το PVP στις πολύ υψηλές συγκεντρώσεις και στις αναλογίες αυτές παύει να επιταχύνει τη φωτοδιάσπαση της καρβεδιλόλης (σταθεροποίηση φαινομένου) και οι διαφορετικές κλίσεις να είναι αποκλίσεις από την ίδια τιμή-αποτέλεσμα πειραματικού σφάλματος.

- Όποια και αν είναι η εκδοχή για τον τρόπο με τον οποίο το PVP επηρεάζει την φωτοχημική αποικοδόμηση της καρβεδιλόλης, διαφοροποιείται σημαντικά η κινητική που ακολουθεί η αποικοδόμηση. Δεν είναι εύκολο να εκτιμηθεί από τους υπολογισμούς εάν είναι πρωτοταξική ή μηδενοταξική.

Κρίνεται σημαντικό να επαναληφθεί η διερεύνηση της επίδρασης του PVP σε χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης της καρβεδιλόλης. Επιλέγεται να εισαχθεί και η παράμετρος της υδατικής σύστασης του διαλύτη, που έχει ήδη δείξει πως επιταχύνει την φωτοχημική της αποικοδόμηση.

ΙΑ.5.8. Παρακολούθηση της φωτοχημικής αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης με αρχική συγκέντρωση 2×10^{-5} M, σε μεθανολικά διαλύματα παρουσία 4,3 g/L και 0,17 g/L PVP και σε μίγμα μεθανόλης νερού παρουσία 4,3 g/L PVP

Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

Η παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων γίνεται ζυγίζοντας 20,2 mg (0,0495 mmol) και 21,6 mg (0,0530 mmol) πρότυπης καρβεδιλόλης.

Παρασκευή δειγμάτων

Για τη μελέτη της φωτοαποικοδόμησης, παρασκευάζονται δυο διαλύματα καρβεδιλόλης ώστε να προκύψουν τελικά διαφορετικές συγκεντρώσεις και αναλογίες με PVP.

A. 22,0 mg καρβεδιλόλης (0,0540 mmol) διαλύονται στα 25 mL με μεθανολικό διάλυμα 4,3 g/L PVP. Στη συνέχεια, από το διάλυμα αυτό μεταφέρονται από 250 μ L σε 2 φιάλες των 25 mL και συμπληρώνονται η πρώτη με μεθανόλη μέχρι τη χαραγή (διάλυμα A1) και η δεύτερη με 5 mL μεθανόλης και μετά με νερό μέχρι τη χαραγή (διάλυμα A2). Η τελική συγκέντρωση της καρβεδιλόλης και στα δύο δείγματα είναι $2,16 \times 10^{-5}$ M και η περιεκτικότητα σε PVP 4,3 g/L. Στο A1 ο διαλύτης είναι 100 % μεθανόλη ενώ στο A2 η μεθανόλη περιορίζεται στο 20 %.

B. 24,6 mL (0,0603 mmol) καρβεδιλόλης διαλύονται στα 25 mL με μεθανολικό διάλυμα 0,17 g/L PVP. 200 μ L από το τελευταίο μεταφέρονται σε φιάλη των 25 mL και συμπληρώνεται σε όγκο με μεθανόλη. Η τελική συγκέντρωση της καρβεδιλόλης είναι $1,93 \times 10^{-5}$ M ενώ η περιεκτικότητα σε PVP 0,17 g/L. Ο διαλύτης του B είναι 100 % μεθανόλη.

Πειραματικό

4,0 mL από το κάθε διάλυμα μεταφέρονται σε κυψελίδα και υφίστανται ακτινοβολία λυχνίας αερίου Ξένου για 3 h οπότε και δειγματοληπτούνται από όλες 500 μ L. Η ακτινοβολία συνεχίζεται έως τις 6 h, όπου δειγματοληπτούνται άλλα 500 μ L και το περιεχόμενο της κάθε κυψελίδας απορρίπτεται. Μεταφέρονται εκ νέου άλλα 4,0 mL του ίδιου αρχικού διαλύματος (μη

φωτολυμένου) και τα δείγματα υφίστανται ακτινοβολία για 9 h, όπου απομακρύνονται 500 μL από το καθένα, ενώ η διαδικασία τερματίζεται τις 12 h φωτόλυσης, με την τελευταία δειγματοληψία., 500 μL . Τα δείγματα αναλύονται αμέσως.

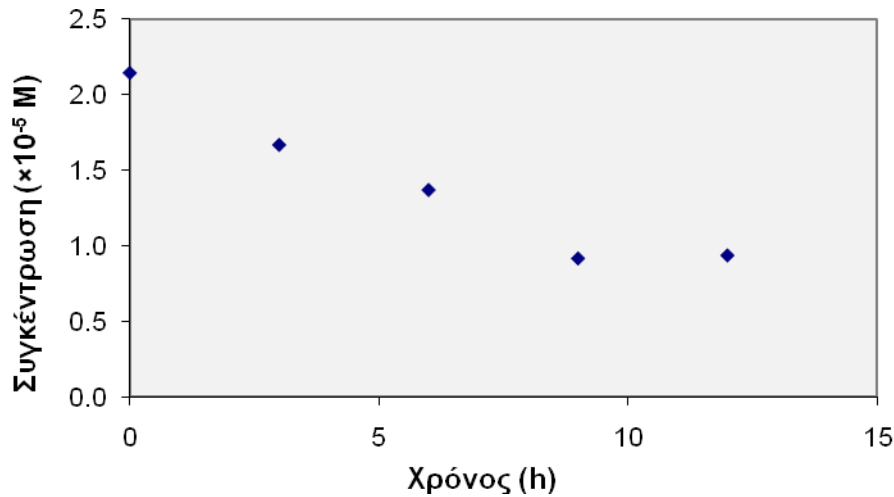
Παρασκευή δειγμάτων χρωματογραφικής ανάλυσης από διαλύματα της τάξης 10^{-5} M που έχουν υποστεί ακτινοβολία

Για κάθε ένα από τα δείγματα και πρότυπα διαλύματα, 200 μL προστίθενται σε φιαλίδιο αυτόματου δειγματολήπτη HPLC που περιέχονται 900 μL από το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών της κινητής φάσης για την παρακολούθηση των εμφανιζόμενων προϊόντων διάσπασης.

Αποτελέσματα και Υπολογισμοί

Από τα χρωματογραφικά αποτελέσματα των προτύπων διαλυμάτων της καρβεδιλόλης υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις του φαρμάκου που δεν έχουν αποικοδομηθεί σε κάθε χρονική στιγμή της φωτόλυσης.

Διάλυμα A1: Είναι το δείγμα με καρβεδιλόλη και 4,3 g/L PVP σε μεθανόλη και τα χρωματογραφικά αποτελέσματα για την κάθε δειγματοληψία δίνονται στο παρακάτω διάγραμμα.



Σχήμα ΙΑ.5.7. Διάγραμμα παρακολούθησης της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με τον χρόνο, κατά τη φωτοεπαγόμενη αποικοδόμηση μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης $2,2 \times 10^{-5} \text{ M}$ παρουσία 4,3 g/L PVP, σε κυψελίδα όγκου 4 mL και με ένταση ακτινοβολίας 750 W/m^2 .

Το πείραμα αυτό μπορεί να θεωρηθεί επανάληψη και υπάρχουν δεδομένα με τα οποία μπορεί να συγκριθεί. Η αξιολόγηση της κινητικής ως μηδενοταξική ή πρωτοταξική, δεν είναι εύκολη ούτε αυτή τη φορά.

Εάν θεωρηθεί ως μηδενοταξική (με συντελεστή συσχέτισης δεδομένων $R^2=0,933$) τότε υπολογίζεται η σταθερά της ταχύτητας από την κλίση της ευθείας

$$k_{(10^{-5} \text{ σε PVP } 4,3 \text{ g/L})} = -(\text{κλίση}) \Rightarrow$$

$$k_{(10^{-5} \text{ σε PVP } 4,3 \text{ g/L})} = 1,06 (\pm 0,45) \times 10^{-6} \text{ M h}^{-1}$$

και δίχως το σημείο 9 h - $R^2=0,96$

$$k_{(10^{-5} \text{ σε PVP } 4,3 \text{ g/L})} = 9,74 (\pm 4,32) \times 10^{-7} \text{ M h}^{-1}$$

Το πιο πιθανό όμως είναι η συσχέτιση της συγκέντρωσης με τον χρόνο να εκφράζεται καλύτερα με πρωτοταξική κινητική, οπότε η σταθερά της ταχύτητας βρίσκεται από την κλίση του λογαρίθμου της συγκέντρωσης σε συνάρτηση τον χρόνο ($R^2=0,939$):

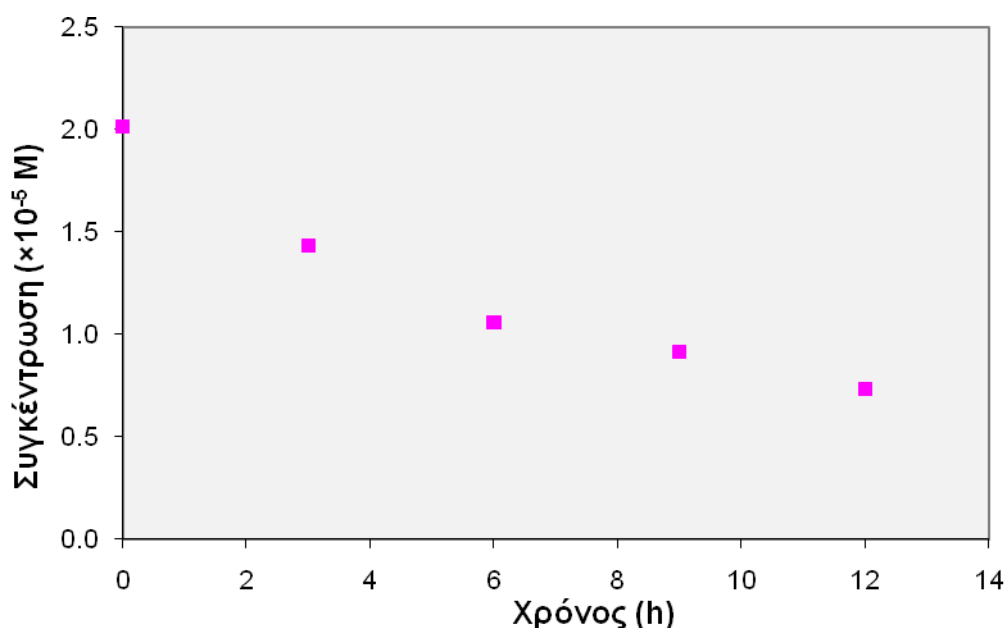
$$k'_{(10^{-5} \text{ σε PVP } 4,3 \text{ g/L})} = -(\text{κλίση}) \Rightarrow$$

$$k'_{(10^{-5} \text{ σε PVP } 4,3 \text{ g/L})} = 7,54 (\pm 3,09) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$$

και δίχως το σημείο 9 h - $R^2=0,996$

$$k'_{(10^{-5} \text{ σε PVP } 4,3 \text{ g/L})} = 6,83 (\pm 0,98) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$$

Διάλυμα A2: Στο δείγμα A2 η συγκέντρωση του PVP είναι πάλι 4,3 g/L, διαφοροποιείται όμως η σύσταση του διαλύτη σε σχέση με το προηγούμενο δείγμα (μόλις 20 % μεθανόλης) και τα χρωματογραφικά αποτελέσματα για την κάθε δειγματοληψία δίνονται στο παρακάτω διάγραμμα, αποκαλύπτοντας πρωτοταξική κινητική.



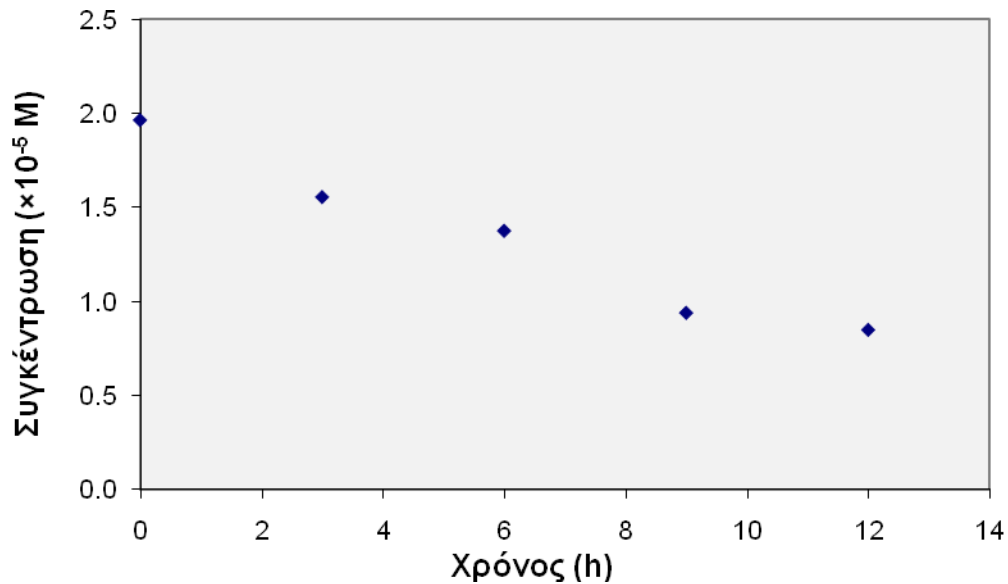
Σχήμα IA.5.8. Διάγραμμα παρακολούθησης της συγκέντρωσης σε συνάρτηση τον χρόνο, κατά τη φωτοεπαγόμενη αποικοδόμηση διαλύματος καρβεδιλόλης $2,2 \times 10^{-5}$ M παρουσία 4,3 g/L PVP με διαλύτη μεθανόλη/νερό 20/80, σε κυψελίδα όγκου 4 mL και με ένταση ακτινοβολίας 750 W/m^2 .

Η συσχέτιση του φυσικού λογαρίθμου της συγκέντρωσης με τον χρόνο ($R^2=0,98$) επιτρέπει τον υπολογισμό του συντελεστή της ταχύτητας:

$$k' (10^{-5} \text{ σε PVP } 4,3 \text{ g/L } -20 \% \text{ μεθανόλη}) = -(\text{κλίση}) \Rightarrow$$

$$k' (10^{-5} \text{ σε PVP } 4,3 \text{ g/L } -20 \% \text{ μεθανόλη}) = 8,23 (\pm 2,03) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$$

Διάλυμα Β: Στο δείγμα Β η συγκέντρωση του PVP είναι αρκετά χαμηλή, 0,17 g/L, και τα χρωματογραφικά αποτελέσματα για την κάθε δειγματοληψία μεταφέρονται σε διάγραμμα και παρουσιάζονται στο σχήμα ΙΑ.5.9.



Σχήμα ΙΑ.5.9. Διάγραμμα παρακολούθησης της συγκέντρωσης σε συνάρτηση τον χρόνο, κατά τη φωτοεπαγόμενη αποικοδόμηση μεθανολικού διαλύματος καρβεδιλόλης $2,2 \times 10^{-5}$ M παρουσία 0,17 g/L PVP, σε κυψελίδα όγκου 4 mL και με ένταση ακτινοβολίας 750 W/m^2 .

Η κινητική αποικοδόμησης είναι μηδενοταξική (με συντελεστή συσχέτισης δεδομένων $R^2=0,98$) και ο συντελεστής της ταχύτητας υπολογίζεται από την κλίση της ευθείας

$$k_{(10^{-5} \text{ σε PVP } 0,17 \text{ g/L})} = -(\text{κλίση}) \Rightarrow$$

$$k_{(10^{-5} \text{ σε PVP } 0,17 \text{ g/L})} = 9,46 (\pm 2,85) \times 10^{-7} \text{ M h}^{-1}$$

ΙΑ.5.9. Έλεγχος παρουσίας PVP στην παρεχόμενη από την ακτινοβολία ενέργεια κατά τη χημική αποικοδόμηση ακτινομετρικού συστήματος

Τα μέχρι στιγμής πειράματα έχουν δείξει την επίδραση που έχει το PVP στην φωτοχημική αποικοδόμηση της καρβεδιλόλης. Η μεγάλη συγκέντρωση του πολυμερούς, συγκριτικά με την συγκέντρωση της καρβεδιλόλης στα ίδια διαλύματα, αυξάνει τις πιθανότητες να δράσει ανταγωνιστικά μειώνοντας τη διαθέσιμη ενέργεια για την υπό μελέτη δραστική. Οι παρατηρήσεις όμως που έχουν γίνει είναι ενδεικτικές της φωτοχημικής αποικοδόμησης αντί για παρεμπόδιση.

Του συνολικού σχολιασμού των προηγούμενων πειραμάτων, κρίνεται ότι πρέπει να προηγηθεί μια γρήγορη μελέτη της συμπεριφοράς του ίδιου πολυμερούς στη φωτοχημική αποικοδόμηση της υδροχλωρικής κινίνης. Πρόκειται για το διεθνώς αποδεκτό ακτινομετρικό σύστημα που χρησιμοποιείται για να ελέγχεται η ποσότητα της ακτινοβολίας που έχουν δεχθεί τα υπό μελέτη δείγματα. Η συγκέντρωση του ακτινομετρικού συστήματος είναι 2 % w/v. Η παρακολούθηση γίνεται μετρώντας την απορρόφηση του διαλύματος στα 400 nm και καταγράφοντας την αύξηση του σήματος του κύριου προϊόντος διάσπασης της κινολίνης.

Παρασκευή διαλυμάτων

Παρασκευάζεται διάλυμα διυδρικής υδροχλωρικής κινίνης μεταφέροντας 1,04 g σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL. Η ουσία διαλύεται με νερό και αραιώνεται με τον ίδιο διαλύτη μέχρι όγκου (διάλυμα Κ).

Σε δυο ογκομετρικές φιάλες των 20 mL μεταφέρονται 0,18 g και 0,57 g PVP και διαλύονται μέχρι όγκου με το διάλυμα Κ. Τα διαλύματα Π1 και Π2 περιέχουν με συγκεντρώσεις PVP 9,2 και 28,7 g/L αντίστοιχα παρουσία 2,1 % w/w διυδρική υδροχλωρική κινίνη).

Πειραματικό μέρος

Τρεις διαφορετικές κυψελίδες συμπληρώνονται με 4,0 mL από τα διαλύματα Κ, Π1 και Π2 και μετράται η απορρόφησή τους τη χρονική στιγμή 0. Ακολούθως, τοποθετούνται στον θάλαμο της συσκευής Atlas και υφίστανται για

17 ώρες ακτινοβολία λυχνίας αερίου Ξένου. Με την ολοκλήρωση της έκθεσης, οι κυψελίδες απομακρύνονται και μετράται ξανά η απορρόφηση στα 400 nm.

Αποτελέσματα και Υπολογισμοί

Οι μετρήσεις απορρόφησης που πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα ΙΑ.5.4.

Πίνακας ΙΑ.5.4. Δεδομένα απορρόφησης διαλύματος υδροχλωρικής κινίνης μετά από έκθεση σε λυχνία αερίου Ξένου για 17 h, παρουσία PVP

Διάλυμα	Κ (δίχως PVP)	Π1 (PVP: 9,2 g/L)	Π2 (PVP: 28,7 g/L)
Απορρόφηση t=0 h (mAU)	90	118	181
Απορρόφηση t=17 h (mAU)	580	564	587
Μεταβολή (mAU)	490	446	406

Παρατηρήσεις

Παρατηρείται πως η αρχική απορρόφηση, των διαλυμάτων που μελετήθηκαν δεν είναι ίδια και αυξάνεται όσο αυξάνεται και η συγκέντρωση του PVP .

Η τελική απορρόφηση των διαλυμάτων μετά την έκθεση τους σε ακτινοβολία λυχνίας αερίου Ξένου παρουσιάζει μεταβολή της απορρόφησης η οποία είναι μεγαλύτερη για το καθαρό διάλυμα της διυδρικής υδροχλωρικής κινίνης και χαμηλότερη για το διάλυμα με την υψηλότερη συγκέντρωση PVP. Σημειώνεται πως οι συγκεντρώσεις τόσο της κινίνης όσο και του PVP δεν θεωρούνται μικρές και αναμένεται η μείωση της ταχύτητας λόγω φαινομένων άπειρου βάθους. Υπάρχουν δυο διαφορετικές πιθανές ερμηνείες για τα αποτελέσματα:

- Αξιολογώντας την τελική απορρόφηση των διαλυμάτων, εκτιμάται πως η κινίνη έχει διασπαστεί σχεδόν το ίδιο και στα 3 διαλύματα. Η αρχική διαφορά της απορρόφησης μεταξύ των διαλυμάτων ίσως οφείλεται σε δομικές μονάδες του PVP που παύουν να απορροφούν στα 400 nm μετά τις 17 h. Στην περίπτωση αυτή η παρουσία του PVP δεν έχει επηρεάσει την φωτοχημική αποικοδόμηση.

- Αξιολογώντας την μεταβολή στην απορρόφηση του κάθε διαλύματος, παρατηρείται να μειώνεται η διάσπαση της κινίνης όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα του διαλύματος σε PVP. Το πολυμερές μπορεί να δρα είτε ανταγωνιστικά στην απορρόφηση της ενέργειας είτε συνεργαστικά στη σκέδαση του φωτός οπότε να μη φθάνει μέχρι τον πυθμένα της κυψελίδας.

ΙΑ.5.10. Παρατηρήσεις -Συμπεράσματα

Από το τελευταίο πείραμα του PVP με την υδροχλωρική κινίνη φαίνεται πως το PVP μπορεί να δράσει ανταγωνιστικά είτε απορροφώντας μέρος της ακτινοβολίας της λυχνίας αερίου Ξένου είτε δυσχεραίνοντας τη μέση διαδρομή του φωτός μέσα στο δείγμα. Στην περίπτωση όμως της καρβεδιλόλης παρουσιάζει έντονη θετική επίδραση, δηλαδή την επιτάχυνση, στην ταχύτητα της φωτοχημικής αποικοδόμησης, η οποία εξισορροπεί τα παραπάνω φαινόμενα αλλά και είναι ικανή να αντιστρέψει το αποτέλεσμα.

Πιο συγκεκριμένα, για τα διαλύματα με χαμηλή συγκέντρωση καρβεδιλόλης, τα αποτελέσματα της σταθεράς ταχύτητας διάσπασης της καρβεδιλόλης σε σχέση με την αναλογία του PVP των συμπληρωματικών πειραμάτων προστίθενται στον πίνακα με τα προηγούμενα και παρατίθενται όλα στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας ΙΑ.5.5. Εκτιμώμενες σταθερές φωτοχημικής αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης σε μεθανολικά διαλύματα συγκέντρωσης $\sim 2 \times 10^{-5}$ M δίχως PVP και αντίστοιχες τιμές παρουσία διαφορετών συγκεντρώσεων PVP

PVP g/L	Αρχική συγκέντρωση ($\times 10^{-5}$ M)	Σταθερά ταχύτητας k (M h ⁻¹)		Λόγος πειρ/αναμ
		Τιμή με PVP	Αναμενόμενη τιμή δίχως PVP	
0,19	1,70	$7,89 \times 10^{-7*}$	$4,1 \times 10^{-7}$	1,9
4,2	2,09	$10,66 \times 10^{-7**}$	$4,8 \times 10^{-7}$	2,2
9,7	1,72	$9,62 \times 10^{-7***}$	$4,2 \times 10^{-7}$	2,3
4,3	2,16	$9,74 \times 10^{-7****}$	$5,0 \times 10^{-7}$	1,9
0,17	1,93	$9,46 \times 10^{-7}$	$4,6 \times 10^{-7}$	2,1

***0,060 h⁻¹ για πρωτοταξική!!**

****0,110 h⁻¹ για πρωτοταξική!!**

*****0,123 h⁻¹ για πρωτοταξική!!**

******0,068 h⁻¹ για πρωτοταξική!!**

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την παρακολούθηση του ρυθμού της φωτοχημικής αποικοδόμησης μεθανολικών διαλυμάτων καρβεδιλόλης συγκέντρωσης 10^{-5} M παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων PVP, σημειώνονται τα εξής:

- ✓ Όλα τα αποτελέσματα από τα πέντε διαφορετικά πειράματα δεν μπορούν να συγκριθούν με τα αντίστοιχα της υψηλότερης κατά 2 τάξεις μεγέθους, όσο αφορά στον ρυθμό της φωτοχημικής αποικοδόμησης. Οι κινητικές είναι στο όριο χαρακτηρισμού μεταξύ μηδενοταξικής και πρωτοταξικής.
- ✓ Σε κάθε αναλογία τα αποτελέσματα δείχνουν **επιτάχυνση** της αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης παρουσία PVP από το διάλυμα του φαρμάκου δίχως PVP, γεγονός που φανερώνει ότι υπάρχει κάποια επίδραση.

Συνολικά, διαπιστώνεται η επιτάχυνση της φωτοχημικής αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης από το PVP. Δεν υπάρχουν ενδείξεις για το είδος της συμβολής στον μηχανισμό αλλά απουσία αναλογικότητας, ισχυροποιείται η πρόταση της δράσης του PVP ως καταλύτη στην φωτοαποικοδόμηση της καρβεδιλόλης, ως φωτοευαισθητοποιητής.

ΙΒ. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΗΣ ΣΤΟΝ ΡΥΘΜΟ ΦΩΤΟΛΥΤΙΚΗΣ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΚΑΡΒΕΔΙΛΟΛΗΣ

Οι κυκλοδεξτρίνες είναι γνωστές για την βελτίωση της διαλυτότητας που προκαλούν σε δυσδιάλυτες δραστικές ουσίες, συνήθως μέσω του εγκλεισμού των μορίων των δραστικών ενώσεων στην κοιλότητά τους.

Τα πρωτόκολλα παρακολούθησης της μεταβολής της διαλυτότητας δυσδιάλυτων ουσιών ως αποτέλεσμα της παρουσίας κυκλοδεξτρίνης απαιτούν την παραμονή των διαλυμάτων μέχρι την αποκατάσταση ισορροπίας μεταξύ των ελεύθερων μορίων δραστικής ουσίας και των συμπλόκων τους. Η παραμονή αυτή περιλαμβάνει ταυτόχρονη ανακίνηση όλων των δειγμάτων με σταθερή συχνότητα και σταθερή θερμοκρασία μέχρι την αποκατάσταση ισορροπίας στο αντιστρεπτό σύστημα ελεύθερου δραστικού μορίου και του συμπλόκου φαρμάκου και κυκλοδεξτρίνης. Η εκτίμηση του χρόνου που πρέπει να παρέλθει για την αποκατάσταση της ισορροπίας μπορεί να πραγματοποιηθεί εκτός από άλλες τεχνικές και με τη βοήθεια του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, παρακολουθώντας το τέλος της διαδικασίας μεταβολών στα φάσματα που προκύπτει από τη σύμπλεξη.

ΙΒ.1. Παρακολούθηση πορείας συμπλοκοποίησης της β-CD με την καρβεδιλόλη, με διαλύτη μίγμα μεθανόλης και νερού

Περιγραφή πειράματος

19,6 mg καρβεδιλόλης διαλύονται σε 1300 μL δευτεριωμένης μεθανόλης (διάλυμα Α, $3,71 \times 10^{-2}$ M). 100 μL από το διάλυμα Α αραιώνονται με 900 μL του ίδιου διαλύτη και με 430 μL δευτεριωμένο νερό (διάλυμα Β, $2,59 \times 10^{-3}$ M). 700 μL του διαλύματος μεταφέρονται σε ειδικό σωληνάκι για φασματοσκοπία NMR και λαμβάνεται το φάσμα της ουσίας στον συγκεκριμένο διαλύτη.

700 μL του διαλύματος Β μεταφέρονται σε ένα δεύτερο σωληνάκι και προστίθενται 4,0 mg $\beta\text{-CD}$ της εταιρείας Sigma Aldrich (διάλυμα Γ). Το διάλυμα Γ ανακινείται με vortex και στη συνέχεια λαμβάνεται το ^1H -φάσμα του, στους 300 K και με αριθμό σαρώσεων 32. Η επεξεργασία τους γίνεται ρυθμίζοντας την κορυφή της μεθανόλης στα 3,3100 ppm.

Στη συνέχεια αποθηκεύεται προστατευμένο από το φως και παρακολουθούνται με NMR οι πιθανές φασματικές μεταβολές του στο πέρας 14 ημερών.

Υπολογισμοί και Αποτελέσματα

Στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται οι μεταβολές στις θωρακίσεις των πρωτονίων της καρβεδιλόλης που οφείλονται στην προσθήκη της $\beta\text{-CD}$ ως προς τον χρόνο παραμονής του δείγματος.

Πίνακας IB.1.1. Χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων της καρβεδιλόλης ως αποτέλεσμα της προσθήκης $\beta\text{-CD}$ κατά τον χρόνο παραμονής του δείγματος με διαλύτη $\text{MeOD}/\text{D}_2\text{O}$ 7/3.

		Αρίθμηση πρωτονίου								
		3b	3b	1''	3a	3a	CH3	2''	1a	1b
Διάλυμα Β		2,989	3,020	3,089	3,117	3,149	3,720	4,138	4,267	4,280
Διάλυμα Γ (μέρες)	0	3,017	3,048	3,118	3,146	3,177	3,720	4,150	4,273	4,286
	5	3,040	3,071	3,141	3,168	3,200	3,719	4,158	4,277	4,289
	7	3,042	3,073	3,143	3,171	3,202	3,719	4,159	4,277	4,290
	12	3,047	3,078	3,149	3,176	3,207	3,719	4,160	4,278	4,291
	15	3,049	3,080	3,151	3,178	3,209	3,718	4,161	4,278	4,291

		Αρίθμηση πρωτονίου								
		1'	4'''&5'''	3'''&6'''	3'	6'	2'	7'	8'	5'
Διάλυμα Β		6,724	6,889	6,938	7,120	7,063	7,327	7,322	7,451	8,223
Διάλυμα Γ (μέρες)	0	6,726	6,892	6,942	7,123	7,059	7,329	7,322	7,452	8,220
	5	6,726	6,893	6,940	7,124	7,054	7,329	7,319	7,450	8,215
	7	6,727	6,894	6,945	7,124	7,054	7,330	7,320	7,451	8,216
	12	6,728	6,894	6,945	7,125	7,054	7,331	7,320	7,451	8,215
	14	6,728	6,895	6,945	7,125	7,053	7,331	7,320	7,451	8,214

Σχόλια

Η προσθήκη της $\beta\text{-CD}$ αποθωρακίζει τα περισσότερα πρωτόνια της καρβεδιλόλης και ιδιαίτερα αυτά που βρίσκονται στην αλειφατική περιοχή. Το

μεθύλιο και τα πρωτόνια του τρικυκλικού διακτυλίου 7' και 8' παραμένουν σταθερά ενώ παρατηρείται μια μικρή τάση για θωράκιση στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων στα πρωτόνια 5' και 6'.

Η παρακολούθηση του διαλύματος Γ για 14 μέρες αποκαλύπτει πως τα πρωτόνια στα οποία παρατηρείται μεταβολή της χημικής μετατόπισης κατά την προσθήκη της β-CD συνεχίζουν την ίδια πορεία θωράκισης ή αποθωράκισής τους έχοντας σχεδόν φθάσει σε ισορροπία στις 14 μέρες.

Αλλαγές στις χημικές μετατοπίσεις πολλών πρωτονίων της καρβεδιλόλης παρατηρούνται με την προσθήκη της β-CD, και μπορούν να αποδοθούν σε μεταβολή του ηλεκτρονιακού περιβάλλοντος της καρβεδιλόλης από τον διαλύτη. Η μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις για όλα τα πρωτόνια υπολογίζεται για τις 5 πρώτες μέρες και συγκρίνεται με την αντίστοιχη τιμή που υπολογίζεται για τις 10 ακόλουθες μέρες. Παρατηρείται πως οι 5 πρώτες μέρες είναι αρκετές για την εμφάνιση φασματοσκοπικών μεταβολών που δηλώνουν τις πιθανές υπερμοριακές αλληλεπιδράσεις ή και πιθανής συμπλοκοποίηση των δυο ουσιών. Το φαινόμενο συνεχίζεται να παρακολουθείται αλλά δεν εξελίσσεται σημαντικά μέχρι τις 14 μέρες.

Σκοπός του πειράματος ήταν να μελετηθεί η συμπλοκοποίηση, εάν αυτή υπάρχει μεταξύ των μορίων των δυο ουσιών, και να επιβεβαιωθεί με φάσμα δυο διαστάσεων όταν θα είχε αποκατασταθεί η ισορροπία. Τα φάσματα δυο διαστάσεων που μελετήθηκαν δεν έκαναν δυνατή την επιβεβαίωση.

Ο χρόνος παραμονής για την ολοκλήρωση της συμπλοκοποίησης δεν ικανοποιεί τις ανάγκες της εργασίας. Είναι πιθανό η καθυστέρηση της ολοκλήρωσης της συμπλοκοποίησης της καρβεδιλόλης με την β-CD και η πιθανή ασθενής σύνδεση να οφείλεται στην παρουσία της μεθανόλης στον διαλύτη, σε ποσοστό 70 % αυτού. Θα πρέπει να απομακρυνθεί η μεθανόλη από τον διαλύτη και να επιλεγθεί άλλο πρωτόκολλο για την επιβεβαίωση της συμπλοκοποίησης.

Η χρήση της β-CD σε πλήρως υδατικό περιβάλλον περιορίζεται από τη μικρή διαλυτότητά της, αλλά μπορεί να αντικατασταθεί στα πειράματα με την

ευρέως γνωστή μερικώς υποκατεστημένη μορφή της, την HP-β-CD. Η κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης παραμένει η ίδια ενώ οι υποκαταστάτες υποβοηθούν τη διαλυτοποίησή της.

IB.2. Χρωματογραφική παρακολούθηση της πορείας συμπλοκοποίησης της καρβεδιλόλης με HP-β-CD

Η γνώση της διάρκειας που απαιτείται για την αποκατάσταση της ισορροπίας μεταξύ HP-β-CD και καρβεδιλόλης χρησιμοποιείται για τον σχεδιασμό του πρωτοκόλλου παρακολούθησης της μεταβολής διαλυτότητας της καρβιδιλόλης. Ο σχεδιασμός περιλαμβάνει τη μελέτη της μεταβολής σε πέντε διαφορετικές θερμοκρασίες.

Τα πρωτόκολλα αυτά μπορούν να δώσουν πληροφορίες τόσο στη μεταβολή της διαλυτότητας όσο και στο είδος του συμπλόκου που σχηματίζεται. Τα αποτελέσματα του πειράματος θα συμβάλλουν στον σχεδιασμό του επόμενου βήματος και στόχου της όλης μελέτης, στην επίδραση της συμπλοκοποίησης στην ταχύτητα φωτόλυσης της καρβεδιλόλης.

Περιγραφή πειράματος

Παρασκευάζονται τα διαλύματα με αυξανόμενες τελικές συγκεντρώσεις HP-β-CD του πίνακα IB.2.1. Στη συνέχεια, τα διαλύματα αυτά μεταφέρονται σε υάλινα δοχεία, προστίθενται περίπου 25 mg καρβεδιλόλης στο καθένα, μεγάλο μέρος της οποίας παραμένει αδιάλυτο, και τα δοχεία πωματίζονται. Μεταφέρονται σε υδατόλουτρο το οποίο ρυθμίζεται να θερμαίνονται σε σταθερή θερμοκρασία, επιλέγονται οι 25 °C, και με ανακίνηση 30 U/min για 5 μέρες.

Πίνακας IB.2.1. Παρασκευή διαλυμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων HP-β-CD τελικού όγκου 20 mL για την μελέτη της διαλυτότητας της καρβεδιλόλης σε υδατικό περιβάλλον.

<i>α/α</i>	HP-β-CD ¹ (mg)	Συγκέντρωση HP-β-CD (M)	Στερεή Καρβεδιλόλη (mg)
0	0,0	0	25
1	79,5	$2,53 \times 10^{-3}$	25
2	159,4	$5,07 \times 10^{-3}$	25
3	239,7	$7,62 \times 10^{-3}$	25
4	472,7	$1,50 \times 10^{-2}$	25
5	630,9	$2,01 \times 10^{-2}$	25
6	948,3	$3,01 \times 10^{-2}$	25
7	1577,3	$5,01 \times 10^{-2}$	25
8	2541,8	$8,08 \times 10^{-2}$	25
9	3409,7	$1,08 \times 10^{-1}$	25

¹Η υγρασία της κυκλοδεξτρίνης είναι 7,57 % και δεν υπολογίζεται στην τελική συγκέντρωση του κάθε διαλύματος.

Στο τέλος των 5 ημερών, διακόπτεται η ανακίνηση και τοποθετούνται μέσα στο υδατόλουτρο δέκα δοκιμαστικοί σωλήνες, αντίστοιχος αριθμός συριγγών, φίλτρων και tips για μικροπιπέτα. Μαζί με αυτά τοποθετείται στο υδατόλουτρο το ακετονιτρίλιο που θα χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης. Τα δείγματα παραμένουν 90 min σε κατάσταση ηρεμίας.

Ακολούθως απομακρύνονται με τη σύριγγα 2 mL από το διάλυμα 0 και διηθούνται από μικρο-ηθμό acrodisc GHP-GF 0.45. Το διήθημα συλλέγεται σε κάποιον από τους δοκιμαστικούς σωλήνες. Τέλος, 650 μ L από το διήθημα μεταφέρονται σε φιαλίδιο αυτόματου δειγματολήπτη υγρής χρωματογραφίας που περιέχει ίσο όγκο ακετονιτρίλιου, το φιαλίδιο πωματίζεται και ανακινείται. Η πορεία αυτή επαναλαμβάνεται και για τα υπόλοιπα 9 δείγματα, με μεγάλη προσοχή να μη μεταβληθούν οι θερμοκρασίες των σκευών που χρησιμοποιούνται καθώς ποσότητα καρβεδιλόλης μπορεί να καθιζάνει να κρυσταλλώσει στα τοιχώματα.

Στο τέλος της διαδικασίας, το υδατόλουτρο ρυθμίζεται σε νέα θερμοκρασία παραμονής των δειγμάτων και επαναφέρεται η ανακίνησή τους.

Οι πραγματικές θερμοκρασίες στις οποίες πραγματοποιούνται οι δειγματοληψίες είναι 24,3, 30,0, 36,9, 44,9 και 51,9 °C.

Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

Σε ογκομετρική φιάλη των 20 mL μεταφέρονται 25,6 mg πρότυπης καρβεδιλόλης και αραιώνονται με κινητή φάση μέχρι χαραγής. Ακολουθούν διαδοχικές αραιώσεις και παρασκευάζονται διαλύματα στο εύρος των συγκεντρώσεων από $3,78 \times 10^{-5}$ M έως $3,15 \times 10^{-4}$ M.

Επεξεργασία δειγμάτων για τον χρωματογραφικό έλεγχο

Όλα τα δείγματα που προέρχονται από τα διαλύματα 6-9 υφίστανται αραιώση. 350 μ L του δείγματος αραιώνονται με 1400 μ L μίγματος

ακετονιτριλίου νερού 1/1 πριν την εισαγωγή τους στη χρωματογραφική διάταξη. Τα υπόλοιπα δείγματα και τα πρότυπα διαλύματα εισάγονται δίχως επεξεργασία.

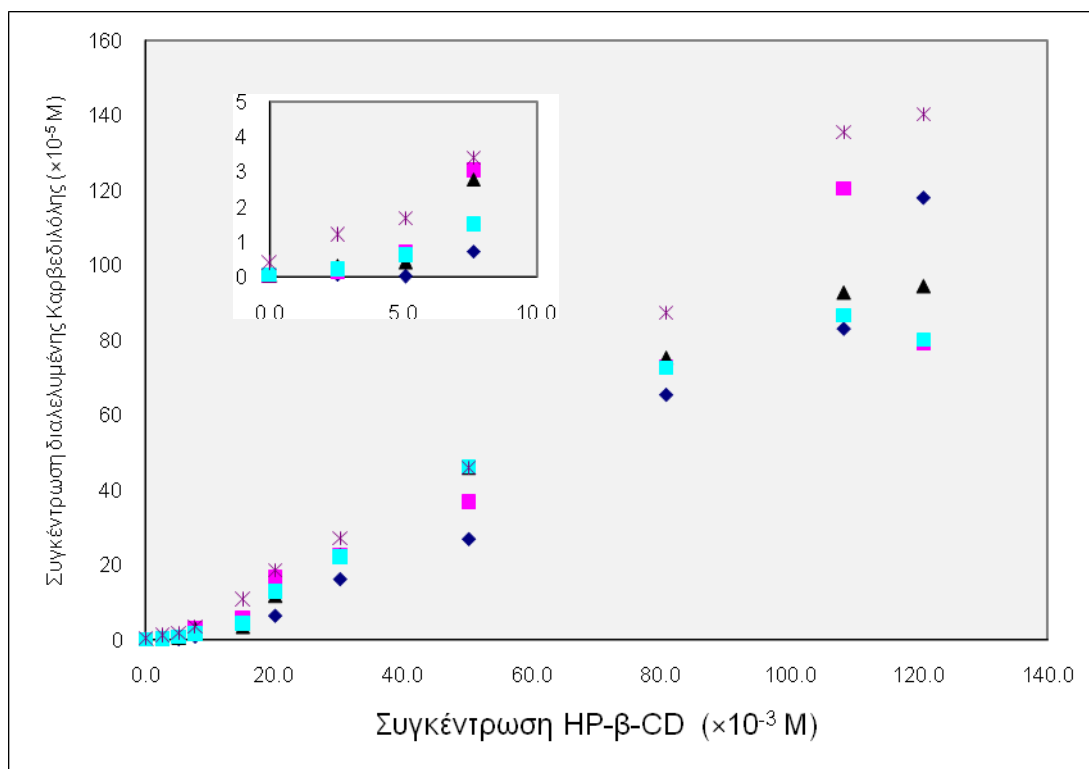
Υπολογισμοί και Αποτελέσματα

Από τη χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων και με τη χρήση των προτύπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης, οι συγκεντρώσεις της καρβεδιλόλης σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν υπολογίζονται και παρατίθενται στον πίνακα IB.2.2.

Πίνακας IB.2.2. Συγκεντρώσεις που εκφράζουν τη διαλυτότητα της καρβεδιλόλης σε κάθε θερμοκρασία και παρουσία συγκεκριμένης συγκέντρωσης HP-β-CD.

C (M) HPβCD	Συγκεντρώσεις καρβεδιλόλης (M) σε θερμοκρασία (°C)				
	24,3	30,0	36,9	44,9	51,9
0	$3,02 \times 10^{-7}$	$3,60 \times 10^{-7}$	$5,34 \times 10^{-7}$	$7,12 \times 10^{-7}$	$3,58 \times 10^{-6}$
$2,53 \times 10^{-3}$	$6,29 \times 10^{-7}$	$1,19 \times 10^{-6}$	$3,17 \times 10^{-6}$	$1,99 \times 10^{-6}$	$1,18 \times 10^{-5}$
$5,07 \times 10^{-3}$	$1,86 \times 10^{-7}$	$7,29 \times 10^{-6}$	$4,14 \times 10^{-6}$	$5,99 \times 10^{-6}$	$1,68 \times 10^{-5}$
$7,62 \times 10^{-3}$	$7,33 \times 10^{-6}$	$3,02 \times 10^{-5}$	$2,79 \times 10^{-5}$	$1,48 \times 10^{-5}$	$3,41 \times 10^{-5}$
$1,50 \times 10^{-2}$	$4,50 \times 10^{-5}$	$5,79 \times 10^{-5}$	$3,38 \times 10^{-5}$	$4,27 \times 10^{-5}$	$1,07 \times 10^{-4}$
$2,01 \times 10^{-2}$	$6,27 \times 10^{-5}$	$1,66 \times 10^{-4}$	$1,16 \times 10^{-4}$	$1,28 \times 10^{-4}$	$1,85 \times 10^{-4}$
$3,01 \times 10^{-2}$	$1,61 \times 10^{-4}$	$2,26 \times 10^{-4}$	$2,25 \times 10^{-4}$	$2,21 \times 10^{-4}$	$2,70 \times 10^{-4}$
$5,01 \times 10^{-2}$	$2,68 \times 10^{-4}$	$3,67 \times 10^{-4}$	$4,59 \times 10^{-4}$	$4,63 \times 10^{-4}$	$4,59 \times 10^{-4}$
$8,08 \times 10^{-2}$	$6,53 \times 10^{-4}$	$7,29 \times 10^{-4}$	$7,52 \times 10^{-4}$	$7,27 \times 10^{-4}$	$8,73 \times 10^{-4}$
$1,08 \times 10^{-1}$	$8,30 \times 10^{-4}$	$1,20 \times 10^{-3}$	$9,27 \times 10^{-4}$	$8,67 \times 10^{-4}$	$1,36 \times 10^{-3}$

Τα αποτελέσματα του πίνακα IB.2.2. παρατίθενται στο διάγραμμα που ακολουθεί με τη λεπτομέρεια στην περιοχή των 3 πρώτων συγκεντρώσεων.



Σχήμα IB.2.1. Γραφική απεικόνιση της διαλυτότητας της καρβεδιλόλης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της HP-β-CD μετά από ανακίνηση σε διαφορετικές θερμοκρασίες. (\blacklozenge) 25 °C (\blacksquare) 30 °C (\blacktriangle) 37 °C (\blacksquare) 45 °C (\ast) 52 °C

Υπολογισμοί - Αποτελέσματα

Όλες οι καμπύλες διαλυτότητας της καρβεδιλόλης σε διαφορετικές θερμοκρασίες παρουσία της HP-β-CD είναι της μορφής A_p , ενδεικτική του σχηματισμού ευδιάλυτου συμπλόκου εγκλεισμού στοιχειομετρίας μεγαλύτερης της 1:1.

Από το αρχικό γραμμικό τμήμα του διαγράμματος που προκύπτει σε κάθε θερμοκρασία, μπορεί να εξαχθεί η τιμή της σταθεράς σύνδεσης του συμπλόκου στη συγκεκριμένη θερμοκρασία. Από τη συσχέτιση της σταθεράς σύνδεσης και της θερμοκρασίας, μπορούν να εξαχθούν οι τιμές για τις φυσικοχημικές παραμέτρους που αφορούν το συγκεκριμένο σύμπλοκο.

Το επόμενο βήμα επεξεργασίας είναι ο υπολογισμός των γραμμικών εξισώσεων για την κάθε θερμοκρασία. Αυτές δίνουν τα ακόλουθα αποτελέσματα:

Πίνακας IB.2.3. Δεδομένα γραμμικών εξισώσεων που υπολογίζονται από τη διαλυτότητα της καρβεδιλόλης στην HP-β-CD για την κάθε μελετώμενη θερμοκρασία

	24,3 °C	30,0 °C	36,9 °C	44,9 °C	51,9 °C
Κλίση	$9,145 \times 10^{-3}$	$8,836 \times 10^{-3}$	$8,690 \times 10^{-3}$	$7,832 \times 10^{-3}$	$1,213 \times 10^{-2}$
R ²	0,98284	0,95544	0,99265	0,98268	0,99516

Ο σταθερός όρος των εξισώσεων θα πρέπει να εκφράζει τη διαλυτότητα της καρβεδιλόλης σε κάθε θερμοκρασία δίχως την επίδραση της HB-β-CD.

Σημαντική παράμετρος είναι τα σημεία που θα χρησιμοποιηθούν ανά θερμοκρασία ως ευθύγραμμη συσχέτιση της διαλυτότητας με τη συγκέντρωση της κυκλοδεξτρίνης. Στη συγκεκριμένη περίπτωση και σε όλες τις καμπύλες, εάν ληφθούν οι τιμές στα 3 πρώτα δείγματα, θυμίζουν εκθετική συνάρτηση που στη συνέχεια γίνεται γραμμική. Εάν επιλεγεί να αγνοηθούν κάποια από τα 4 πρώτα σημεία της κάθε καμπύλης ως πειραματικό λάθος για τον υπολογισμό των εξισώσεων, δεν αλλάζει κάτι στις τελικές τιμές, οπότε κρατώνται οι τιμές όπως αυτά παρουσιάστηκαν στον πίνακα 6.

Χρησιμοποιώντας την κλίση στην κάθε εξίσωση και τη συγκέντρωση του «μηδενικού» σημείου, αυτού δίχως κυκλοδεξτρίνη, θεωρώντας πως δίνει τη διαλυτότητα του φαρμάκου (S_0) σε κάθε θερμοκρασία, μπορεί να υπολογιστή η σταθερά σύμπλεξης K_C από τη σχέση:

$$K_C = \frac{a}{[S_0 \times (1 - a)]} \quad \text{Εξίσωση IB.1}$$

Τα αποτελέσματα για την κάθε θερμοκρασία παρατίθενται στον πίνακα IB.2.3. Η θερμοκρασία μετατρέπεται σε K για να μπορέσει να γίνει μετά συσχέτιση της σταθεράς με τη θερμοκρασία.

Πίνακας IB.2.3. Η υπολογισμένη σταθερά σύμπλεξης της καρβεδιλόλης με την HP-β-CD σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

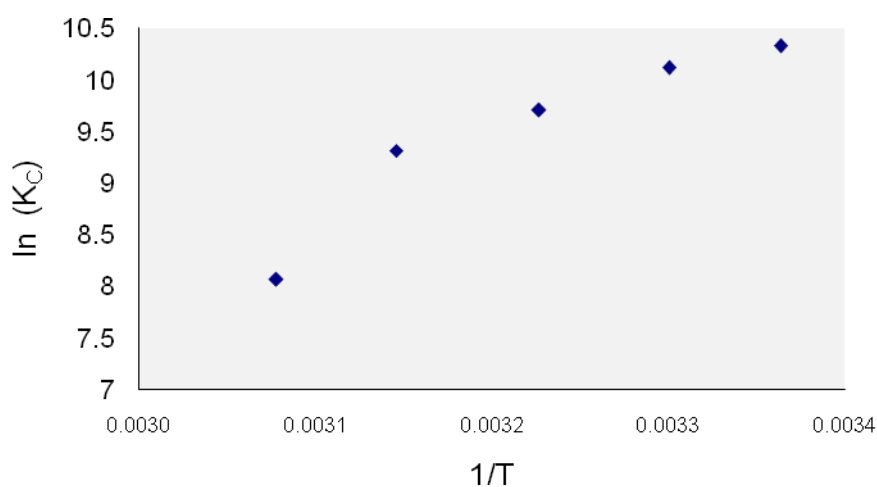
	24,3 °C	30,0 °C	36,9 °C	44,9 °C	51,9 °C
K_C	30514	24795	16426	11083	3187
1/T (K)	0,00336	0,00330	0,00323	0,00315	0,00308

Η σταθερά σχηματισμού συμπλόκου K (ως λογάριθμος) και η θερμοκρασία σχηματισμού του σχετίζονται μεταξύ τους σύμφωνα με την εξίσωση van't Hoff. Σταθεροί όροι της εξίσωσης είναι η μεταβολή της εντροπίας και η μεταβολή της ενθαλπίας σχηματισμού του συμπλόκου.

$$\ln K_c = -\frac{\Delta H^*}{RT} + \frac{\Delta S^*}{R} \quad \text{Εξίσωση van't Hoff – Εξίσωση IB.2}$$

όπου ΔH^* και ΔS^* είναι οι μεταβολές της ενθαλπίας και της εντροπίας, αντίστοιχα, του συστήματος.

Από τη γραμμική έκφραση του $\ln(K_c)$ σε συνάρτηση με το αντίστροφο της θερμοκρασίας, εκφρασμένη σε Kelvin ($1/T$), προκύπτει το διάγραμμα που ακολουθεί



Σχήμα IB.2.2. Γραφική απεικόνιση της λογαριθμικής έκφρασης της σταθεράς σχηματισμού του συμπλόκου καρβεδιλόλης-HP-β-CD ως προς το αντίστροφο της θερμοκρασίας.

Από την ευθεία που αποδίδεται στο σχήμα IB.2.2 μπορεί να υπολογιστούν οι σταθεροί όροι της εξίσωσης van't Hoff. Οι σταθεροί όροι περιέχουν την παγκόσμια σταθερά αερίων R η οποία μπορεί να απομακρυνθεί και να προκύψουν οι τιμές της μεταβολής της εντροπίας (ΔS) και της ενθαλπίας σχηματισμού του συμπλόκου (ΔH).

ΔH^*	-60,96	kJ/mol
ΔS^*	-117,41	J/K/mol

Από τις παραπάνω τιμές μπορεί να υπολογιστεί η ελεύθερη ενέργεια Gibbs της συμπλοκοποίησης σύμφωνα με τη σχέση:

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad \text{Εξίσωση IB.3}$$

Και για τους 25 βαθμούς η τιμή που προκύπτει είναι:

$$\Delta G^* = \mathbf{-25966,8} \quad \text{J/mol}$$

Η μεταβολή της ελεύθερης ενέργεια Gibbs παρέχει μια σημαντική πληροφορία για το εάν μια αντίδραση ευνοείται θερμοδυναμικά, οπότε χαρακτηρίζεται ως αυθόρμητη, ή όχι. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά, η συμπλοκοποίηση της καρβεδιλόλης και της HP- β -CD είναι αυθόρμητη.

IV.3. Παρακολούθηση της φωτοεπαγόμενης αποικοδόμησης υδατικού διαλύματος της καρβεδιλόλης παρουσία υποκατεστημένης β-Κυκλοδεξτρίνης

Η παρακολούθηση της φωτόλυσης της καρβεδιλόλης σε νερό δεν είναι δυνατή λόγω της χαμηλής διαλυτότητας των μορίων της στο νερό. Η διαλυτότητα του δραστικού μορίου αυξάνεται παρουσία της HP-β-CD, όπως έχει ήδη παρατηρηθεί, και αυτό είναι σημαντικό καθώς σκοπός τη συνολικής μελέτης είναι να εκτιμηθεί εάν η παρουσία της HP-β-CD σαν έκδοχο επηρεάζει τη φωτόλυση της καρβεδιλόλης.

Περιγραφή πειράματος

Η ανάδευση σε σταθερή θερμοκρασία, υδατικού διαλύματος HP-β-CD παρουσία περίσσειας καρβεδιλόλης για 5 μέρες είναι αρκετή για να αποκατασταθεί ισορροπία στη διαλυτοποίηση της τελευταίας. Από το διάλυμα απομακρύνεται η αδιάλυτη καρβεδιλόλη με διήθηση και το διήθημα αραιώνεται ώστε να αποφευχθεί η καθίζηση της διαλελυμένης ποσότητας του φαρμάκου από τις μεταβολές της θερμοκρασίας. Η αραιώση επαναλαμβάνεται δυο φορές. Προκύπτουν τελικά τρία διαλύματα, ίδιας συγκέντρωσης σε κυκλοδεξτρίνη και καρβεδιλόλη, και στα δυο από αυτά προστίθενται διαφορετικές ζυγίσεις της υποκατεστημένης κυκλοδεξτρίνης. Τα τρία τελικά υδατικά διαλύματα έχουν την ίδια συγκέντρωση σε καρβεδιλόλη (συμπλοκοποιημένη) και διαφορετικές συγκεντρώσεις HP-β-CD.

Τα τελικά διαλύματα αυτά υφίστανται φωτεινή ακτινοβολία λυχνίας τόξου αερίου Ξένου για 1,5 και 3 ώρες και αξιολογείται η επίδραση της HP-β-CD στην φωτόλυση της καρβεδιλόλης.

Εκτέλεση πειράματος

Σε ογκομετρική φιάλη των 100,0 mL ζυγίζονται 3,903 g HP-β-CD και αραιώνονται μέχρι χαραγής με νερό (διάλυμα Α). Το διάλυμα μεταφέρεται σε κωνική φιάλη με εσφυρισμένο πώμα και προστίθενται 146 mg καρβεδιλόλης, ποσότητα που δεν διαλύεται και παραμένει στην επιφάνεια του διαλύματος. Η φιάλη πωματίζεται ερμητικά και μεταφέρεται σε υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας, 35 °C, και ανακινείται με σταθερό ρυθμό 50 U/min για 5 μέρες.

Στο τέλος του χρονικού διαστήματος, το διάλυμα απομακρύνεται από το υδατόλουτρο και διηθείται από χάρτινο ηθμό ταχείας διήθησης δίχως τέφρα (χαρτί με συγκράτηση σωματιδίων διαμέτρου από 20–25 μm) και από το διήθημα του Α παρασκευάζονται τα διαλύματα του πίνακα IB.3.1.

Πίνακας IB.3.1. Παρασκευή διαλυμάτων με σταθερή συγκέντρωση καρβεδιλόλης, τελικού όγκου 20,0 mL και περίσσεια διαφορετικών συγκεντρώσεων HP- β -CD.

Διάλυμα	mL διηθήματος Α	mg HP- β -CD που προστίθενται στη φιάλη	τελική συγκέντρωση HP- β -CD ($\times 10^{-2}$ M)	Μοριακή Αναλογία Καρβεδιλόλης / HP- β -CD
I	15,0	0	1,49	1:90
II	15,0	298,5	2,25	1:137
III	15,0	516,4	2,80	1:170

4,0 mL από τα διαλύματα I, II και III μεταφέρονται στις κυψελίδες παρακολούθησης της φωτόλυσης και υφίστανται ακτινοβολία λυχνίας τόξου αερίου Ξένου, ενέργειας 750 W/m². Μετά από 1,5 ώρα το περιεχόμενο των κυψελίδων απομακρύνεται και προσδιορίζεται η συγκέντρωση της καρβεδιλόλης στο κάθε ένα. Στη συνέχεια, προστίθενται εκ νέου 4,0 mL από το ίδιο διάλυμα σε κάθε μια από τις κυψελίδες και επαναλαμβάνεται η διαδικασία της φωτόλυσης για 3 ώρες και προσδιορισμού της συγκέντρωσης της καρβεδιλόλης στο διάλυμα.

Όλα τα δείγματα υφίστανται αραιώση 300 μL με 900 μL κινητής φάσης και αναλύονται χρωματογραφικά .

Υπολογισμοί και Αποτελέσματα

Από τα εμβαδά των κορυφών της καρβεδιλόλης στα διαλύματα πριν και μετά τη φωτόλυση, υπολογίζεται η συγκέντρωσή της και τα αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα που ακολουθεί:

Πίνακας IB.3.2. Η συγκέντρωση της καρβεδιλόλης σε κάθε διάλυμα με HP-β-CD διαφορετικών συγκεντρώσεων ($\times 10^{-4}$ M) και η κλίση της ευθείας μεταβολής της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με τον χρόνο ως σταθερά ταχύτητας της φωτόλυσης. .

	0 h	1 ½ h	3h	Σταθερά ταχύτητας ($\times 10^{-5}$ M·h ⁻¹)
Διάλυμα I	1,64	1,50	0,73	3,04
Διάλυμα II	1,64	1,53	0,73	3,03
Διάλυμα III	1,64	1,53	0,72	3,09

Παρατηρήσεις

- Όλα τα διαλύματα που μελετήθηκαν δείχνουν την ίδια μεταβολή στη συγκέντρωση της καρβεδιλόλης ως αποτέλεσμα της έκθεσής τους στην ακτινοβολία του φωτός, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση της κυκλοδεξτρίνης.

- Προφανώς από την μικρότερη αναλογία, η καρβεδιλόλη είναι ήδη συμπλοκοποιημένη από την κυκλοδεξτρίνη και δεν παρουσιάζει διαφοροποίηση

ΙΓ. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΚΑΡΒΕΔΙΛΟΛΗΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ $^1\text{H-NMR}$

Εισαγωγή

Ο σχηματισμός διαμοριακών ή ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων και η έκταση των φαινομένων αυτών αποτελεί παράμετρο σημαντική σε ό,τι αφορά τα φωτοχημικά αποτελέσματα που παρατηρούνται όταν τα δραστικά μόρια υφίστανται ακτινοβολία. Τόσο η παρουσία διαμοριακών αλληλεπιδράσεων, που υφίστανται σαν διμερή ή πολλαπλά συσσωματώματα στα διαλύματα, όσο και οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις προκαλούν μεταβολές σε διάφορα φασματικά χαρακτηριστικά τους. Η φασματοσκοπία NMR είναι μια τεχνική που παρέχει πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις αυτές και που είναι καθοριστικές για τα συμπεράσματα που εξάγονται.

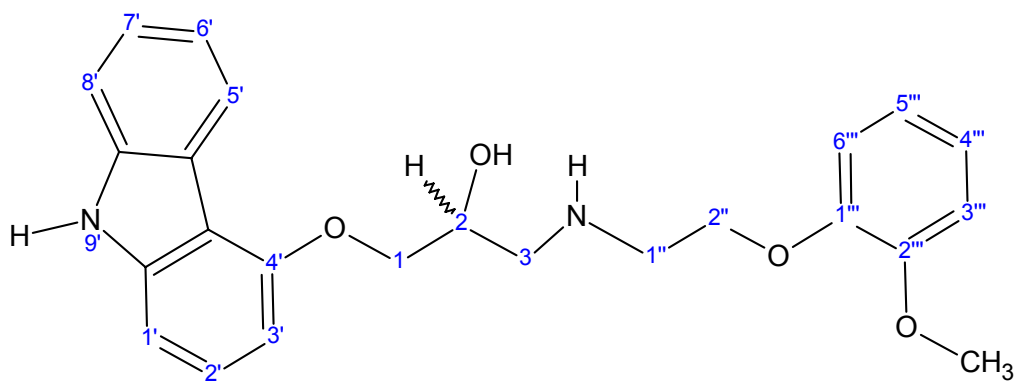
Η υπάρχουσα φασματοσκοπική μελέτη της καρβεδιλόλης εξελίσσεται με συγκεκριμένα βήματα. Αρχικά είναι απαραίτητη η απόδοση των κορυφών, η οποία μπορεί να αναβρεθεί και στη βιβλιογραφία αλλά όπως είναι γνωστό εξαρτάται από τον διαλύτη της κάθε μελέτης.

Ακολουθεί η μελέτη των φασματικών μεταβολών του δραστικού μορίου όταν αλλάζει η συγκέντρωσή του στο διάλυμα, σε συγκεκριμένο διαλύτη και οδηγεί στο συμπέρασμα φαινομένων αυτοοργάνωσης.

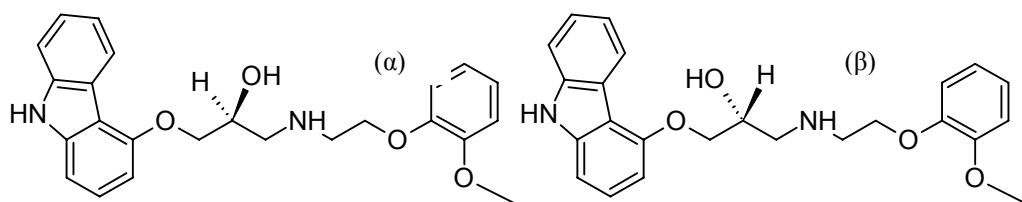
Τέλος, για να διερευνηθεί η φύση των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων σε μοριακά διμερή ή αυτοοργανώσεις, η επίδραση του διαλύτη στο φάσμα της φαρμακευτικής ουσίας μελετάται σε συγκεκριμένη συγκέντρωση, μεταβάλλοντας τη σύσταση του διαλύτη.

ΙΓ.1 Απόδοση κορυφών καρβεδιλόλης με $^1\text{H-NMR}$ σε μεθανόλη

Η απόδοση των κορυφών που εμφανίζονται στα φάσματα της καρβεδιλόλης (σχήμα ΙΓ.1) πραγματοποιείται με τη μελέτη και τον συνδυασμό 69των δεδομένων από $^1\text{H-NMR}$ και COSY. Ο διαλύτης και στις δυο περιπτώσεις είναι DMSO- d_6 . Τα αποτελέσματα δίνονται στην αντίστοιχη στήλη στον πίνακα ΙΓ.1.1.



Σχήμα ΙΓ.1.1. Χημική δομή και αρίθμηση της καρβεδιλόλης.



Σχήμα ΙΓ.1.2. Χημική δομή των εναντιομερών της καρβεδιλόλης (α) S-καρβεδιλόλη (β) R-καρβεδιλόλη.

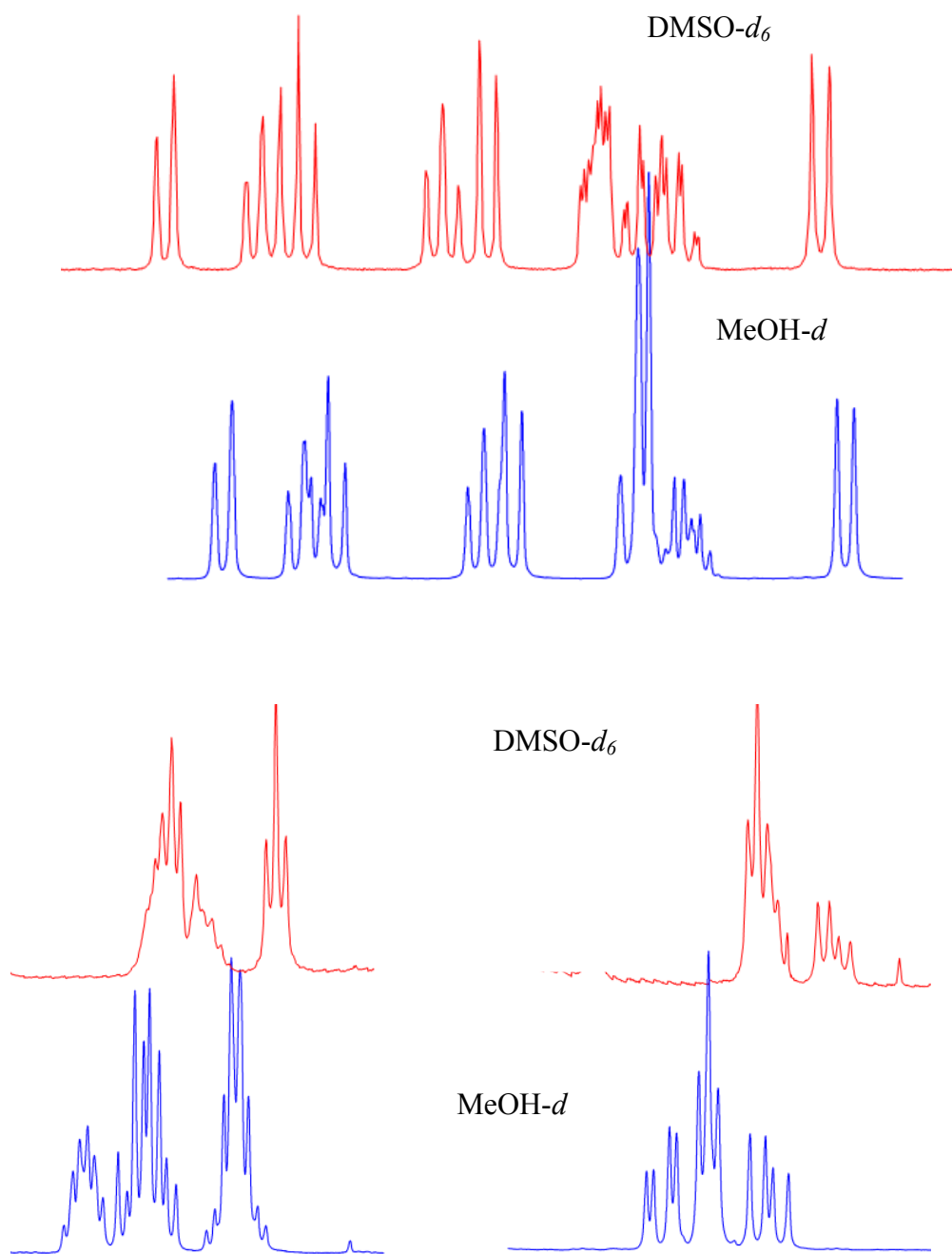
Η φαρμακευτική ουσία είναι ρακεμικό μίγμα των S και R δομών της καρβεδιλόλης (σχήμα ΙΓ.1.2) και αυτό δεν είναι διακριτό στο DMSO- d_6 , το οποίο είναι απρωτικός πολικός διαλύτης, διότι δεν έχουν διαφορές στην αποδιέγερση. Η φύση του ρακεμικού μίγματος αποκαλύπτεται στα φάσματα παρουσία μεθανόλης MeOD (διαλύτη που επιτρέπει την παρακολούθηση της φωτοχημικής αποικοδόμησης της ουσίας) από τις διπλές κορυφές κυρίως στα αλειφατικά πρωτόνια του φάσματος που πλαισιώνουν το ασύμμετρο κέντρο. Η μεθανόλη MeOD επιλέγεται ως διαλύτης ώστε τα όποια συμπεράσματα να μπορούν να συσχετισθούν με τις φωτολύσεις που θα πραγματοποιηθούν στον ίδιο διαλύτη. Στον πίνακα ΙΓ.1.1 συμπεριλαμβάνεται η απόδοση των κορυφών της καρβεδιλόλης και σε μεθανολικό περιβάλλον.

Πίνακας ΙΓ.1.1: Απόδοση κορυφών φασμάτων ¹H-NMR της καρβεδιλόλης σε διαφορετικούς δευτεριωμένους διαλύτες.

Πρωτόνιο	ppm σε DMSO- <i>d</i> ₆ (2,5 ppm)	ppm σε CH ₃ OD (3,31 ppm)
5'	8,21 (d)	8,24
8'	7,44 (d)	7,34
7'	7,33 (t)	7,26
2'	7,29 (t)	7,21
6'	7,12 (t)	7,03
1'	7,07 (d)	7,01
3''' & 6'''	6.92-6.96 (d)	6.84-6.97
4''' & 5'''	6.80-6.92 (t)	6.84-6.97
3'	6,70 (t)	6,61
1	4,17 (dd)	4.12-4.28ppm
2	4,10 (m)	
2''	4,03 (d)	4,04
CH ₃	3,80 (s)	3,76
3	2,96 (m)	2,87 3 _α 3,02 3 _β
1''	2,78 (m)	2,96 (m)
OH	5,25 (s)	
NH	Περιοχή 4.10-4.25	-

Σημειώνεται πως οι δείκτες “a” και “b” των πρωτονίων αφορούν στα πρωτόνια που ενώ βρίσκονται συνδεδεμένα με τον ίδιο άνθρακα, συντονίζονται σε διαφορετικές τιμές πεδίου λόγω της διαφορετικής απόστασης και γειτνιάσής τους με τους υποκαταστάτες του χειρόμορφου κέντρου του μορίου.

Τα συγκριτικά φάσματα της δραστικής ουσίας στους δυο διαλύτες δίνονται παρακάτω στο σχήμα ΙΓ.1.3.



Σχήμα Π.1.3. Συγκριτική απόδοση των χαρακτηριστικών περιοχών της καρβεδιλόλης με $^1\text{H-NMR}$ σε διαφορετικούς διαλύτες, $\text{DMSO-}d_6$ και CH_3OD (αρωματικά πρωτόνια πάνω, αλειφατικά κάτω).

Π.2. Μελέτη φασματικών μεταβολών της καρβεδιλόλης σε διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων

Τα πρώτα, διερευνητικά πειράματα NMR σε διαλύματα καρβεδιλόλης έγιναν στην προσπάθεια προσέγγισης ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων και του σχηματισμού διμερών. Σημαντική παρατήρηση υπήρξε η παράλληλη μετατόπιση των αλειφατικών πρωτονίων και η μικτή των αρωματικών, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου.

Κρίνεται, λοιπόν, ενδιαφέρουσα προς μελέτη η φασματική μελέτη των θωρακίσεων και αποθωρακίσεων των πρωτονίων της καρβεδιλόλης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του δείγματος με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$.

Π.2.1. Μελέτη φασματικών μεταβολών της καρβεδιλόλης σε μεθανολικά διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων

Παρασκευή διαλυμάτων

Ζυγίζονται 10,0 mg ($2,46 \times 10^{-5}$ mol) καρβεδιλόλης και αραιώνονται με 1000 μL δευτεριωμένης μεθανόλης. Από το διάλυμα αυτό ($2,46 \times 10^{-2}$ M) παρασκευάζονται και καταγράφονται τα φάσματα ως άθροισμα 64 σαρώσεων (BRUKER 400,13 MHz), για τα ακόλουθα διαλύματα καρβεδιλόλης:

2,08 1,80 1,59 $1,23 \times 10^{-2}$ M

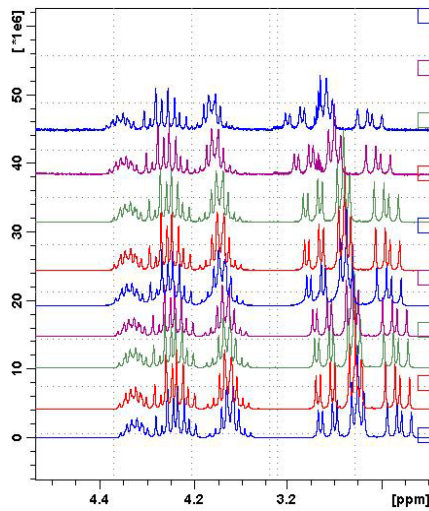
9,22 7,38 2,12 $1,23 \times 10^{-3}$ M

$1,12 \times 10^{-4}$ M και $1,71 \times 10^{-5}$ M

Αποτελέσματα

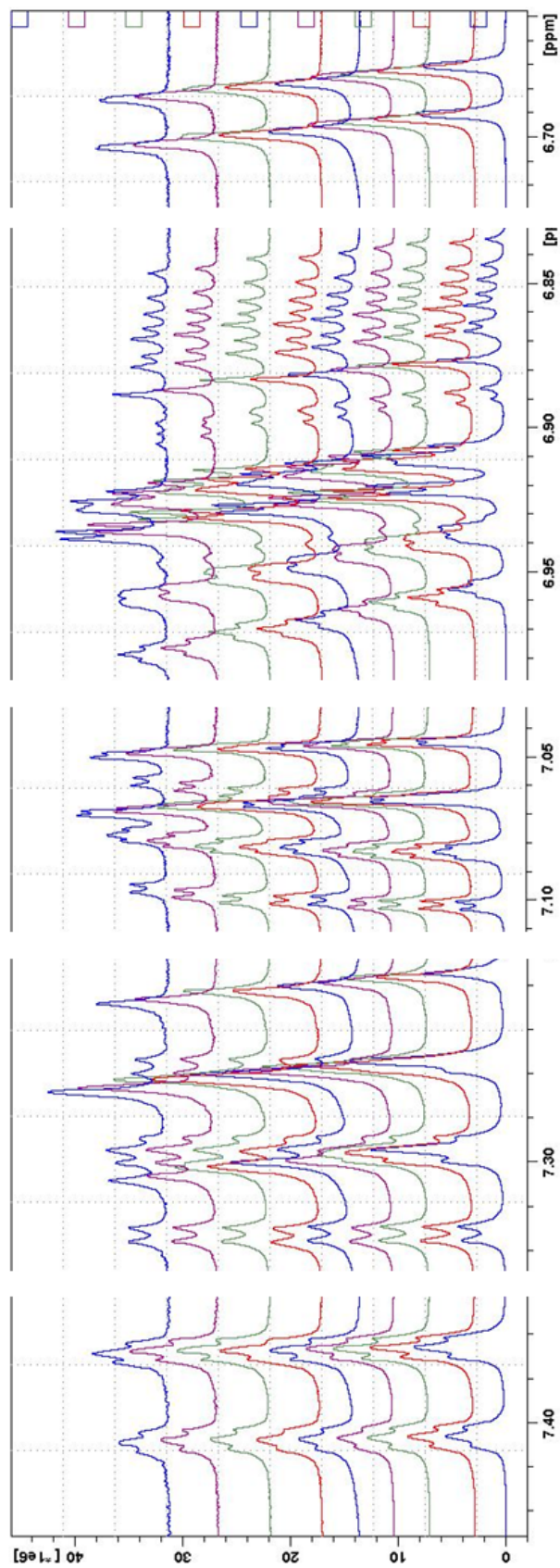
Τα φάσματα των δυο τελευταίων δειγμάτων δεν έχουν ισχυρό σήμα. Στα υπόλοιπα, πιο πυκνά διαλύματα, η ένταση του σήματος μας επιτρέπει να τα επεξεργαστούμε. Ακολουθούν συγκριτικά τα φάσματα των παραπάνω διαλυμάτων.

Στην περιοχή των αλειφατικών πρωτονίων, παρατηρείται αποθωράκιση όλων των πρωτονίων όσο μειώνεται η συγκέντρωση του δείγματος, άλλων περισσότερη και άλλων σε μικρότερη έκταση.



Σχήμα 1Γ.2.1. Συγκριτική απεικόνιση των τμημάτων των αλειφατικών πρωτονίων της καρβεδιλόλης, με διαλύτη CH₃OD, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Από κάτω προς τα πάνω: 2,46, 2,08, 1,80, 1,59, 1,23 ×10⁻² M, και 9,22, 7,38, 2,12, 1,23×10⁻³ M.

Για τα αλειφατικά πρωτόνια παρατηρείται άλλα να έχουν σημαντική μετατόπιση και άλλα όχι. Όπως φαίνεται τόσο στις μετρήσεις του πίνακα 1Γ.2.3 αλλά και στο σχήμα 1Γ.2.1, κάποια πρωτόνια θωρακίζονται και κάποια αποθωρακίζονται όσο μειώνεται η συγκέντρωση της καρβεδιλόλης του δείγματος..



Σχήμα Π.2.2. Συγκριτική αλεικόνιση των τμημάτων των αρωματικών πρωτονίων της καρβεδυλόλης, με διαλύτη CH₃OD, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Από κάτω προς τα πάνω: 2,46, 2,08, 1,80, 1,59, 1,23 × 10⁻² M και 9,22, 7,38, 2,12, 1,23 × 10⁻³ M

Οι μεταβολές της θωράκισης των πρωτονίων της καρβεδιλόλης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του διαλύματος, συγκεντρώνονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας ΠΓ.2.3. Μεταβολές στη θωράκιση των πρωτονίων της καρβεδιλόλης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της, με διαλύτη δευτεριωμένη μεθανόλη.

Συγκέντρωση (M)	Αρίθμηση πρωτονίου								
	3b	3b	1"	3a	3a	CH3	2"	1a	1b
$2,46 \times 10^{-2}$	2,947	2,978	3,050	3,098	3,129	3,760	4,124	4,232	4,246
$2,08 \times 10^{-2}$	2,951	2,981	3,055	3,103	3,134	3,762	4,128	4,235	4,248
$1,80 \times 10^{-2}$	2,954	2,984	3,057	3,106	3,137	3,763	4,131	4,237	4,251
$1,59 \times 10^{-2}$	2,956	2,987	3,061	3,110	3,141	3,764	4,134	4,238	4,252
$1,23 \times 10^{-2}$	2,968	2,999	3,074	3,123	3,153	3,766	4,141	4,243	4,257
$9,22 \times 10^{-3}$	2,971	3,002	3,078	3,127	3,158	3,767	4,145	4,245	4,258
$7,38 \times 10^{-3}$	2,974	3,005	3,080	3,130	3,160	3,768	4,146	4,246	4,260
$2,12 \times 10^{-3}$	2,991	3,022	3,099	3,149	3,179	3,771	4,156	4,251	4,265
$1,23 \times 10^{-3}$	3,009	3,040	3,116	3,167	3,198	3,771	4,162	4,255	4,268

Συγκέντρωση (M)	Αρίθμηση πρωτονίου									
	3'	3" & 6"	4" ή 5"	5" ή 4"	1'	6'	2'	7'	8'	5'
$2,46 \times 10^{-2}$	6,680	6,877	6,921	6,956	7,045	7,055	7,083	7,257	7,316	7,393
$2,08 \times 10^{-2}$	6,683	6,878	6,923	6,959	7,045	7,055	7,083	7,258	7,316	7,393
$1,80 \times 10^{-2}$	6,684	6,878	6,924	6,960	7,045	7,055	7,083	7,258	7,316	7,393
$1,59 \times 10^{-2}$	6,685	6,880	6,925	6,963	7,046	7,056	7,083	7,259	7,316	7,393
$1,23 \times 10^{-2}$	6,688	6,882	6,928	6,967	7,046	7,056	7,082	7,260	7,316	7,393
$9,22 \times 10^{-3}$	6,689	6,883	6,930	6,970	7,047	7,057	7,081	7,261	7,316	7,394
$7,38 \times 10^{-3}$	6,690	6,883	6,931	6,971	7,047	7,057	7,081	7,261	7,316	7,393
$2,12 \times 10^{-3}$	6,693	6,887	6,935	6,976	7,048	7,058	7,079	7,263	7,316	7,394
$1,23 \times 10^{-3}$	6,695	6,888	6,937	6,979	7,049	7,059	7,077	7,264	7,316	7,394

Οι παραπάνω μεταβολές κατά την αύξηση της συγκέντρωσης των δειγμάτων παρουσιάζονται για τα περισσότερα πρωτόνια στα διαγράμματα που ακολουθούν. Το H-8' δεν παρουσιάζεται διότι με μεταβολή του 4^{ου} δεκαδικού ψηφίου χαρακτηρίζεται ως σταθερό. Αξιοσημείωτη είναι η συμπεριφορά των 6' και 5' που κατά την αύξηση της συγκέντρωσης παρουσιάζουν αποθωράκιση, τη στιγμή που όλα τα υπόλοιπα πρωτόνια θωρακίζονται.

Σχολιασμός

Από όλα τα αποτελέσματα της φασματοσκοπικής μελέτης γίνεται φανερό ότι στα διαλύματα της καρβεδιλόλης και στις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν

συμβαίνουν φαινόμενα αυτοοργάνωσης των μορίων. Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι σχηματίζονται δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των χαρακτηριστικών ομάδων, με πυρήνα την αμινομάδα και οδηγούν σε μοριακά διμερή ή άλλου είδους συσσωματώματα.

Το είδος των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων θα μπορούσε να διερευνηθεί με μελέτη της επίδρασης των διαλυτών διαφορετικής πολικότητας στη φασματικές μεταβολές που έχουν ήδη διαπιστωθεί.

ΙΓ.2.2. Μελέτη φασματικών μεταβολών της καρβεδιλόλης σε διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων, με διαλύτη MeOD/D₂O 80/20 v/v.

Παρασκευάζονται διαλύματα καρβεδιλόλης με την αναλογία MeOD/D₂O να είναι 1/4. Στο σχεδιασμό της παρασκευής των διαλυμάτων λαμβάνεται υπόψη η δυσδιαλυτότητα της καρβεδιλόλης στο νερό και τα πρώτα στάδια των αραιώσεων πραγματοποιούνται σε μεθανόλη. Η απαραίτητη ποσότητα νερού βρίσκεται στο μίγμα του διαλύτη (διαλύτης K) και προστίθεται στο τελευταίο στάδιο, όπου η δραστική ουσία είναι ήδη αραιωμένη.

Διαλύτης K: 720 μL D₂O αναμιγνύονται με 1640 μL δευτεριωμένης μεθανόλης.

Παρασκευή διαλυμάτων

Διάλυμα A: Ζυγίζονται 19,6 mg ($4,82 \times 10^{-5}$ mol) καρβεδιλόλης και αραιώνονται με 1300 μL CH₃OD ($3,7 \times 10^{-2}$ M).

Ακολουθεί η παρασκευή των διαλυμάτων B, Γ, Δ και E:

- Διάλυμα B: 250 μL διαλύματος A και προστίθενται 50 μL CH₃OD
- Διάλυμα Γ: 300 μL διαλύματος A και προστίθενται 100 μL CH₃OD
- Διάλυμα Δ: 200 μL διαλύματος A και προστίθενται 200 μL CH₃OD
- Διάλυμα E: 100 μL διαλύματος Γ και προστίθενται 200 μL CH₃OD

Τα τελικά διαλύματα που μελετήθηκαν με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ προκύπτουν από τα παραπάνω διαλύματα ως εξής:

Διάλυμα ΑΚ, $1,24 \times 10^{-2}$ M: 200 μL διαλύματος Α + 400 μL διαλύτη Κ

Διάλυμα ΒΚ, $1,03 \times 10^{-2}$ M: 200 μL διαλύματος Β + 400 μL διαλύτη Κ

Διάλυμα ΓΚ, $9,27 \times 10^{-3}$ M: 200 μL διαλύματος Γ + 400 μL διαλύτη Κ

Διάλυμα ΔΚ, $6,18 \times 10^{-3}$ M: 200 μL διαλύματος Δ + 400 μL διαλύτη Κ

Διάλυμα ΕΚ, $3,09 \times 10^{-3}$ M: 200 μL διαλύματος Ε + 400 μL διαλύτη Κ

Τα φάσματα των διαλυμάτων λαμβάνονται μετά από 64 σαρώσεις και στην επεξεργασία η βαθμονόμηση των φασμάτων γίνεται με ρύθμιση του μεθυλίου της μεθανόλης στα 3,3100 ppm.

Από την επεξεργασία των φασμάτων, προκύπτουν οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των κορυφών συντονισμού των πρωτονίων σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση. Αυτές καταγράφονται στον πίνακα ΙΓ.2.4 που ακολουθεί:

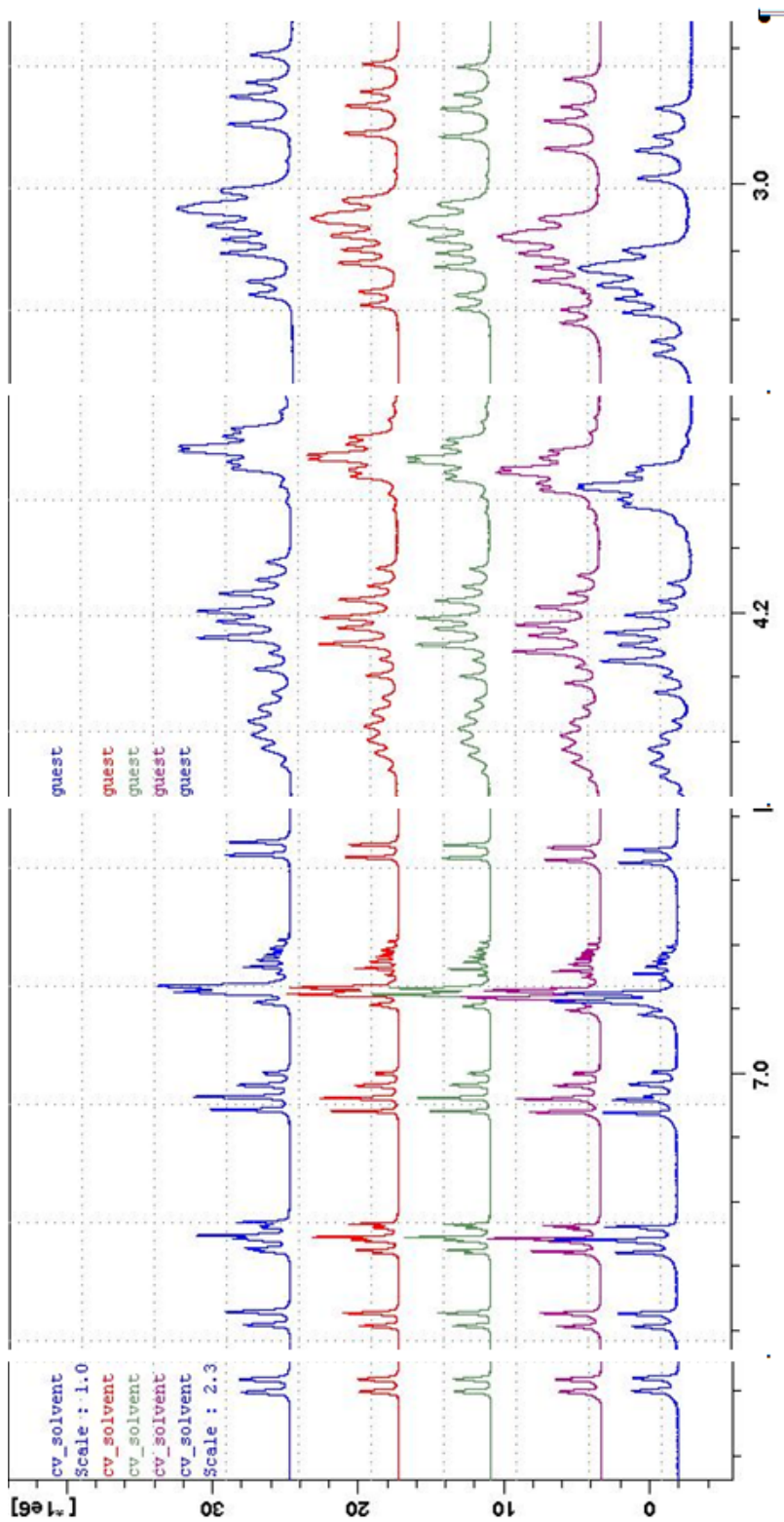
Πίνακας ΙΓ.2.4. Μεταβολές στη χημική μετατόπιση των πρωτονίων της καρβεδιλόλης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση, σε μίγμα διαλυτών MeOD/D₂O 4/1.

Συγκέντρωση (M)	Αρίθμηση πρωτονίου								
	3b	3b	1''	3a	3a	CH3	2''	1a	1b
$1,24 \times 10^{-2}$	2,967	2,998	3,070	3,098	3,129	3,740	4,125	4,249	4,262
$1,03 \times 10^{-2}$	2,974	2,990	3,077	3,105	3,136	3,741	4,131	4,253	4,266
$9,27 \times 10^{-3}$	2,976	3,007	3,081	3,108	3,139	3,742	4,133	4,254	4,267
$6,18 \times 10^{-3}$	2,985	3,016	3,091	3,119	3,150	3,745	4,142	4,259	4,272
$3,09 \times 10^{-3}$	3,007	3,038	3,114	3,142	3,173	3,747	4,155	4,266	4,279

Συγκέντρωση (M)	Αρίθμηση πρωτονίου								
	3'	3''' & 6'''	5''' & 4'''	1'	6'	2'	7'	8'	5'
$1,24 \times 10^{-2}$	6,702	6,872	6,942	7,099	7,071	7,305	7,310	7,434	8,244
$1,03 \times 10^{-2}$	6,706	6,874	6,946	7,101	7,071	7,307	7,313	7,436	8,243
$9,27 \times 10^{-3}$	6,707	6,875	6,948	7,101	7,071	7,308	7,313	7,436	8,243
$6,18 \times 10^{-3}$	6,711	6,879	6,954	7,102	7,071	7,310	7,313	7,436	8,243
$3,09 \times 10^{-3}$	6,714	6,882	6,961	7,104	7,069	7,312	7,313	7,437	8,242

Ακολουθεί η γραφική απόδοση της μετατόπισης κάποιων από τα πρωτόνια της καρβεδιλόλης κατά την αύξηση της συγκέντρωσής της σε διάλυμα MeOD/D₂O 4/1. Σημειώνεται πως ενώ όλα τα πρωτόνια κατά την αύξηση της συγκέντρωσης θωρακίζονται, άλλα λιγότερο και άλλα περισσότερο, το 5'

παρουσιάζει μια μικρή αποθωράκιση και το 6' έχει μια τάση σταθεροποίησης. Το 8' και στην περίπτωση αυτή χαρακτηρίζεται ως σταθερό.



Σχήμα Π. 2.3. Συγκριτική αλεκρόνιση των αρωματικών πρωτονίων της καρβεδιόλης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, με διάλυτη $\text{CH}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ 4/1. Από κάτω προς τα πάνω: 3,09, 6,18, 9,27 $\times 10^{-3}$ M, 1,03, 1,24 $\times 10^{-2}$ M

Συνολικής σχολιασμός αποτελεσμάτων

Η μελέτη των φασματικών μεταβολών της καρβεδιλόλης από την αλλαγή της συγκέντρωσής της στο διάλυμα πραγματοποιήθηκε σε δυο διαλύτες: σε σκέτη δευτεριωμένη μεθανόλη και σε μίγμα MeOD / D₂O 4/1. Το εύρος συγκεντρώσεων που μελετήθηκε δεν είναι το ίδιο. Προκειμένου να αξιολογηθεί η συμπεριφορά της καρβεδιλόλης στους δυο διαλύτες, συγκρίνονται οι μεταβολές που παρατηρούνται κατά τη μείωση της συγκέντρωσης από τα $1,23 \times 10^{-2}$ M στα $9,27 \times 10^{-3}$ M.

Πίνακας ΙΓ.2.5. Αποθωρακίσεις των κορυφών συντονισμού των αντίστοιχων πρωτονίων στο φάσμα της καρβεδιλόλης όταν η συγκέντρωσή της μεταβάλλεται από $1,23 \times 10^{-2}$ M στα $9,27 \times 10^{-3}$ M σε διαφορετικούς διαλύτες

Πρωτόνιο καρβεδιλόλης	$\Delta\delta\text{ppm} = \delta_{\text{αραιού}} - \delta_{\text{πυκνού}}$	
	σε 100% MeOD	σε MeOD / D ₂ O 4/1
3b	0,003	0,009
3b	0,003	0,009
1"	0,004	0,010
3a	0,004	0,010
3a	0,004	0,010
CH ₃	0,002	0,002
2"	0,004	0,008
1a	0,002	0,006
1b	0,002	0,005
3'	0,004	0,005
3''' & 6'''	0,002	0,003
4''' ή 5'''	0,002	0,006
5''' ή 4'''	0,003	
1'	0,001	0,002
6'	-0,000	-0,000
2'	0,001	0,003
7'	0,000	0,003
8'	0,000	0,002
5'	-0,000	-0,001

Οι μετατοπίσεις των κορυφών συντονισμού που παρατηρούνται είναι πολύ μεγαλύτερες όταν η μεθανόλη δεν είναι ο μοναδικός διαλύτης και προστίθεται D₂O. Εξαιρέση αποτελούν τα πρωτόνια της μεθοξομάδας όπου η μεταβολή της τιμής ($\Delta\delta\text{ppm}$) είναι ίδια ανεξαρτήτως του διαλύτη, και στις δυο

σειρές πειραμάτων. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην υπόθεση ότι το μεθοξύλιο παραμένει σταθερό ανεξάρτητα του είδους των αλληλεπιδράσεων στις οποίες συμμετέχουν τα μόρια, μη μετέχοντας σε διαμοριακές ή ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις.

Τα 5' και 6' παραμένουν σταθερά και στις 2 περιπτώσεις ενώ τα 4''' και 5''' δεν διαχωρίζονται αποτελεσματικά όταν στον διαλύτη υπάρχει και υδατική φάση.

Συμπεράσματα

Αύξηση της πολικότητας του διαλυτικού μέσου οδηγεί σε διαμοριακές αλληλεπιδράσεις λιγότερο ισχυρές από αυτές που παρατηρούνται στην καθαρή μεθανόλη.

Το συμπέρασμα στο οποίο θα μπορούσαμε να καταλήξουμε είναι προφανώς ότι οι αλληλεπιδράσεις των μορίων καρβεδιλόλης είναι περισσότερο πολικής φύσεως. Για τον λόγο αυτό ελαττώνεται η ισχύς τους όταν αυξάνεται η πολικότητα του μέσου στο οποίο βρίσκονται.

Π.3. Επίδραση σύστασης του διαλύτη στην έκταση των φαινομένων

Παρασκευή διαλυμάτων

Παρασκευάζονται μίγματα δευτεριωμένου νερού και δευτεριωμένης μεθανόλης (S1-S5 πίνακας 5) τα οποία θα χρησιμοποιηθούν ως διαλύτες σε συγκεκριμένη συγκέντρωση καρβεδιλόλης ώστε να είναι δυνατή η εκτίμηση της επίδρασης του διαλύτη σε διαφορετικές ομάδες των μορίων της καρβεδιλόλης.

Πίνακας Π.3.1. Παρασκευή μιγμάτων δευτεριωμένων διαλυτών.

Μίγμα	S1	S2	S3	S4	S5
μL MeOD	<i>500</i>	<i>440</i>	<i>375</i>	<i>315</i>	<i>250</i>
μL D₂O	<i>125</i>	<i>185</i>	<i>250</i>	<i>310</i>	<i>375</i>

Ζυγίζονται 6,2 mg ($1,52 \times 10^{-5}$ mol) καρβεδιλόλης και αραιώνονται με 1000 μL δευτεριωμένης μεθανόλης. Από το διάλυμα αυτό ($1,52 \times 10^{-2}$ M), 400 μL αραιώνονται με 600 μL δευτεριωμένης μεθανόλης (διάλυμα Α). Από το τελευταίο διάλυμα και μετά από προσθήκη 500 μL από διαφορετικά μίγματα διαλυτών, παρασκευάζονται τα διαλύματα καρβεδιλόλης του πίνακα 6.

Πίνακας ΙΓ.3.2. Παρασκευή διαλυμάτων καρβεδιλόλης συγκέντρωσης $1,02 \times 10^{-3}$ M με διαφορετική σύσταση διαλύτη σε MeOD/D₂O

Διάλυμα	M-100	M-80	M-70	M-60	M-50	M-40
μL διάλυμα Α	100	100	100	100	100	100
μL S1	-	500	-	-	-	-
μL S2	-	-	500	-	-	-
μL S3	-	-	-	500	-	-
μL S4	-	-	-	-	500	-
μL S5	-	-	-	-	-	500
MeOD	500	-	-	-	-	-

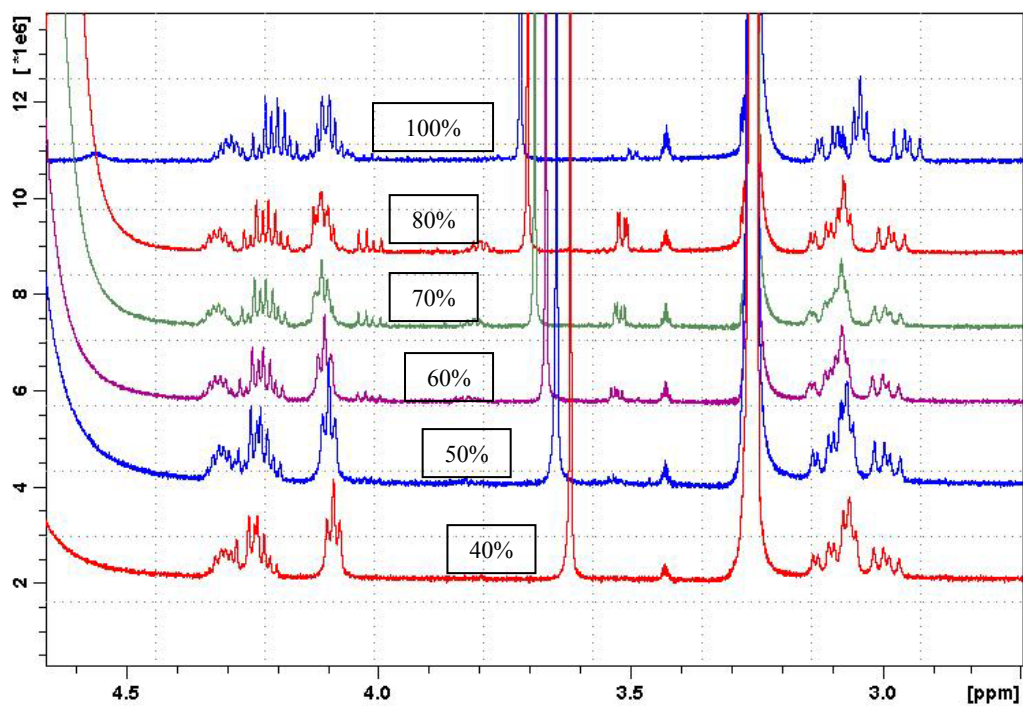
Τα φάσματα των διαλυμάτων του πίνακα ΙΓ.3.2 λαμβάνονται με 64 σαρώσεις και όλες οι παράμετροι του φασματογράφου διατηρούνται σταθερές. Στην επεξεργασία των φασμάτων η βαθμονόμηση γίνεται με την κορυφή της μεθανόλης (στα 3,3100 ppm).

Πίνακας Γ.3.3. Μεταβολές στη χημική μετατόπιση των πρωτονίων της καρβεδιλόλης σε συγκέντρωση $1,02 \times 10^{-3}$ M, όταν μειώνεται η περιεκτικότητα του διαλύτη σε μεθανόλη.

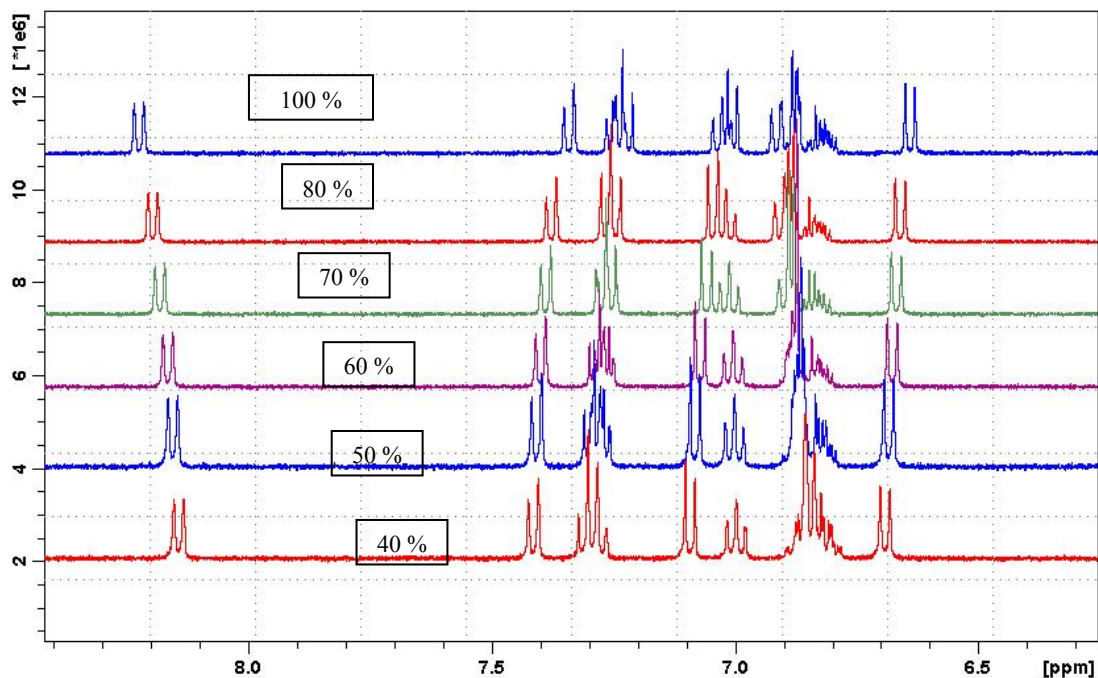
Διάλυμα	Αρίθμηση πρωτονίου								
	3b	3b	1''	3a	3a	CH3	2''	1a	1b
M-100	2.990	3.021	3.098	3.148	3.178	3.771	4.157	4.251	4.265
M-80	3.021	3.052	3.130	3.161	3.191	3.747	4.165	4.269	4.282
M-70	3.029	3.060	3.134	3.162	3.195	3.743	4.165	4.273	4.287
M-60	3.032	3.063	3.134	3.163	3.194	3.720	4.159	4.278	4.291
M-50	3.029	3.060	3.125	3.156	3.188	3.699	4.151	4.283	4.295
M-40	3.031	3.062	3.120	3.156	3.186	3.672	4.142	4.288	4.300

Διάλυμα	Αρίθμηση πρωτονίου									
	3'	3''' & 6'''	4''' or 5'''	1'	1'	6'	2'	7'	8'	5'
M-100	6.693	6.887	6.977	7.048	7.058	7.079	7.283	7.302	7.394	8.277
M-80	6.713	6.900	6.971	7.088	7.097	7.071	7.307	7.310	7.430	8.248
M-70	6.721	6.900	6.962	7.101	7.111	7.064	7.318	7.313	7.441	8.234
M-60	6.729	6.895	6.946	7.114	7.124	7.057	7.331	7.322	7.452	8.218
M-50	6.737	6.887	6.933	7.125	7.135	7.054	7.342	7.329	7.460	8.207
M-40	6.745	6.891	6.926	7.135	7.145	7.049	7.354	7.337	7.467	8.196

Στα επόμενα δυο σχήματα παρατηρούνται οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων όσο μεταβάλλεται η σύσταση του διαλύτη. Τα αρωματικά πρωτόνια εμφανίζονται να υφίστανται περισσότερο τη μεταβολή του άμεσου περιβάλλοντός τους, ως αποτέλεσμα της μεταβολής της σύστασης του διαλύτη.



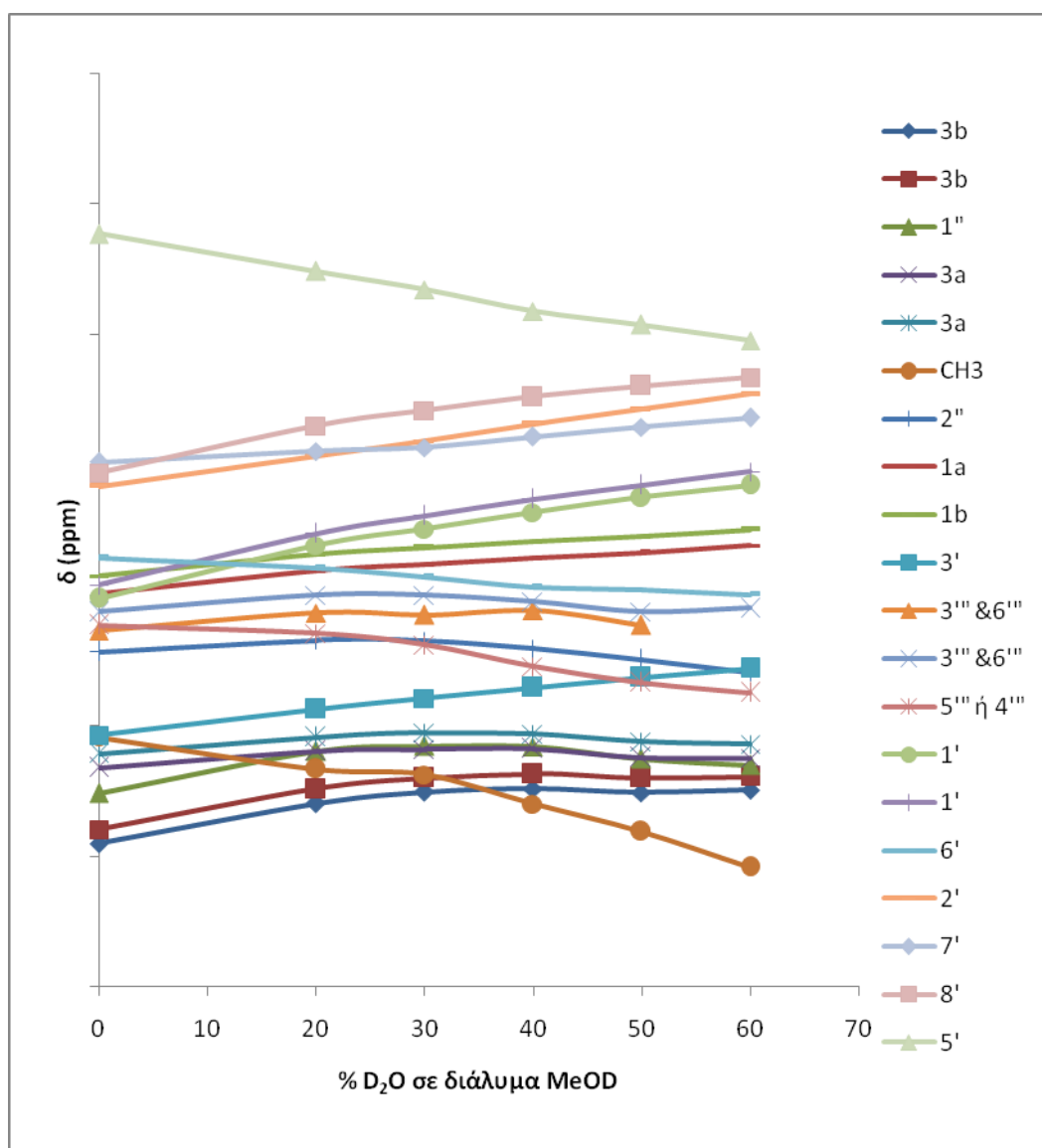
Σχήμα Π.3.1. Συγκριτική απεικόνιση των αλειφατικών πρωτονίων της καρβεδιλόλης σε συγκέντρωση $1,02 \times 10^{-3}$ M, όταν μειώνεται η περιεκτικότητα του διαλύτη σε μεθανόλη. Από πάνω προς τα κάτω μεθανόλη στον διαλύτη: 100, 80, 70, 60, 50 και 40 %.



Σχήμα Π.3.2. Συγκριτική απεικόνιση των αρωματικών πρωτονίων της καρβεδιλόλης σε συγκέντρωση $1,02 \times 10^{-3}$ M, όταν μειώνεται η περιεκτικότητα του διαλύτη σε μεθανόλη. Από πάνω προς τα κάτω μεθανόλη στον διαλύτη: 100, 80, 70, 60, 50 και 40 %.

Τα σχήματα ΙΓ.3.1 και ΙΓ.3.2 παρέχουν μια πολύ καλή εικόνα για τις μετατοπίσεις των πρωτονίων κατά την αλλαγή της σύστασης του διαλύτη και την αύξηση της περιεκτικότητάς του σε νερό (μείωση της μεθανόλης). Η μεμονωμένη παρουσίαση της μεταβολής του κάθε πρωτονίου διευκολύνει τη διάκριση στη συμπεριφορά όλων των πρωτονίων.

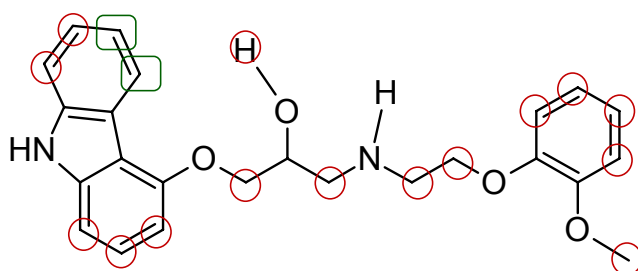
Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παραβολική μορφή που έχουν οι μεταβολές θωρακίσεων ορισμένων πρωτονίων, άλλα θωρακίζονται και άλλα αποθωρακίζονται με τη σύσταση του διαλύτη.



Σχήμα ΙΓ.3.3. Γραφική απεικόνιση της θωράκισης και αποθωράκισης που εμφανίζουν τα πρωτόνια της καρβενδιλόλης (συγκέντρωση $1,2 \times 10^{-3} M$), καθώς μειώνεται η συγκέντρωσή της μεθανόλης στον διαλύτη

Π.4. Παρατηρήσεις - Σγόλια

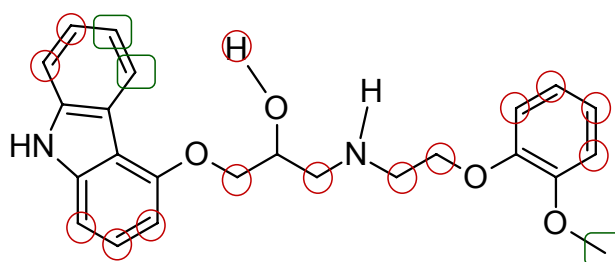
Από τις δυο σειρές πειραμάτων μείωσης της συγκέντρωσης της καρβεδιλόλης σε συγκεκριμένο, κάθε φορά, διαλύτη (MeOD ή MeOD /D₂O 80/20 v/v), παρατηρούνται οι αποθωρακίσεις των πρωτονίων που συμβολίζονται με κόκκινους κύκλους και οι θωρακίσεις των πρωτονίων που συμβολίζονται με τα πράσινα παραλληλόγραμμα.



Σχήμα Π.4.1. Σχηματική παρακολούθηση της μεταβολής των κορυφών συντονισμού των πρωτονίων της καρβεδιλόλης όσο αλλάζει προς μικρότερες τιμές η συγκέντρωσή της, τόσο σε 100 % MeOD όσο και σε μίγμα MeOD /D₂O 80/20. Κόκκινοι κύκλοι: αποθωράκιση. Πράσινα τετράγωνα: θωράκιση.

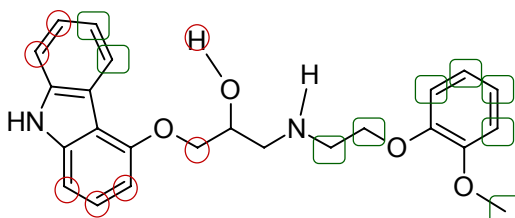
Στο τρίτο πείραμα, με σταθερή τη συγκέντρωση της καρβεδιλόλης και μεταβλητή την αναλογία μεθανόλη/νερό του διαλύτη, οι μεταβολές στις θωρακίσεις των πρωτονίων παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Όσο μεταβάλλεται η περιεκτικότητα του διαλύτη από την απόλυτη μεθανόλη μέχρι το ποσοστό 70% αυτής, παρατηρούνται οι ίδιες τάσεις μεταβολών των κορυφών συντονισμού με αυτές που παρατηρούνται κατά τη μείωση της συγκέντρωσης, την αραίωση του διαλείμματος.



Σχήμα Π.4.2. Σχηματική παρακολούθηση της μεταβολής των κορυφών συντονισμού των πρωτονίων της καρβεδιόλης συγκέντρωσης $1,02 \times 10^{-3}$ M, όσο μειώνεται η περιεκτικότητα του διαλύτη σε μεθανόλη από 100 σε 70 %. Κόκκινοι κύκλοι: αποθωράκιση. Πράσινα τετράγωνα: θωράκιση.

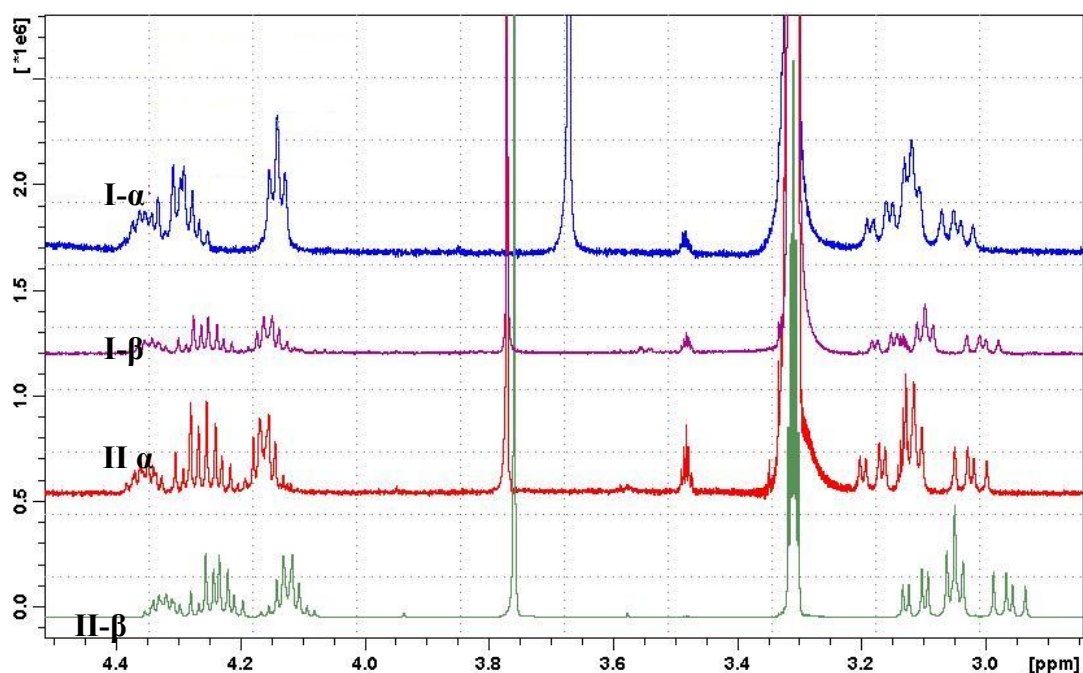
Όταν η περιεκτικότητα του διαλύτη σε μεθανόλη έχει μειωθεί στο 60 % και συνεχίζει μέχρι το 40 % τότε παρατηρούνται διαφορετικές μετατοπίσεις των κορυφών συντονισμού σε κάποια από τα πρωτόνια όπως φαίνεται από το σχήμα Π.20.



Σχήμα Π.4.3. Σχηματική παρακολούθηση της μεταβολής των κορυφών συντονισμού των πρωτονίων της καρβεδιόλης συγκέντρωσης $1,02 \times 10^{-3}$ M, όσο μειώνεται η περιεκτικότητα του διαλύτη σε μεθανόλη από 60 σε 40 %. Κόκκινοι κύκλοι: αποθωράκιση. Πράσινα τετράγωνα: θωράκιση.

Ενδιαφέρουσα είναι η συμπεριφορά των πρωτονίων του άνθρακα 3, που βρίσκεται μεταξύ υδροξυλομάδας και αμινομάδας. Τα δυο πρωτόνια του άνθρακα ακολουθούν διαφορετική συμπεριφορά όταν το νερό υπερβεί το 40 % του διαλύτη. Το ένα συνεχίζει να αποθωρακίζεται (όπως στις μικρότερες συγκεντρώσεις) ενώ το άλλο αρχίζει να θωρακίζεται.

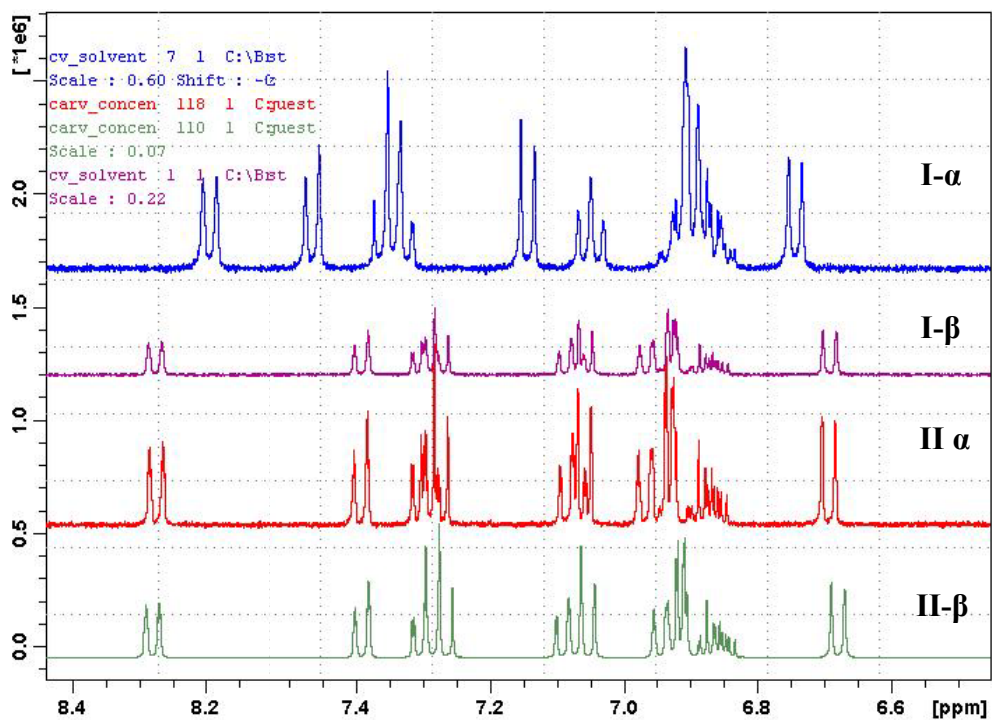
Εξάιρεση αποτελούν τα πρωτόνια της μεθοξυλομάδας των οποίων η θωράκιση είναι συνεχής όσο αυξάνεται το ποσοστό του νερού στον διαλύτη. Η συμπεριφορά αυτή είναι αντίθετη από την αποθωράκιση που παρουσιάζουν όσο μειώνεται η συγκέντρωση της καρβεδιλόλης με σταθερή τη σύσταση του διαλύτη.



Σχήμα Π.4.4. Συγκριτική απεικόνιση των αλειφατικών πρωτονίων καρβεδιλόλης.

Σειρά I (1^η μέρα): συγκέντρωση $1,02 \times 10^{-3}$ M σε 40 % (I-α), σε 100 % (I-β) μεθανόλη.

Σειρά II (2^η μέρα): συγκέντρωση $1,02 \times 10^{-3}$ M (II-α), $2,46 \times 10^{-2}$ M (II-β).σε 100 % μεθανόλη



Σχήμα Π.4.5. Συγκριτική απεικόνιση των αρωματικών πρωτονίων καρβεδιλόλης.
 Σειρά I (1^η μέρα): συγκέντρωση $1,02 \times 10^{-3}$ M σε 40 % (I-α), σε 100 % (I-β) μεθανόλη.
 Σειρά II (2^η μέρα): συγκέντρωση $1,02 \times 10^{-3}$ M (II-α), $2,46 \times 10^{-2}$ M (II-β).σε 100 % μεθανόλη

Οι θωρακίσεις των πρωτονίων που αντιπροσωπευτικά παρουσιάζονται στα 2 προηγούμενα σχήματα, δίνονται και στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας Π.4.1.: Μεταβολές στις θωρακίσεις των πρωτονίων όταν αλλάζει η σύσταση του διαλύτη σε σύγκριση με τις μεταβολές όταν αλλάζει η συγκέντρωση της καρβεδιλόλης

H	% μεθανόλης				$\delta_{\text{αραιού}}$ - $\delta_{\text{πυκνού}}$	$\delta_{100\%}$ - $\delta_{80\%}$	$\delta_{100\%}$ - $\delta_{40\%}$
	a/a	100 %	80 %	40 %			
	$2,46 \times 10^{-2} \text{ M}$	$1,02 \times 10^{-3} \text{ M}$					
3b	2,9470	2,9898	3,0206	3,0308	0,0427	-0,0309	-0,0411
3b	2,9776	3,0206	3,0516	3,0612	0,0431	-0,0310	-0,0406
1"	3,0501	3,0982	3,1304	3,1198	0,0481	-0,0322	-0,0216
3a	3,0984	3,1477	3,1608	3,1554	0,0493	-0,0131	-0,0077
3a	3,1290	3,1785	3,1945	3,1860	0,0495	-0,0130	-0,0075
CH3	3,7601	3,7711	3,7470	3,6717	0,0110	0,0241	0,0994
2"	4,1245	4,1567	4,1655	4,1411	0,0322	-0,0088	0,0156
1a	4,2325	4,2512	4,2686	4,2882	0,0187	-0,0174	-0,0370
1b	4,2458	4,2646	4,2815	4,3004	0,0187	-0,0169	-0,0358
3'	6,6800	6,6930	6,7128	6,7442	0,0130	-0,0198	-0,0512
1'	7,0548	7,0579	7,0975	7,1446	0,0031	-0,0396	-0,0867
6'	7,0830	7,0789	7,0708	7,0504	-0,0041	0,0081	0,0285
2'	7,2570	7,2834	7,3068	7,3540	0,0264	-0,0234	-0,0706
7'	7,3159	7,3019	7,3102	7,3362	-0,0141	-0,0083	-0,0343
8'	7,3927	7,3936	7,4298	7,4668	0,0009	-0,0362	-0,0732
5'	8,2810	8,2769	8,24825	8,1952	-0,0041	0,0287	0,0817

Στα πρωτόνια του μεθυλίου η επίδραση του διαλύτη είναι πολύ πιο έντονα εμφανής απο την επίδραση της αυξημένης συγκέντρωσης.

Η μεταβολή της σύστασης του διαλύτη (μείωση MeOD και αύξηση D₂O) προκαλεί αντιστροφή της επίδρασης της συγκέντρωσης.

Η μείωση της συγκέντρωσης της καρβεδιλόλης προκαλεί τη μείωση ή την εξασθένηση του σχηματισμού διμερών στα οποία μπορεί να αποδοθεί και η αύξηση της ταχύτητας της φωτοχημικής διάσπασης, όπως αυτή παρατηρήθηκε σε προηγούμενες ενότητες. Γνωρίζοντας πως το μόριο της καρβεδιλόλης μπορεί να σχηματίζει ενδομοριακούς δακτυλίους, διαμορφώσεις που σαν κέντρο τους έχουν τις αλειφατικές αμινομάδα και υδροξυλομάδα, είναι πιθανό οι διαμοριακοί δεσμοί να σχηματίζονται από τις ίδιες ομάδες.

Ο σχηματισμός των παραπάνω δομών, στην περίπτωση αυτή, παρεμποδίζει τον σχηματισμό των διαμορφώσεων με κυκλικές δομές. Το μόριο και μπορεί να το καθιστά πολύ πιο ευαίσθητο στην προσφερόμενη ακτινοβολία, αλλάζοντας την ενεργειακή του κατάσταση.

ΙΑ. ΜΕΛΕΤΗ ΦΩΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕΤΡΟΝΙΔΑΖΟΛΗΣ

Για τη συνέχεια της μελέτης της εξάρτησης της φωτοχημικής αποικοδόμησης από τη συγκέντρωση του διαλύματος, αναζητείται δραστική ουσία που:

A. Να είναι ευδιάλυτη στο νερό. Η παράμετρος της μεθανόλης ως διαλύτης επιλέγεται να μην ξαναμελετηθεί.

B. Να μην παρουσιάζει φαινόμενα αυτοοργάνωσης. Η απόδοση των μεταβολών του ρυθμού της φωτοχημικής αποικοδόμησης και σε διαμοριακές αλληλεπιδράσεις που οφείλονται στη συγκέντρωση, περιπλέκει το παρατηρούμενο φαινόμενο.

Γ. Να έχει σχετικά γρήγορη φωτοχημική αποικοδόμηση. Η ολοκλήρωση της κάθε μελέτης, του κάθε πρωτοκόλλου εντός μιας εργαστηριακής ημέρας, δύναται να βελτιώσει τις διακυμάνσεις και αποκλίσεις των δειγμάτων.

Διερευνάται η συμπεριφορά δεκαπέντε διαφορετικών φαρμακευτικών μοριών και από αυτά επιλέγεται να χρησιμοποιηθεί η μετρονιδαζόλη.

*Φαρμακολογική δράση μετρονιδαζόλης*¹⁰⁸

Η μετρονιδαζόλη κυκλοφορεί ως ενέσιμο διάλυμα

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, υφίσταται φωτοχημική αλλοίωση και για το λόγο αυτό τα ενέσιμα σκευάσματά της προστατεύονται από το φως.^{145 146} Η μετρονιδαζόλη υφίσταται ισομερισμό με την φωτεινή και ηλιακή ενέργεια και ο μηχανισμός της διαδικασίας αυτής είναι γνωστός από τη βιβλιογραφία.

Σκοπός της φωτοχημικής μελέτης της αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης είναι να μπορεί να προβλεφθεί η σταθερότητα του ενέσιμου σκευάσματος κατά την αποθήκευσή του αλλά κυρίως κατά τη χρήση του. Το πρωτόκολλο που ακολουθείται αφορά στην έκθεση των διαλυμάτων της μετρονιδαζόλης σε ακτινοβολία λυχνίας αερίου Ξένου που το φασματικό της αποτύπωμα είναι πολύ κοντά σε αυτό του ηλιακού φωτός. Η ενέργεια της λυχνίας ρυθμίζεται σε σταθερή τιμή ενώ η θερμοκρασία των δειγμάτων κατά τη διάρκεια της αποικοδόμησης παραμένει σταθερή. Οι κυψελίδες που

χρησιμοποιούνται είναι ποιότητας Q1, χαλαζία, που απορροφά πολύ λιγότερη φωτεινή ακτινοβολία από ότι οι υάλινες κυψελίδες.

Η σταθερότητα των συνθηκών είναι σημαντική προκειμένου τα πειράματα να μπορούν να επαναληφθούν με επιτυχία σε κάποιο άλλο εργαστήριο. Ακόμα και στο υπάρχον εργαστήριο, η επαναληψιμότητα του πρωτοκόλλου που ακολουθείται επιτρέπει την καλύτερη συσχέτιση των πειραμάτων μεταξύ τους και την εξαγωγή μιας γενικότερης παρατήρησης που να αφορά το μηχανισμό της φωτοχημικής αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης.

Η χρωματογραφική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της αέρας μετρονιδαζόλης στα δείγματα, είναι αυτή που περιγράφεται στην μονογραφία της ευρωπαϊκής φαρμακοποιίας για τον έλεγχο της πρώτης ύλης, της καθαρής δραστικής ουσίας. Η μέθοδος ελέγχεται για την καταλληλότητά της στην συγκεκριμένη εφαρμογή, όπως παρουσιάζεται στο αντίστοιχο κεφάλαιο.

Τα πειράματα σχεδιάζονται ώστε να οι αρχικές συγκεντρώσεις να διαφέρουν λιγότερο από μια τάξη μεγέθους ώστε να υπάρχουν περισσότερα δεδομένα και η διερεύνηση της συσχέτισης των αποτελεσμάτων με την αρχική συγκέντρωση να είναι εφικτή. Τα πειράματα που υλοποιούνται είναι με 12 διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις και στον τίτλο του κάθε πειράματος αναγράφεται η θεωρητική συγκέντρωση που αντιστοιχεί στη ζύγιση και τον σχεδιασμό. Στα αποτελέσματα όμως των περισσότερων πειραμάτων η αρχική συγκέντρωση που παρουσιάζεται και χρησιμοποιείται, έχει υπολογιστεί πειραματικά με τη βοήθεια των προτύπων διαλυμάτων της εργαστηριακής ημέρας και διαφέρει από την θεωρητική. Η διαφορά αυτή μπορεί να αποδοθεί στα αναλυτικά σφάλματα κατά την παρασκευή του δείγματος.

Τέλος, τα πειράματα παρουσιάζονται με διαδοχικές μελετώμενες αρχικές συγκεντρώσεις της Μετρονιδαζόλης, η πραγματική όμως υλοποίησή τους είναι τυχαία για αποφυγή συστηματικών σφαλμάτων.

Αποικοδόμηση μετρονιδαζόλης σε υδατικό περιβάλλον

Αρχικά παρακολουθείται η κινητική των φωτοεπαγόμενων αντιδράσεων της ουσίας σε υδατικά διαλύματα διαφορετικών αρχικών συγκεντρώσεων, από 10^{-6} M έως και $5,2 \times 10^{-3}$ M.

Στη συνέχεια, θα ελεγχθεί η επίδραση διαφορετικών εκδόχων, του PVP ως πολυμερούς και των κυκλοδεξτρινών (CD), με παραδείγματα τις α -CD και HP- β -CD, στην ταχύτητα της φωτοχημικής αποικοδόμησης.

Σημειώνεται πως σε όλα τα πρωτόκολλα, χρησιμοποιούνται περισσότερες από μια κυψελίδες χαλαζία, με πλαστικό βιδωτό πώμα, οι οποίες συμπληρώνονται με 4,0 mL του υπό μελέτη διαλύματος. Η αποικοδόμηση σε κάθε περίπτωση πραγματοποιείται από λυχνία τόξου αερίου Ξένου, που λειτουργεί στα 750 W/m² και με ελεγχόμενη κατά τη διαδικασία θερμοκρασία θαλάμου στους 35 °C. Για την κάθε δειγματοληψία, απομακρύνεται από τον θάλαμο μια κυψελίδα και μεταγγίζεται το περιεχόμενό της, το οποίο φυλάσσεται προστατευμένο από ηλιακή ακτινοβολία. Ακολουθούν αραιώσεις ώστε η συγκέντρωση του δείγματος να είναι εντός της περιοχής παρακολούθησης της μεθόδου.

Οι υπολογισμοί των συγκεντρώσεων της μετρονιδαζόλης σε κάθε χρονική στιγμή γίνονται με χρήση καμπύλης αναφοράς της εκάστοτε ημέρας του πειράματος.

ΙΔ.1. Παρακολούθηση της φωτοχημικής αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης σε υδατικό περιβάλλον

ΙΔ.1.1. Μελέτη φωτοχημικής αποικοδόμησης υδατικού διαλύματος μετρονιδαζόλης με αρχική συγκέντρωση $5,20 \times 10^{-3}$ M

Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων

Ζυγίζονται 61,8 mg ($3,61 \times 10^{-4}$ mol) πρότυπης μετρονιδαζόλης και μεταφέρονται σε φιάλη των 50,0 mL και αραιώνονται μέχρι χαραγής με νερό. Από το διάλυμα αυτό και με τις κατάλληλες διαδοχικές αραιώσεις παρασκευάζεται σειρά προτύπων δειγμάτων με συγκεντρώσεις από $1,44 \times 10^{-3}$ M έως $7,22 \times 10^{-3}$ M.

Παρασκευή δειγμάτων αποικοδόμησης

Ζυγίζονται 89,0 mg της δραστικής ουσίας ($5,20 \times 10^{-4}$ mol) και διαλύονται σε 100,0 mL υπερκάθαρου νερού (διάλυμα $5,20 \times 10^{-3}$ M). Από το διάλυμα μεταφέρονται από 4,0 mL σε κάθε μια από τις 4 κυψελίδες εργασίας και το υπόλοιπο φυλάσσεται προστατευμένο από το φως.

Η αποικοδόμηση παρακολουθείται για συνολικά 20 ώρες.

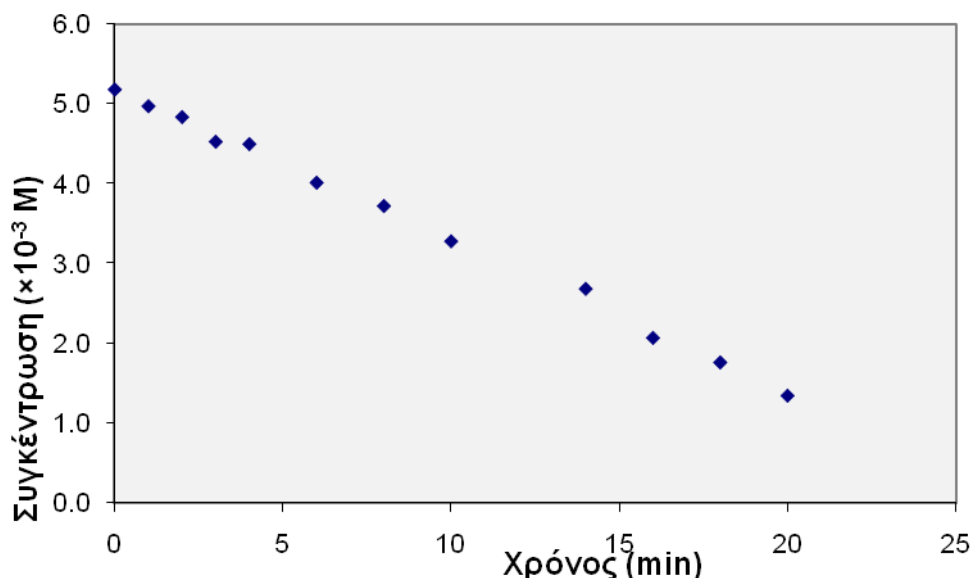
Όλα τα δείγματα και όλα τα πρότυπα διαλύματα, πριν από το χρωματογραφικό τους έλεγχο υφίστανται αραιώση 1 mL στα 20 mL με νερό.

Υπολογισμοί και Αποτελέσματα

Από τα πρότυπα διαλύματα και τη συσχέτιση με τις γνωστές συγκεντρώσεις τους προκύπτει η εξίσωση που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της μετρονιδαζόλης κατά την παρακολούθηση της αποικοδόμησης.

$$C = 4,28 (\pm 0,42) \times 10^{-10} \times [\text{εμβαδό}] - 2,16 (\pm 4,96) \times 10^{-4} \quad R = 0,999$$

Από την παρακολούθηση της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με το χρόνο προκύπτουν τα αποτελέσματα του σχήματος ΙΔ.1.1.



Σχήμα ΙΔ.1.1. Μεταβολή της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με τον χρόνο που υφίσταται ακτινοβολία υδατικό διάλυμα μετρονιδαζόλης $5,20 \times 10^{-3}$ M (κυψελίδα όγκου 4 mL και ένταση ακτινοβολίας 750 W/m^2).

Από τα πειραματικά δεδομένα, εκτιμάται πως η φωτοχημικά ενεργοποιημένη αποικοδόμηση της μετρονιδαζόλης σε συγκέντρωση $5,20 \times 10^{-3}$ M, ακολουθεί μηδενοταξική κινητική. Από την κλίση της ευθείας που απεικονίζει γραφικά τη συγκέντρωση ως προς τον χρόνο, υπολογίζεται η σταθερά ταχύτητας της αποικοδόμησης.

$$k = -(\text{κλίση}) \Rightarrow k = 3,19 (\pm 0,08) \times 10^{-6} \text{ M} \cdot \text{min}^{-1}$$

ΙΔ.1.2. Μελέτη φωτοχημικής αποικοδόμησης υδατικού διαλύματος μετρονιδαζόλης με αρχική συγκέντρωση $3,80 \times 10^{-3}$ M

Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων

Ζυγίζονται διαδοχικά 40,1 mg ($2,34 \times 10^{-4}$ mol), 32,0 mg ($1,87 \times 10^{-4}$ mol) και 34,9 mg ($2,04 \times 10^{-4}$ mol) πρότυπης μετρονιδαζόλης, μεταφέρονται σε ανεξάρτητες φιάλες των 50,0 mL και αραιώνονται μέχρι χαραγής με νερό. Από τα διαλύματα αυτά και με τις κατάλληλες διαδοχικές αραιώσεις παρασκευάζεται σειρά προτύπων δειγμάτων με συγκεντρώσεις από $4,69 \times 10^{-4}$ M έως $4,08 \times 10^{-3}$ M.

Παρασκευή δειγμάτων αποικοδόμησης

Ζυγίζονται 64,9 mg της δραστικής ουσίας ($3,79 \times 10^{-4}$ mol) και διαλύονται σε 100,0 mL υπερκάθαρου νερού (διάλυμα $3,79 \times 10^{-3}$ M). Από το διάλυμα αυτό μεταφέρονται από 4,0 mL σε κάθε μια από τις 4 κυψελίδες εργασίας και το υπόλοιπο φυλάσσεται προστατευμένο από το φως.

Η αποικοδόμηση παρακολουθείται για συνολικά 15 ώρες.

Όλα τα δείγματα και όλα τα πρότυπα διαλύματα, πριν από το χρωματογραφικό τους έλεγχο υφίστανται διαδοχικές αραιώσεις 2 mL στα 20 mL και ακολούθως 5 mL στα 25 mL με νερό.

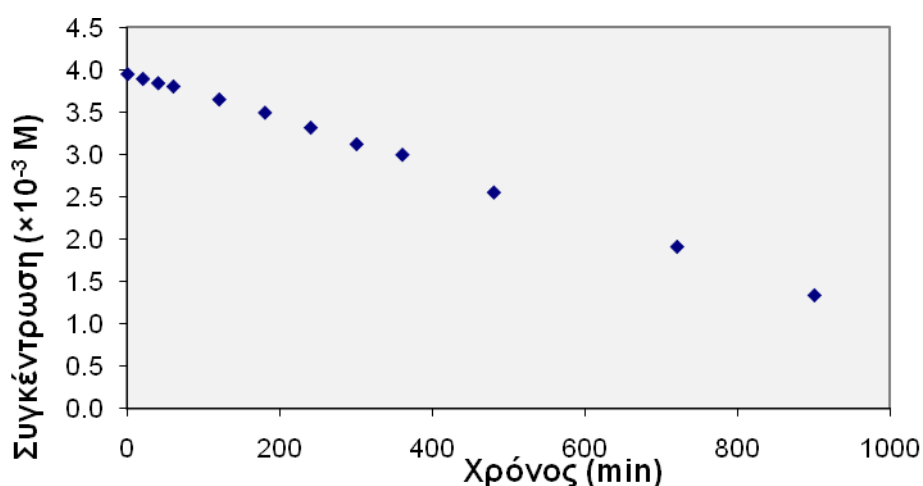
Υπολογισμοί και Αποτελέσματα

Καταγράφονται τα εμβαδά των κορυφών στα πρότυπα διαλύματα και από τη γραμμική συσχέτιση με τις γνωστές συγκεντρώσεις τους, προκύπτει η εξίσωση

$$C = 1,14 (\pm 0,07) \times 10^{-9} \times [\text{εμβαδό}] - 0,53 (\pm 1,94) \times 10^{-4} \quad R = 0,998$$

Η εξίσωση αυτή χρησιμοποιείται στον υπολογισμό των συγκεντρώσεων των δειγμάτων σε μετρονιδαζόλη.

Από την παρακολούθηση της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με το χρόνο προκύπτει το γράφημα του σχήματος ΙΔ.1.2. Σημειώνεται πως ενώ η συγκέντρωση του αρχικού δείγματος σύμφωνα με τη ζύγιση υπολογίζεται στα $3,80 \times 10^{-3} \text{ M}$, η πειραματική τιμή για το αντίστοιχο δείγμα είναι λίγο διαφορετική. Αυτό οφείλεται στα πειραματικά σφάλματα των αραιώσεων και της παρασκευής των προτύπων δειγμάτων. Διατηρείται, στην όλη περιγραφή, ως περιγραφή του δείγματος και του πρωτοκόλλου η θεωρητική συγκέντρωση της μετρονιδαζόλης, όπως αυτή προκύπτει από τη ζύγιση.



Σχήμα ΙΔ.1.2. Μεταβολή της συγκέντρωσης της μετρονιδαζόλης σε συνάρτηση με τον χρόνο που υφίσταται ακτινοβολία υδατικό διάλυμα $3,80 \times 10^{-3} \text{ M}$ (κυψελίδα όγκου 4 mL και ένταση ακτινοβολίας 750 W/m^2).

Από τα πειραματικά δεδομένα, εκτιμάται πως η φωτοχημικά ενεργοποιημένη αποικοδόμηση του υδατικού διαλύματος μετρονιδαζόλης $3,80 \times 10^{-3} \text{ M}$, ακολουθεί για τις πρώτες 15 ώρες μηδενοταξική κινητική. Η κλίση της ευθείας η οποία απεικονίζει γραφικά τα πειραματικά δεδομένα, εκφράζει την σταθερά ταχύτητας της αποικοδόμησης.

$$k = -(\text{κλίση}) \Rightarrow k = 2,90 (\pm 0,08) \times 10^{-6} \text{ M} \cdot \text{min}^{-1}$$

ΙΔ.1.3. Μελέτη φωτοχημικής αποικοδόμησης υδατικού διαλύματος μετρονιδαζόλης με αρχική συγκέντρωση $2,56 \times 10^{-3}$ M

Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων

Ζυγίζονται 45,5 mg ($2,66 \times 10^{-4}$ mol) πρότυπης μετρονιδαζόλης και μεταφέρονται σε φιάλη των 100,0 mL και αραιώνονται μέχρι χαραγής με νερό. Από το διάλυμα αυτό και με τις κατάλληλες διαδοχικές αραιώσεις παρασκευάζεται σειρά προτύπων δειγμάτων με συγκεντρώσεις από $5,32 \times 10^{-5}$ M έως $1,99 \times 10^{-3}$ M.

Παρασκευή δειγμάτων αποικοδόμησης

Ζυγίζονται 43,8 mg της δραστικής ουσίας ($2,56 \times 10^{-4}$ mol) και διαλύονται σε 100,0 mL υπερκάθαρου νερού (διάλυμα $2,56 \times 10^{-3}$ M). Από το διάλυμα αυτό μεταφέρονται από 4,0 mL σε κάθε μια από τις 4 κυψελίδες εργασίας και το υπόλοιπο φυλάσσεται προστατευμένο από το φως.

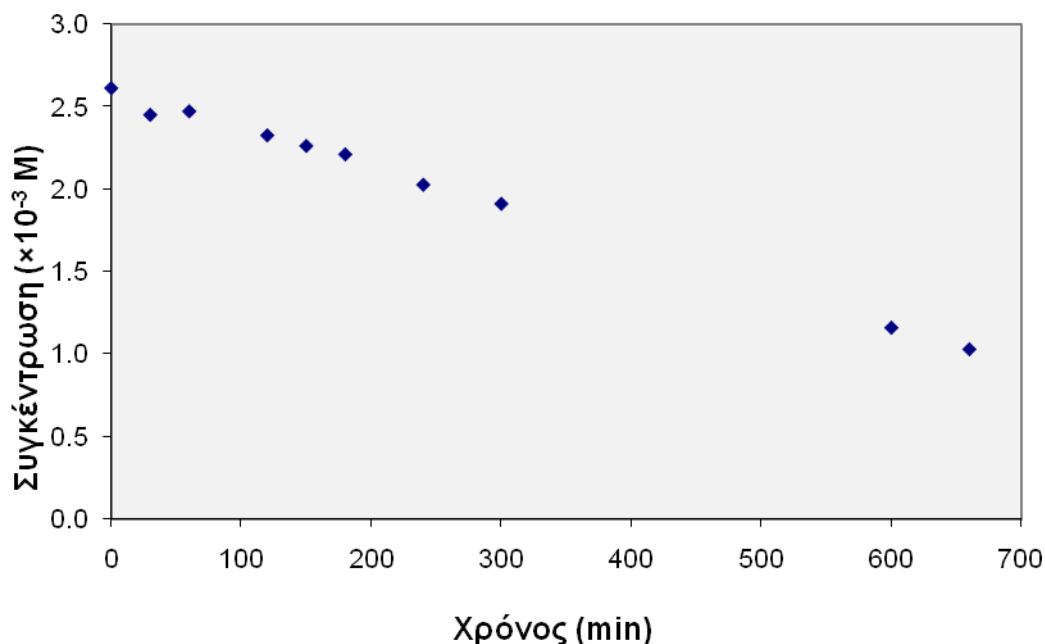
Όλα τα δείγματα και όλα τα πρότυπα διαλύματα, πριν από το χρωματογραφικό τους έλεγχο υφίστανται αραιώση 2 mL στα 100 mL.

Υπολογισμοί και Αποτελέσματα

Από τα εμβαδά στα πρότυπα διαλύματα και τη γραμμική συσχέτιση με τις γνωστές συγκεντρώσεις τους προκύπτει η εξίσωση που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της μετρονιδαζόλης κατά την παρακολούθηση της αποικοδόμησης.

$$C = 9,83 (\pm 0,01) \times 10^{-10} \times [\text{εμβαδό}] - 0,43 (\pm 1,17) \times 10^{-6} \quad R = 1,000$$

Η παρακολούθηση της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με το χρόνο δίνει τα αποτελέσματα του σχήματος ΙΔ.1.3.



Σχήμα ΙΔ.1.3. Μεταβολή της συγκέντρωσης της μετρονιδαζόλης σε συνάρτηση με τον χρόνο που υφίσταται ακτινοβολία υδατικό διάλυμα $2,56 \times 10^{-3}$ M (κυψελίδα όγκου 4 mL και ένταση ακτινοβολίας 750 W/m^2).

Από τα πειραματικά δεδομένα, εκτιμάται πως η φωτοχημικά ενεργοποιημένη αποικοδόμηση διαλύματος μετρονιδαζόλης $2,56 \times 10^{-3}$ M, ακολουθεί μηδενοταξική κινητική. Από την κλίση της ευθείας που απεικονίζει γραφικά την συγκέντρωση ως προς τον χρόνο, υπολογίζεται η σταθερά ταχύτητας της αποικοδόμησης.

$$k = -(\text{κλίση}) \Rightarrow k = 2,37 (\pm 0,11) \times 10^{-6} \text{ M} \cdot \text{min}^{-1}$$

ΙΔ.1.4. Μελέτη φωτοχημικής αποικοδόμησης υδατικού διαλύματος μετρονιδαζόλης με αρχική συγκέντρωση $1,20 \times 10^{-3}$ M

Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων

Ζυγίζονται 61,8 mg ($3,61 \times 10^{-4}$ mol) και 28,4 mg ($1,66 \times 10^{-4}$ mol) πρότυπης μετρονιδαζόλης και με τις κατάλληλες αραιώσεις παρασκευάζονται τα πρότυπα διαλύματα.

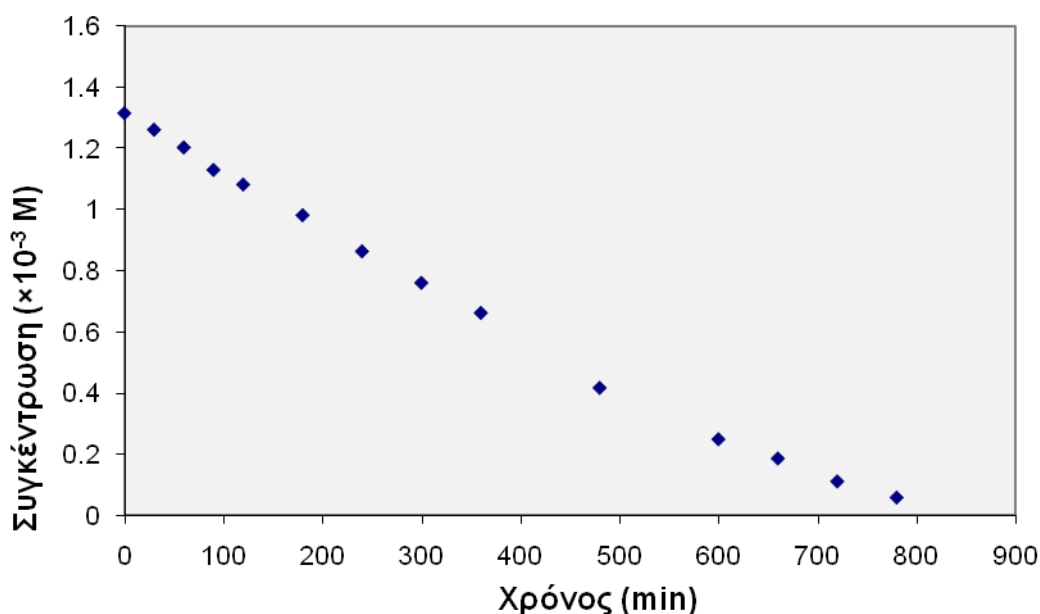
Παρασκευή δειγμάτων αποικοδόμησης

Ζυγίζονται 21,9 mg της δραστικής ουσίας ($1,28 \times 10^{-4}$ mol) και διαλύονται σε 100,0 mL υπερκάθαρου νερού (διάλυμα $1,28 \times 10^{-3}$ M). Από το διάλυμα μεταφέρονται από 4,0 mL σε κάθε μια από τις 4 κυψελίδες εργασίας και το υπόλοιπο φυλάσσεται προστατευμένα από το φως. Η αποικοδόμηση παρακολουθείται για συνολικά 13 ώρες.

Δείγματα και πρότυπα διαλύματα, πριν από το χρωματογραφικό έλεγχο, υφίστανται αραίωση 2 mL στα 20 mL με νερό.

Υπολογισμοί και Αποτελέσματα

Από την παρακολούθηση της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με το χρόνο προκύπτει το γράφημα του σχήματος ΙΔ.1.4. Σημειώνεται πως και σε αυτό το πείραμα, η διαφορά της ονομαστικής τιμής της αρχικής συγκέντρωσης του δείγματος και η πειραματική τιμή για το πρώτο δείγμα διαφέρουν λίγο και αυτό αποδίδεται στα πειραματικά σφάλματα.



Σχήμα ΙΔ.1.4: Μεταβολή της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με τον χρόνο που υφίσταται ακτινοβολία υδατικό διάλυμα μετρονιδαζόλης $1,28 \times 10^{-3}$ M (κυψελίδα όγκου 4 mL και ένταση ακτινοβολίας 750 W/m^2).

Από τα πειραματικά δεδομένα, εκτιμάται πως η φωτοχημικά ενεργοποιημένη αποικοδόμηση μεθανολικού διαλύματος μετρονιδαζόλης $1,28 \times 10^{-3}$ M, ακολουθεί μηδενοταξική κινητική. Από την κλίση της ευθείας που απεικονίζει γραφικά τη συγκέντρωση ως προς τον χρόνο, υπολογίζεται η σταθερά ταχύτητας της αποικοδόμησης.

$$k = -(\text{κλίση}) \Rightarrow k = 1,66 (\pm 0,08) \times 10^{-6} \text{ M} \cdot \text{min}^{-1}$$

ΙΔ.1.5. Μελέτη φωτοχημικής αποικοδόμησης υδατικού διαλύματος μετρονιδαζόλης με αρχική συγκέντρωση $7,96 \times 10^{-4}$ M

Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων

Ζυγίζονται 27,2 mg ($1,59 \times 10^{-4}$ mol) πρότυπης μετρονιδαζόλης και με τις κατάλληλες διαδοχικές αραιώσεις παρασκευάζεται σειρά προτύπων δειγμάτων με συγκεντρώσεις από $1,59 \times 10^{-4}$ M έως $7,95 \times 10^{-4}$ M.

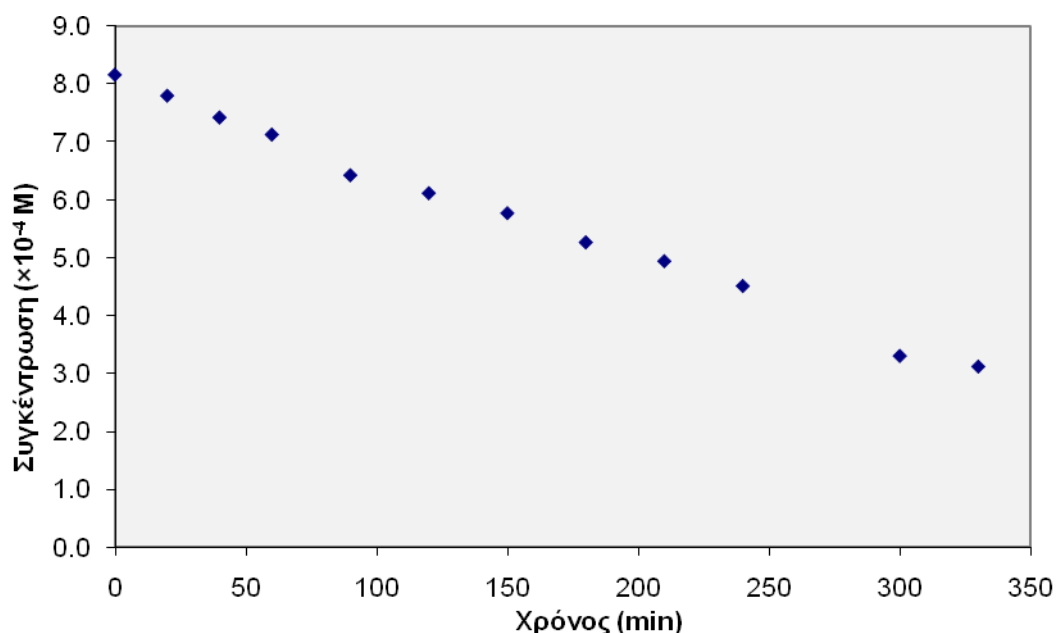
Παρασκευή δειγμάτων αποικοδόμησης

Ζυγίζονται 34,1 mg της δραστικής ουσίας ($1,99 \times 10^{-4}$ mol) και διαλύονται σε 250,0 mL υπερκάθαρου νερού (διάλυμα $7,96 \times 10^{-4}$ M). Από το διάλυμα μεταφέρονται από 4,0 mL σε κάθε μια από τις τέσσερις κυψελίδες εργασίας και το υπόλοιπο φυλάσσεται προστατευμένο από το φως. Η αποικοδόμηση παρακολουθείται για συνολικά 5 ώρες και 30 min.

Όλα τα δείγματα και όλα τα πρότυπα διαλύματα, πριν από το χρωματογραφικό τους έλεγχο υφίστανται αραιώση 1 mL στα 20 mL με νερό.

Υπολογισμοί και Αποτελέσματα

Η συγκέντρωση σε συνάρτηση με το χρόνο παρουσιάζεται γραφικά στο σχήμα ΙΔ.1.5.



Σχήμα ΙΑ.1.5. Μεταβολής της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με τον χρόνο που υφίσταται ακτινοβολία υδατικό διάλυμα μετρονιδαζόλης $7,96 \times 10^{-4}$ M (κυψελίδα όγκου 4 mL και ένταση ακτινοβολίας 750 W/m^2).

Από τα πειραματικά δεδομένα, εκτιμάται πως και σε αυτή την περίπτωση η φωτοχημικά ενεργοποιημένη αποικοδόμηση διαλύματος μετρονιδαζόλης συγκέντρωσης $7,96 \times 10^{-4}$ M, ακολουθεί μηδενοταξική κινητική. Από την κλίση της ευθείας που απεικονίζει γραφικά τη συγκέντρωση ως προς τον χρόνο, υπολογίζεται η σταθερά ταχύτητας της αποικοδόμησης.

$$k = -(\text{κλίση}) \Rightarrow k = 1,52 (\pm 0,08) \times 10^{-6} \text{ M} \cdot \text{min}^{-1}$$

ΙΑ.1.6. Μελέτη φωτοχημικής αποικοδόμησης υδατικού διαλύματος μετρονιδαζόλης με αρχική συγκέντρωση $5,12 \times 10^{-4}$ M

Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων

Ζυγίζονται 45,5 mg ($2,66 \times 10^{-4}$ mol) πρότυπης μετρονιδαζόλης και με τις κατάλληλες διαδοχικές αραιώσεις παρασκευάζεται σειρά προτύπων δειγμάτων με συγκεντρώσεις από $5,32 \times 10^{-5}$ M έως $1,60 \times 10^{-4}$ M.

Παρασκευή δειγμάτων αποικοδόμησης

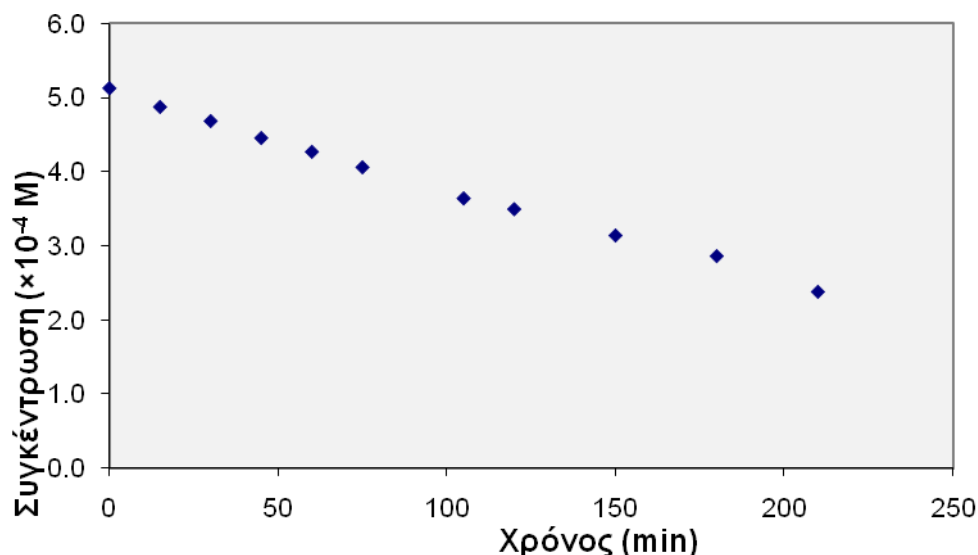
Ζυγίζονται 43,8 mg της δραστικής ουσίας ($2,56 \times 10^{-4}$ mol) και διαλύονται σε 50,0 mL υπερκάθαρου νερού (διάλυμα $5,12 \times 10^{-3}$ M). 10 mL από το διάλυμα μεταφέρονται σε φιάλη των 100,0 mL και αραιώνονται μέχρι χαραγής με νερό ($5,12 \times 10^{-4}$ M). Από το διάλυμα αυτό μεταφέρονται από 4,0 mL σε κάθε μια από τις 4 κυψελίδες εργασίας και το υπόλοιπο φυλάσσεται προστατευμένο από το φως. Η αποικοδόμηση παρακολουθείται για συνολικά 3 ώρες και 30 min.

Όλα τα δείγματα και όλα τα πρότυπα διαλύματα, πριν από το χρωματογραφικό τους έλεγχο υφίστανται αραιώση 2 mL στα 20 mL νερό.

Υπολογισμοί και Αποτελέσματα

Από τα εμβαδά των κορυφών στα πρότυπα διαλύματα και από τη γραμμική τους συσχέτιση με τις γνωστές συγκεντρώσεις προκύπτει η εξίσωση που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της μετρονιδαζόλης κατά την παρακολούθηση της αποικοδόμησης.

Από την παρακολούθηση της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με το χρόνο προκύπτει το γράφημα του σχήματος ΙΔ.1.6.



Σχήμα ΙΔ.1.6. Μεταβολής της συγκέντρωσης της μετρονιδαζόλης σε συνάρτηση με τον χρόνο που υφίσταται ακτινοβολία υδατικό διάλυμα $5,12 \times 10^{-4}$ M (κυψελίδα όγκου 4 mL και ένταση ακτινοβολίας 750 W/m^2).

Από τα πειραματικά δεδομένα, εκτιμάται πως η φωτοχημικά ενεργοποιημένη αποικοδόμηση διαλύματος μετρονιδαζόλης $5,12 \times 10^{-4}$ M, ακολουθεί μηδενοταξική κινητική. Από την κλίση της ευθείας που απεικονίζει γραφικά τη συγκέντρωση ως προς τον χρόνο, υπολογίζεται η σταθερά ταχύτητας της αποικοδόμησης.

$$C = -1,28 (\pm 0,05) \times 10^{-6} \times [\text{χρόνος}] + 5,06 (\pm 0,06) \times 10^{-4} \quad R = 0,998$$

$$k = -(\text{κλίση}) \Rightarrow k = 1,28 (\pm 0,05) \times 10^{-6} \text{ M} \cdot \text{min}^{-1}$$

Η συγκέντρωση αυτή της μετρονιδαζόλης, είναι αρκετά μικρή και είναι κοντά στις τιμές που η κινητική είναι γίνεται πρωτοταξική. Εάν θεωρηθεί πρωτοταξική, τότε εκφράζεται από την εξίσωση

$$\ln C = -3,50 (\pm 0,23) \times 10^{-3} \times [\text{χρόνος}] - 7,56 (\pm 0,03) \quad R = 0,996$$

Η τιμή του συντελεστή συσχέτισης δεν είναι πολύ διαφορετική από αυτή της μηδενοταξικής, η οποία θεωρείται οριακά καλύτερη, οπότε και αποδεχόμαστε το μοντέλο της μηδενοταξικής κινητικής.

ΙΔ.1.7. Μελέτη φωτοχημικής αποικοδόμησης υδατικού διαλύματος μετρονιδαζόλης με αρχική συγκέντρωση $2,06 \times 10^{-4}$ M

Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων

Ζυγίζονται 21,5 mg ($1,26 \times 10^{-4}$ mol) πρότυπης μετρονιδαζόλης και με τις κατάλληλες διαδοχικές αραιώσεις παρασκευάζεται σειρά προτύπων δειγμάτων με συγκεντρώσεις από $3,14 \times 10^{-5}$ M έως $2,51 \times 10^{-4}$ M.

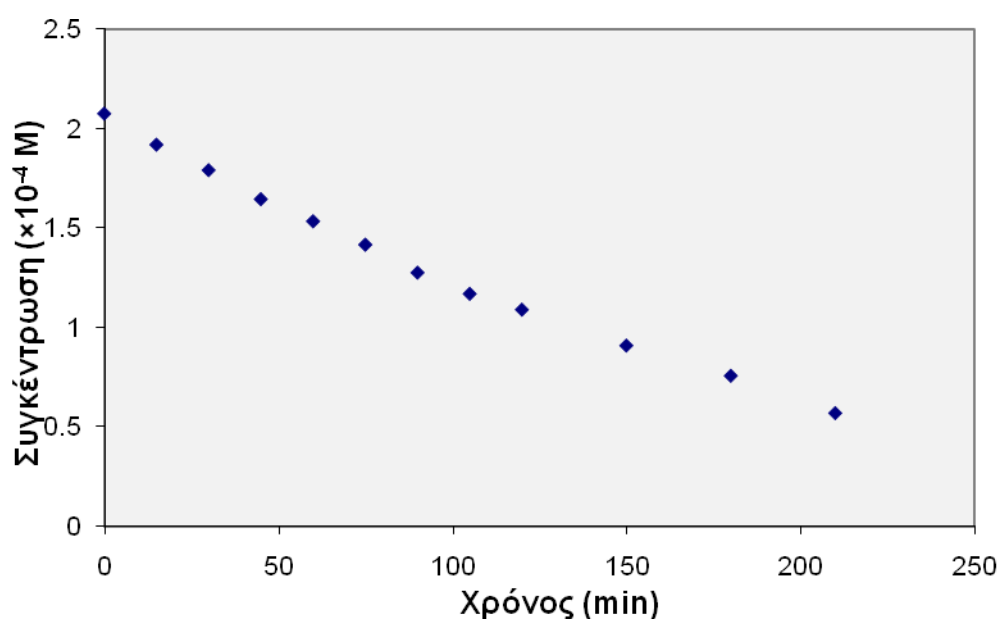
Παρασκευή δειγμάτων αποικοδόμησης

Ζυγίζονται 35,2 mg της δραστικής ουσίας ($2,06 \times 10^{-4}$ mol) και διαλύονται σε 100,0 mL υπερκάθαρου νερού (διάλυμα $2,56 \times 10^{-3}$ M). Από το διάλυμα αυτό

10 mL αραιώνονται στα 100 mL με νερό. Από το τελευταίο διάλυμα μεταφέρονται από 4,0 mL σε κάθε μια από τις 4 κυψελίδες εργασίας και το υπόλοιπο φυλάσσεται προστατευμένο από το φως. Η αποικοδόμηση παρακολουθείται για συνολικά 3 ώρες και 30 min.

Υπολογισμοί και Αποτελέσματα

Από την παρακολούθηση της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με το χρόνο προκύπτει το γράφημα του σχήματος ΙΔ.1.7.



Σχήμα ΙΔ.1.7. Μεταβολή της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με τον χρόνο που υφίσταται ακτινοβολία υδατικό διάλυμα μετρονιδαζόλης $2,06 \times 10^{-4}$ M (κυψελίδα όγκου 4 mL και ένταση ακτινοβολίας 750 W/m^2).

Από τα πειραματικά δεδομένα, εκτιμάται πως η φωτοχημικά ενεργοποιημένη αποικοδόμηση διαλύματος μετρονιδαζόλης συγκέντρωση $2,06 \times 10^{-4}$ M, ακολουθεί οριακά πρωτοταξική κινητική. Θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως μικτή κινητική. Από την εξίσωση που συνδέει τον φυσικό λογάριθμο της συγκέντρωσης με τον χρόνο, υπολογίζεται η σταθερά ταχύτητας της αποικοδόμησης.

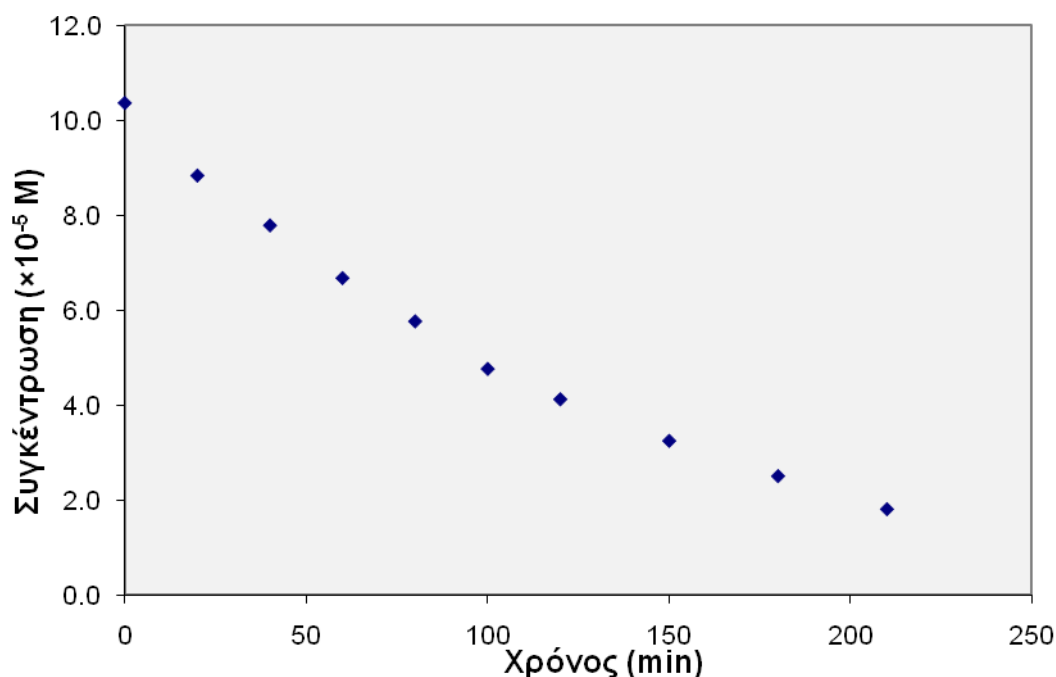
$$k = -(\text{κλίση}) \Rightarrow k = 5,97 (\pm 0,36) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$$

ΙΔ.1.8. Μελέτη φωτοχημικής αποικοδόμησης υδατικού διαλύματος μετρονιδαζόλης με αρχική συγκέντρωση $1,04 \times 10^{-4}$ M

Ακολουθείται αντίστοιχος τρόπος εργασίας με τα προηγούμενα πειράματα τόσο στην παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων όσο και του μελετώμενου δείγματος.

Υπολογισμοί και Αποτελέσματα

Από την παρακολούθηση της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με το χρόνο προκύπτουν τα δεδομένα του σχήματος ΙΔ.1.8.



Σχήμα ΙΔ.1.8. Μεταβολή της συγκέντρωσης της μετρονιδαζόλης ως προς τον χρόνο που υφίσταται ακτινοβολία υδατικό διάλυμα $1,04 \times 10^{-4}$ M (κυψελίδα όγκου 4 mL και ένταση ακτινοβολίας 750 W/m^2).

Από τη γραφική απεικόνιση των πειραματικών δεδομένων εκτιμάται πως η αποικοδόμηση της μετρονιδαζόλης (υδατικό διάλυμα $1,04 \times 10^{-4}$ M), ακολουθεί πρωτοταξική κινητική, αν και θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως μικτή κινητική.

Από την συσχέτιση του φυσικού λογάριθμου της συγκέντρωσης με τον χρόνο, υπολογίζεται η σταθερά ταχύτητας της αποικοδόμησης.

$$\ln C = -8,16 (\pm 0,37) \times 10^{-3} \times [\text{χρόνος}] - 9,14 (\pm 0,04) \quad R = 0,998$$

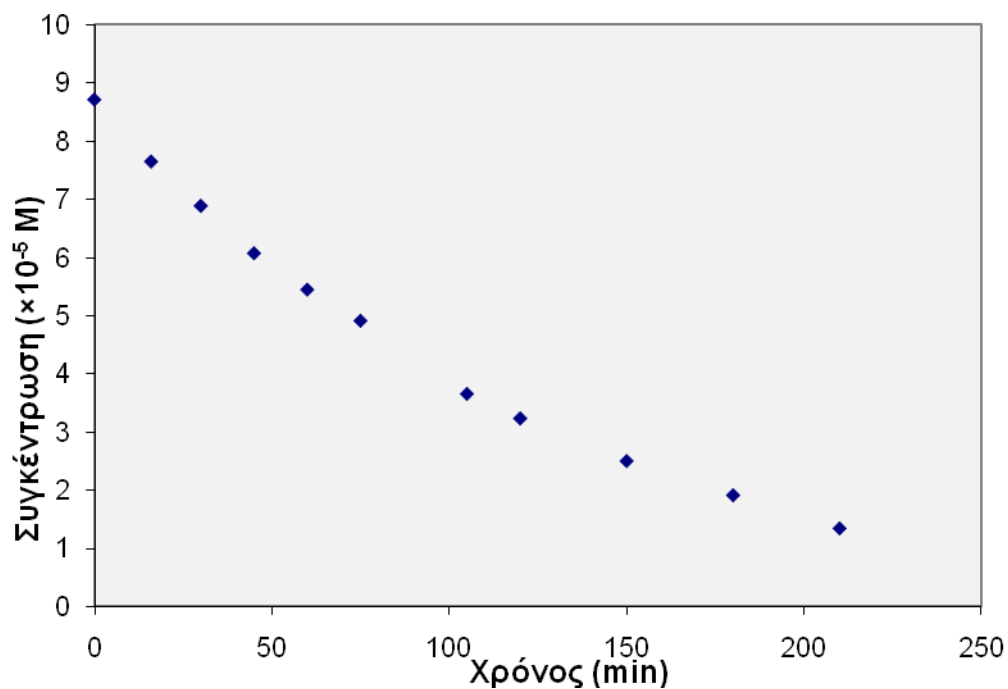
$$k = -(\text{κλίση}) \Rightarrow k = 8,16 (\pm 0,37) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$$

ΙΔ.1.9. Μελέτη φωτοχημικής αποικοδόμησης υδατικού διαλύματος μετρονιδαζόλης με αρχική συγκέντρωση $8,40 \times 10^{-5} \text{ M}$

Ακολουθείται αντίστοιχος τρόπος εργασίας με τα προηγούμενα πειράματα τόσο στην παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων όσο και του μελετώμενου δείγματος.

Υπολογισμοί και Αποτελέσματα

Από την παρακολούθηση της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με το χρόνο προκύπτει το γράφημα του σχήματος ΙΔ.1.9.



Σχήμα ΙΑ.1.9. Μεταβολής της συγκέντρωσης της μετρονιδαζόλης ως προς τον χρόνο που υφίσταται ακτινοβολία υδατικό διάλυμα $8,40 \times 10^{-5}$ M (κυψελίδα όγκου 4 mL και ένταση ακτινοβολίας 750 W/m^2).

Από τα πειραματικά δεδομένα, εκτιμάται πως η φωτοχημικά ενεργοποιημένη αποικοδόμηση διαλύματος μετρονιδαζόλης $8,40 \times 10^{-5}$ M, ακολουθεί για πρωτοταξική κινητική. Από την κλίση της ευθείας που απεικονίζει γραφικά τον φυσικό λογάριθμο της συγκέντρωσης ως προς τον χρόνο, υπολογίζεται η σταθερά ταχύτητας της αποικοδόμησης.

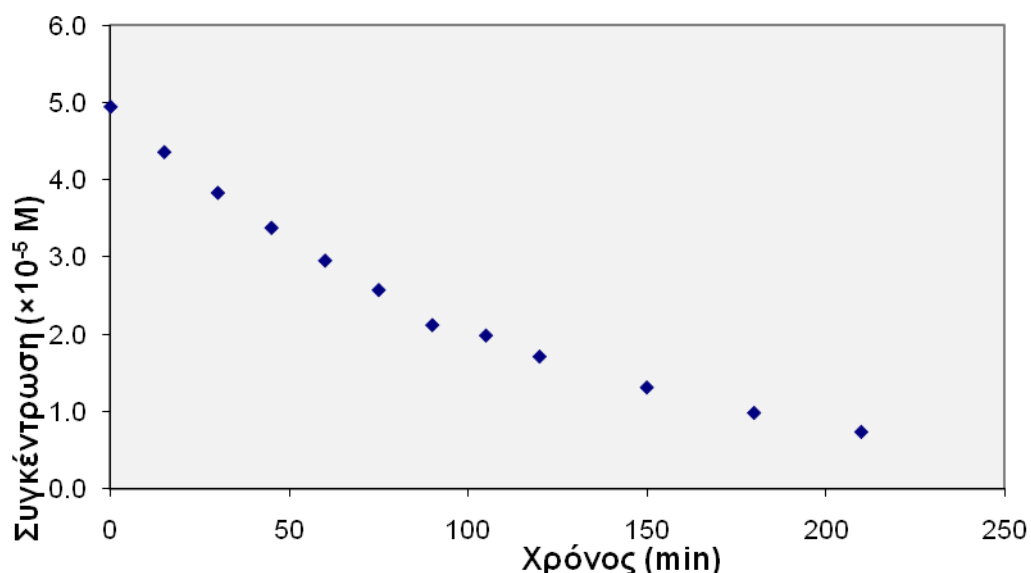
$$k = -(\text{κλίση}) \Rightarrow k = 8,72 (\pm 0,36) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$$

ΙΔ.1.10. Μελέτη φωτοχημικής αποικοδόμησης υδατικού διαλύματος μετρονιδαζόλης με αρχική συγκέντρωση $5,00 \times 10^{-5}$ M

Ακολουθείται αντίστοιχος τρόπος εργασίας με τα προηγούμενα πειράματα

Υπολογισμοί και Αποτελέσματα

Από την παρακολούθηση της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με το χρόνο προκύπτει το σχήμα ΙΔ.1.10.



Σχήμα ΙΔ.1.10. Μεταβολή της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με τον χρόνο που υφίσταται ακτινοβολία υδατικό διάλυμα μετρονιδαζόλης $5,02 \times 10^{-5}$ M (κυψελίδα όγκου 4 mL και ένταση ακτινοβολίας 750 W/m^2).

Η φωτοχημικά ενεργοποιημένη αποικοδόμηση της μετρονιδαζόλης σε τόσο μικρή συγκέντρωση ($5,02 \times 10^{-5}$ M), ακολουθεί για πρωτοταξική κινητική. Από την κλίση της ευθείας που απεικονίζει γραφικά τον φυσικό λογάριθμο της συγκέντρωσης ως προς τον χρόνο, υπολογίζεται η σταθερά ταχύτητας της αποικοδόμησης,

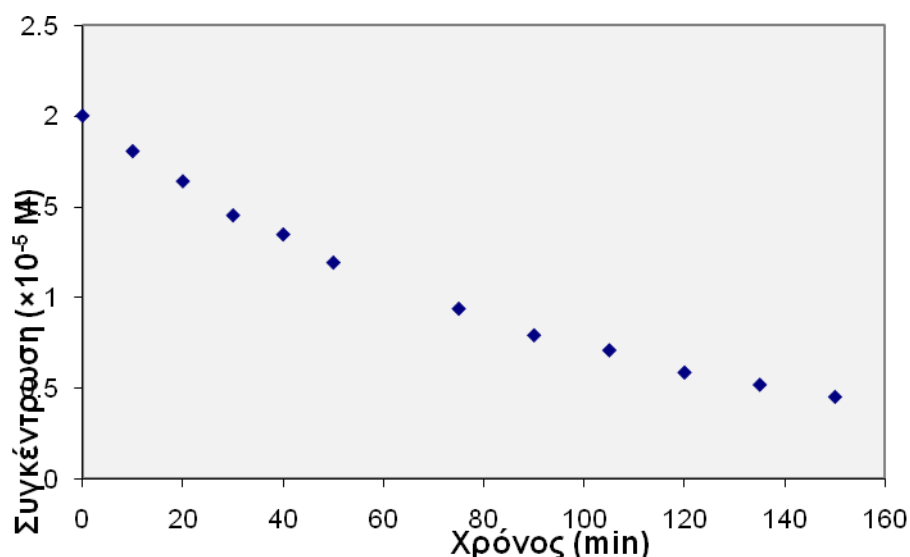
$$k = -(\text{κλίση}) \Rightarrow k = 9,01 (\pm 0,20) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$$

ΙΔ.1.11. Μελέτη φωτοχημικής αποικοδόμησης υδατικού διαλύματος μετρονιδαζόλης με αρχική συγκέντρωση $2,03 \times 10^{-5}$ M

Ακολουθείται αντίστοιχος τρόπος εργασίας με τα προηγούμενα πειράματα

Υπολογισμοί και Αποτελέσματα

Από την παρακολούθηση της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με το χρόνο προκύπτει το γράφημα του σχήματος ΙΔ.1.11.



Σχήμα ΙΔ.1.11. Μεταβολή της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με τον χρόνο που υφίσταται ακτινοβολία υδατικό διάλυμα μετρονιδαζόλης $2,03 \times 10^{-5}$ M (κυψελίδα όγκου 4 mL και ένταση ακτινοβολίας 750 W/m^2).

Από τα πειραματικά δεδομένα, εκτιμάται πως η φωτοχημικά ενεργοποιημένη αποικοδόμηση διαλύματος μετρονιδαζόλης συγκέντρωσης $2,03 \times 10^{-5}$ M, ακολουθεί πρωτοταξική κινητική. Από την κλίση της ευθείας που απεικονίζει γραφικά τον φυσικό λογάριθμο της συγκέντρωσης ως προς τον χρόνο, υπολογίζεται η σταθερά ταχύτητας της αποικοδόμησης.

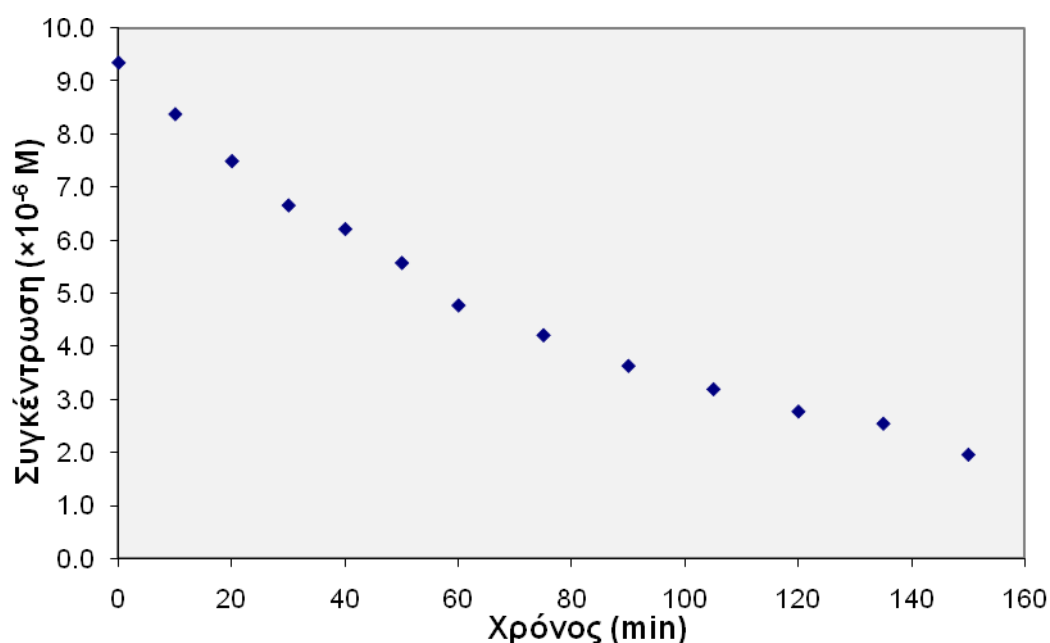
$$k = -(\text{κλίση}) \Rightarrow k = 9,96 (\pm 0,19) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$$

ΙΔ.1.12. Μελέτη φωτοχημική αποικοδόμησης υδατικού διαλύματος μετρονιδαζόλης με αρχική συγκέντρωση $1,00 \times 10^{-5}$ M

Ακολουθείται αντίστοιχος τρόπος εργασίας με τα προηγούμενα πειράματα

Υπολογισμοί και Αποτελέσματα

Από την παρακολούθηση της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με το χρόνο προκύπτει το γράφημα του σχήματος ΙΔ.12.



Σχήμα ΙΔ.1.12. Μεταβολή της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με τον χρόνο που υφίσταται ακτινοβολία υδατικό διάλυμα μετρονιδαζόλης $9,41 \times 10^{-6}$ M (κυψελίδα όγκου 4 mL και με ένταση ακτινοβολίας 750 W/m^2).

Η αποικοδόμηση διαλύματος μετρονιδαζόλης $9,41 \times 10^{-6}$ M, ακολουθεί πρωτοταξική κινητική. Από την κλίση της ευθείας που απεικονίζει γραφικά τον φυσικό λογάριθμο της συγκέντρωσης ως προς τον χρόνο, υπολογίζεται η σταθερά ταχύτητας της αποικοδόμησης,

$$k = -(\text{κλίση}) \Rightarrow k = 1,01 (\pm 0,04) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$$

ΙΔ.1.13. Σχόλια – Παρατηρήσεις

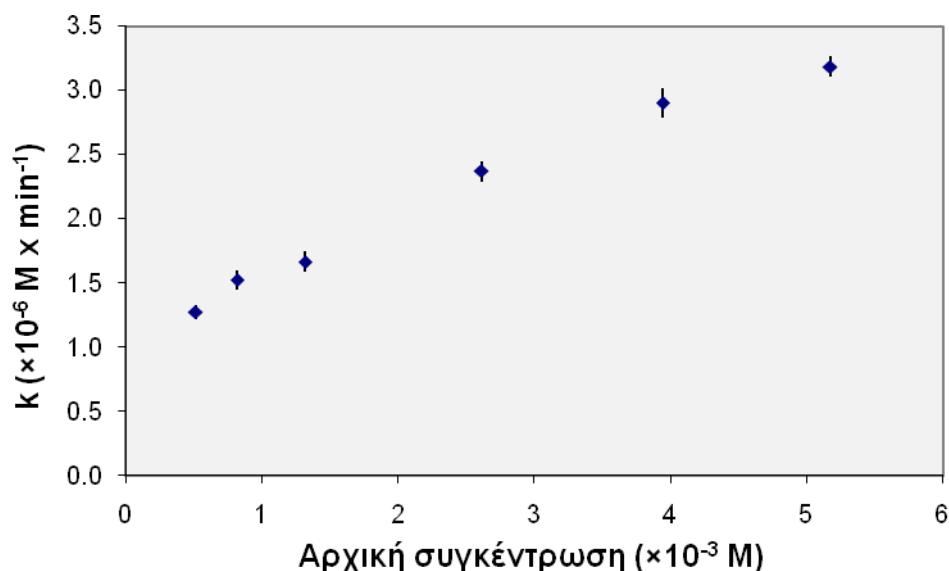
Η φωτοχημική διάσπαση υδατικών διαλυμάτων της μετρονιδαζόλης, παρακολούθηθηκε σε ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων, 10^{-6} M έως και $5,2 \times 10^{-3}$ M. Οι τιμές της σταθεράς ταχύτητας της φωτοαποικοδόμησης συγκεντρώνονται για κάθε διαφορετική αρχική συγκέντρωση στον πίνακα ΙΔ.1.1.

Πίνακας ΙΔ.1.1. Συγκεντρωτικός πίνακας όλων των σταθερών ταχύτητας που υπολογίστηκαν σε κάθε αρχική συγκέντρωση διαλύματος μετρονιδαζόλης.

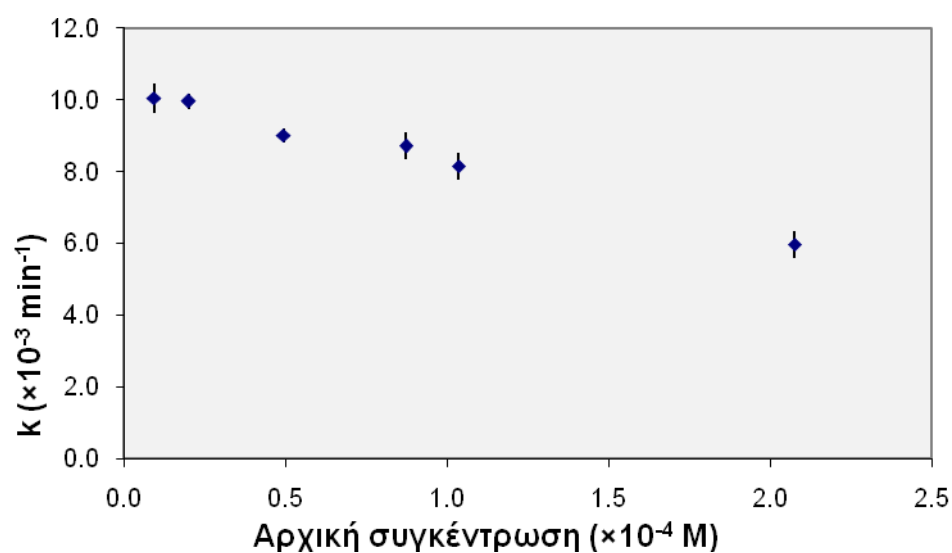
	Αρχική Συγκέντρωση (M)	Σταθερά ταχύτητα φωτοαποικοδόμησης	
		Μηδενοταξική ($M \cdot \text{min}^{-1}$)	Πρωτοταξική (min^{-1})
1	$5,17 \times 10^{-3}$	$3,19 (\pm 0,08) \times 10^{-6}$	
2	$3,95 \times 10^{-3}$	$2,90 (\pm 0,08) \times 10^{-6}$	
3	$2,61 \times 10^{-3}$	$2,37 (\pm 0,11) \times 10^{-7}$	
4	$1,32 \times 10^{-3}$	$1,67 (\pm 0,08) \times 10^{-6}$	
5	$8,17 \times 10^{-4}$	$1,52 (\pm 0,08) \times 10^{-6}$	
6	$5,13 \times 10^{-4}$	$1,28 (\pm 0,05) \times 10^{-6}$	
7	$2,08 \times 10^{-4}$		$5,97 (\pm 0,36) \times 10^{-3}$
8	$1,04 \times 10^{-4}$		$8,16 (\pm 0,37) \times 10^{-3}$
9	$8,72 \times 10^{-5}$		$8,72 (\pm 0,36) \times 10^{-3}$
10	$4,95 \times 10^{-5}$		$9,01 (\pm 0,20) \times 10^{-3}$
11	$2,00 \times 10^{-5}$		$9,96 (\pm 0,19) \times 10^{-3}$
12	$9,36 \times 10^{-6}$		$10,05 (\pm 0,42) \times 10^{-3}$

Στις χαμηλές συγκεντρώσεις, η κινητική που ακολουθείται είναι ευκρινώς πρωτοταξική ενώ στις υψηλές μηδενοταξική. Κάπου στο ενδιάμεσο των συγκεντρώσεων που ελέχθησαν, η κινητική αλλάζει και δεν είναι εύκολο να οριστεί το μοντέλο που εκφράζει την κάθε περίπτωση. Πρόκειται για την περιοχή με μικτή κινητική, αρχικά μηδενοταξική και στη συνέχεια πρωτοταξική, και η επιλογή ή αξιολόγησή τους ως μηδενοταξική ή πρωτοταξική δεν είναι απόλυτη, στις συγκεντρώσεις κοντά στην 2 με 5×10^{-4} M. Στις ενδιάμεσες αυτές συγκεντρώσεις* η κινητική που ακολουθεί η αποικοδόμηση είναι μικτή.

Τα σχήματα που ακολουθούν είναι γραφήματα της ταχύτητας της αποικοδόμησης συναρτήσει της αρχικής συγκέντρωσης του διαλύματος, για τις περιπτώσεις της μηδενοταξικής και της πρωτοταξικής κινητικής αντίστοιχα.



Σχήμα 1Α.13: Διάγραμμα απεικόνισης των σταθερών ταχύτητας σε συνάρτηση με την αρχική συγκέντρωση των διαλυμάτων μετρονιδαζόλης, για τις περιπτώσεις που οι κινητικές χαρακτηρίστηκαν ως μηδενοταξικές



Σχήμα 1Α.14: Διάγραμμα απεικόνισης των σταθερών ταχύτητας σε συνάρτηση με την αρχική συγκέντρωση των διαλυμάτων μετρονιδαζόλης, για τις περιπτώσεις που οι κινητικές χαρακτηρίστηκαν ως πρωτοταξικές

Με γνώμονα τη δομή της μετρονιδαζόλης, διερευνάται και διαπιστώνεται πως το pH του υδατικού διαλύματός της εξαρτάται από τη συγκέντρωση της δραστικής ουσίας. Οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν παρατίθενται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας ΙΔ.1.2.: Μετρούμενο pH υδατικών διαλυμάτων μετρονιδαζόλης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις

	Συγκέντρωση μετρονιδαζόλης (M)						
	$5,15 \times 10^{-3}$	$1,34 \times 10^{-3}$	$8,08 \times 10^{-4}$	$5,19 \times 10^{-4}$	$1,04 \times 10^{-4}$	$4,94 \times 10^{-5}$	$9,16 \times 10^{-6}$
pH	6,22	6,07	6,03	5,96	5,92	5,84	5,77

Εκτιμάται πως θα έπρεπε, πριν την εξαγωγή των όποιων συμπερασμάτων να ελεγχθεί εάν οι διαφορές στις σταθερές των φωτοχημικών αποικοδομήσεων της μετρονιδαζόλης οφείλονται στο pH του αρχικού διαλύματος.

ΙΑ.2. Αποικοδόμηση μετρονιδαζόλης σε διαφορετικά pH του διαλύτη

Παρατηρήθηκε πως το pH των διαλυμάτων της μετρονιδαζόλης μεταβάλλεται με τη συγκέντρωση και πραγματοποιείται μια μελέτη για το εάν η επίδραση της συγκέντρωσης στον ρυθμό της φωτοχημικής διάσπασης συνδέεται και με το pH του διαλύματος και των ιόντων που το ρυθμίζουν. Διατηρήθηκαν όλες οι διαφορετικές παράμετροι σταθερές (κυψελίδες, πηγή, θέση σε σχέση με την πηγή ακτινοβολίας).

Για τη μελέτη αυτή, παρασκευάζονται διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα και χρησιμοποιούνται ως διαλύτες της μετρονιδαζόλης. Τα διαλύματα που προκύπτουν υφίστανται αποικοδόμηση και παρακολουθείται η μεταβολή της συγκέντρωσης του φαρμάκου με τον χρόνο. Η μεταβολή συγκρίνεται με αυτή που καταγράφεται για το υδατικό διάλυμα ίδιας συγκέντρωσης μετρονιδαζόλης αλλά αλάτων κ ιόντων ρυθμιστικού.

Παρασκευή διαλυμάτων διαφορετικού pH

Διαλύματα 1^{ης} εργαστηριακής ημέρας

Ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,4: 250 mL δισόξινου φωσφορικού καλίου 0,2 M αναμιγνύονται με 393,4 mL διαλύματος καυστικού νατρίου 0,1 M και αραιώνονται στα 1000 mL με νερό. Το pH του διαλύματος ελέγχεται και εάν χρειάζεται διορθώνεται στην τιμή 7,4 με αραιό διάλυμα φωσφορικού οξέος ή καυστικού νατρίου.

Διάλυμα pH 9,0: ποσότητα από το ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,4 ρυθμίζεται με αραιό διάλυμα καυστικού νατρίου σε pH 9,0.

Ρυθμιστικό διάλυμα pH 3,0: 12 g NaH₂PO₄ διαλύονται σε 950 mL νερού και το pH ρυθμίζεται με αραιό διάλυμα φωσφορικού οξέος στο 3,0.

Διάλυμα pH 5,2: ποσότητα από το ρυθμιστικό διάλυμα pH 3,0, ρυθμίζεται στην τιμή 5,2 με NaOH.

Διαλύματα 2^{ης} εργαστηριακής ημέρας. Έχουν ίδιο pH με τα δυο της 1^{ης} μέρας αλλά δεν διαθέτουν ρυθμιστική ικανότητα.

Διάλυμα pH 7,4: παρασκευάζεται όπως το υδατικό μέρος της κινητής φάσης (1,36 g/L δισόξινο φωσφορικό κάλιο) και ρυθμίζεται στην τιμή 7,4 με NaOH.

Διάλυμα pH 9,0: ποσότητα από το υδατικό μέρος της κινητής φάσης ρυθμίζεται στην τιμή 9,0 με NaOH.

Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

34,59 mg ($2,02 \times 10^{-4}$ mol) και 32,18 mg ($1,88 \times 10^{-4}$ mol) πρότυπης μετρονιδαζόλης μεταφέρονται σε φιάλες των 100 mL και συμπληρώνονται μέχρι χαραγής με νερό. Προκύπτουν διαλύματα συγκεντρώσεων $2,02$ και $1,88 \times 10^{-3}$ M αντίστοιχα.

Από τα διαλύματα αυτά παρασκευάζονται με τις κατάλληλες αραιώσεις τα πρότυπα διαλύματα των δυο καμπυλών αναφοράς, για τις 2 εργαστηριακές ημέρες του πειράματος, με τελικές συγκεντρώσεις από $2,02 \times 10^{-5}$ έως $1,13 \times 10^{-4}$ M.

Φωτοχημική αποικοδόμηση

34,29 mg μετρονιδαζόλης μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και αραιώνονται μέχρι χαραγής με νερό (Διάλυμα M). Για την κάθε σειρά φωτοχημικής αποικοδόμησης, 5 mL από το διάλυμα αυτό μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και αραιώνονται μέχρι χαραγής με τον αντίστοιχο διαλύτη ($1,00 \times 10^{-4}$ M).

Για κάθε μια από τις 2 εργαστηριακές ημέρες, 5 mL του διαλύματος M αραιώνονται στα 100 mL με νερό και παρακολουθείται η φωτοχημική του αποικοδόμηση.

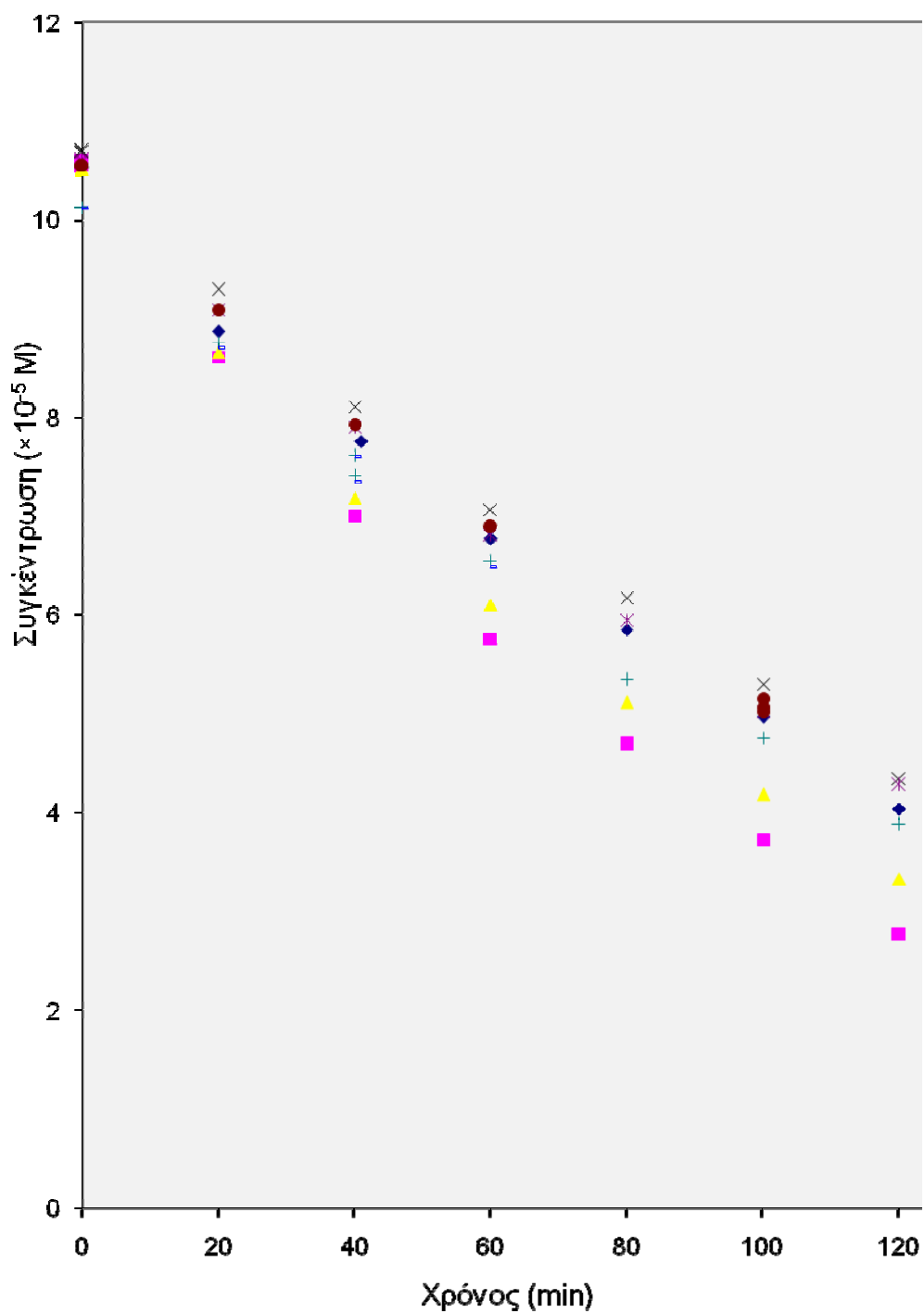
Σε κάθε παρακολούθηση της φωτοχημικής αποικοδόμησης ακολουθείται το ίδιο πρωτόκολλο:

4,0 mL από το διάλυμα προς παρακολούθηση, μεταφέρονται σε κυψελίδα χαλαζία και τοποθετούνται στον θάλαμο της αποικοδόμησης. Όταν συμπληρωθεί ο κατάλληλος χρόνος αποικοδόμησης, το περιεχόμενο της κυψελίδας απομακρύνεται και φυλάσσεται. Η κυψελίδα επανασυμπληρώνεται με 4,0 mL του ίδιου διαλύματος και επανατοποθετείται στον θάλαμο αποικοδόμησης. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να έχουν συλλεχθεί δείγματα που αντιστοιχούν σε χρόνους αποικοδόμησης από 20 έως 210 λεπτά.

Υπολογισμοί και αποτελέσματα

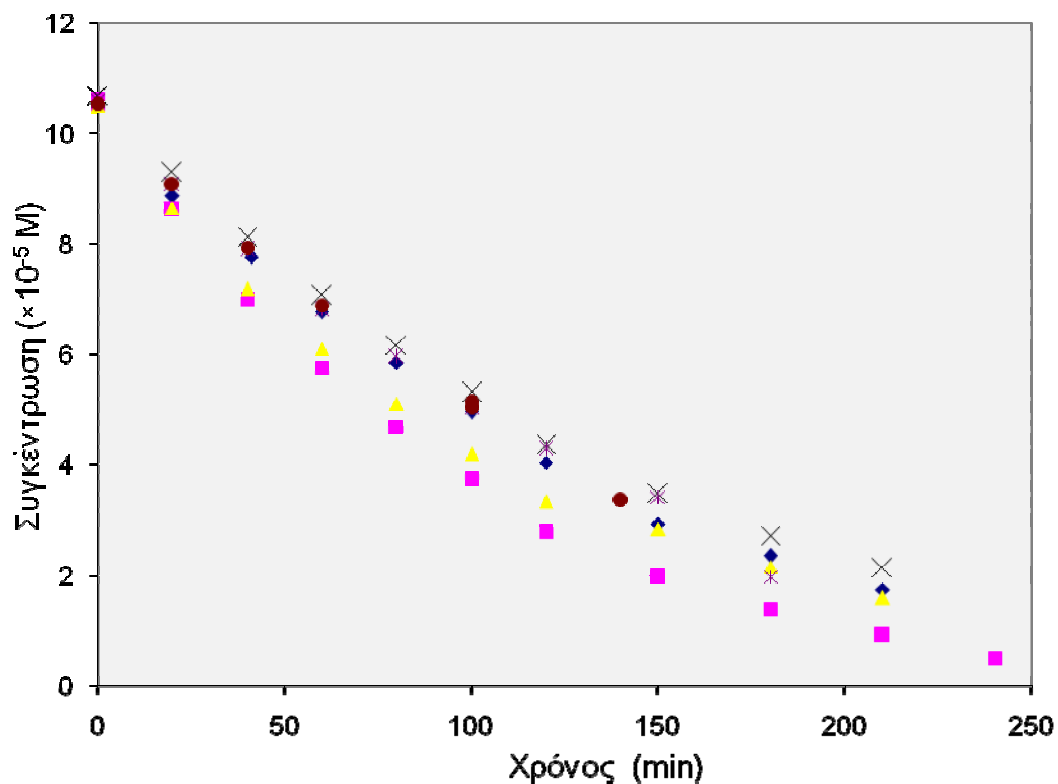
Από τις δυο σειρές προτύπων διαλυμάτων, μια για την κάθε εργαστηριακή ημέρα, και τη χρωματογραφική τους απόκριση προκύπτουν οι καμπύλες αναφοράς που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της μετρονιδαζόλης στο κάθε δείγμα.

Στα διαγράμματα ΙΔ.2.1 και ΙΔ.2.2 δίνονται τα αποτελέσματα της χρωματογραφικής παρακολούθησης των συγκεντρώσεων των δειγμάτων της κάθε εργαστηριακής ημέρας αντίστοιχα.



Σχήμα ΙΔ.2.1.: Απεικόνιση της μεταβολής της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με τον χρόνο για τα πρώτα 120 λεπτά έκθεσης σε ακτινοβολία, διαλυμάτων μετρονιδαζόλης αρχικής συγκέντρωσης $1,06 \times 10^{-4}$ M σε διαφορετικό διαλύτη:

1^η μέρα (◆)νερό, (■) ρυθμιστικό pH 7,4, (▲) ρυθμιστικό pH 9, (×) pH 3, (*) pH 5,2,
 2^η μέρα (●) νερό (+) διάλυμα pH 7,4, (-) διάλυμα pH 9.



Σχήμα ΙΑ.2.2. Απεικόνιση της μεταβολής της συγκέντρωσης διαλυμάτων μετρονιδαζόλης $1,06 \times 10^{-4}$ M σε διαφορετικό διαλύτη σε συνάρτηση με τον χρόνο: (◆)νερό 1^η μέρα, (■) pH 7,4, (▲) pH 9, (×) pH 3, (*) pH 5,2, (●) νερό 2^η μέρα.

Η φωτοχημική αποικοδόμηση της μετρονιδαζόλης για τα πρώτα 120 min ακολουθεί μηδενοταξική κινητική σε όλα τα pH που ελέγχθηκε. Η ταχύτητα της αποικοδόμησης υπολογίζεται από την κλίση της ευθείας που συσχετίζει τη συγκέντρωση με τον χρόνο. Τα αποτελέσματα συγκεντρώνονται στον πίνακα

Πίνακας ΙΔ.2.1.: Συγκέντρωση των σταθερών φωτοχημικής αποικοδόμησης μετρονιδαζόλης 10^{-4} M σε υδατικά διαλύματα διαφορετικού pH. (κυψελίδα όγκου 4 mL και με ένταση ακτινοβολίας 750 W/m^2)

Δείγμα	$k (\times 10^{-7} \text{ M/min})$	$\pm (\times 10^{-7} \text{ M/min})$
Υδατικό I	5,38	0,56
pH 7,4	6,56	0,88
pH 9	6,02	0,83
pH 3	5,28	0,44
pH 5,2	5,33	0,57
Υδατικό II	5,37	0,45
pH 7,4 II	5,26	0,53
pH 9 II	5,21	0,60

Παρατηρήσεις - Συμπεράσματα

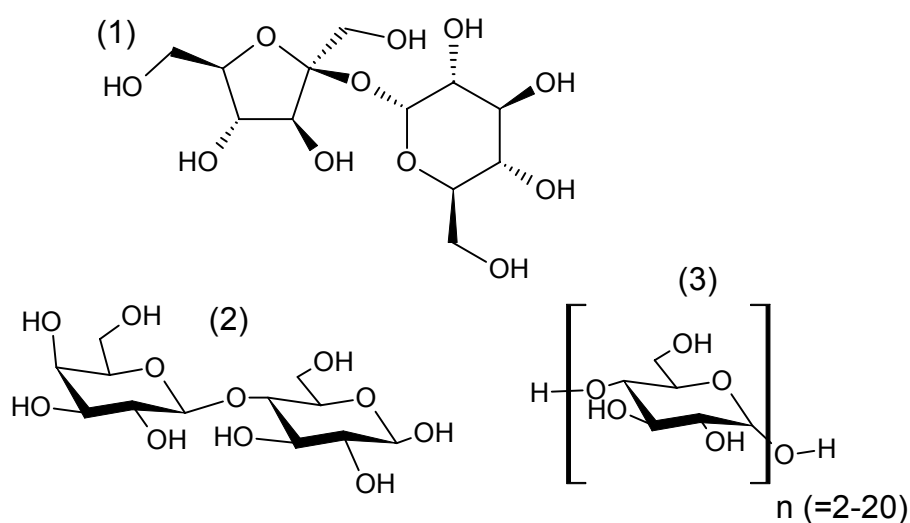
Από την παρατήρηση των δεδομένων των διαγραμμάτων ΙΔ.2.1 και ΙΔ.2.2 καθώς και από την αποτύπωσή τους στα αντίστοιχα σχήματα, προκύπτουν τα εξής:

- Στην περίπτωση του διαλύτη με pH 7,4, η αποικοδόμηση εμφανίζει επιτάχυνση στο ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση φωσφορικών.
- Το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση του διαλύτη με pH 9,0, όπου η φωτοχημική διάσπαση είναι πιο γρήγορη στο ρυθμιστικό διάλυμα όπου και η συγκέντρωση των φωσφορικών ιόντων είναι μεγαλύτερη.
- Η σύγκριση της μεταβολής της συγκέντρωσης σε μετρονιδαζόλη στα διαλύματα με την ελάχιστη συγκέντρωση φωσφορικών και με pH από 3 έως 9, καθώς και οι δυο σειρές σε καθαρό νερό, αποκαλύπτει πως η φωτοχημική αποικοδόμηση της μετρονιδαζόλης δεν επηρεάζεται από το pH. Επηρεάζεται όμως από την συγκέντρωση των φωσφορικών, όπως είναι γνωστό.

ΙΑ.3. Μελέτη του ρυθμού φωτοχημικών μεταβολών της μετρονιδαζόλης παρουσία διαφορετικών εκδόγων

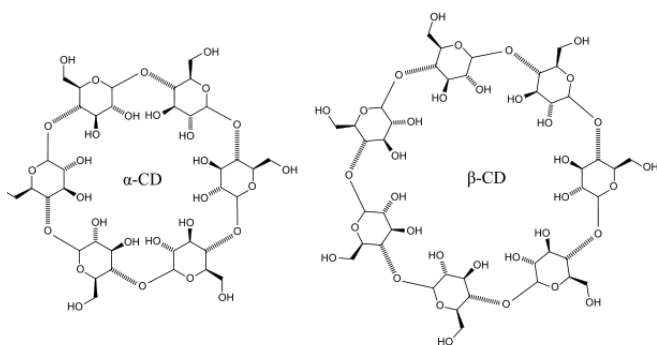
Όπως στην περίπτωση της καρβεδιλόλης, έτσι και στην μετρονιδαζόλη, γίνεται μια σύντομη προσπάθεια να παρακολουθηθεί πως επηρεάζεται η φωτοχημική αποικοδόμησή της παρουσία εκδόγων.

Η μια κατηγορία ενώσεων που μελετάται είναι τα σάκχαρα. Ως απλά μόρια επιλέγονται οι σακχαρόζη και λακτόζη ενώ ως πολυσακχαρίτης, η μαλτοδεξτρίνη. Το PVP έχει μελετηθεί στην καρβεδιλόλη και για την διεξαγωγή συγκριτικών συμπερασμάτων ελέγχεται η συνεισφορά του στην φωτοχημική αποικοδόμηση και της μετρονιδαζόλης, σε διάφορες συγκεντρώσεις του. Σημειώνεται πως τόσο η μαλτοδεξτρίνη όσο και το PVP χαρακτηρίζονται από σχετικά μεγάλο μήκος του μορίου, αποτέλεσμα του πολυμερισμού της βασικής ομάδας.



Σχήμα ΙΑ.3.1. Δομές των σακχάρων που μελετώνται ως έκδοχα στην φωτοχημική αποικοδόμηση της μετρονιδαζόλης. (1) Σακχαρόζη, (2) λακτόζη (3) μαλτοδεξτρίνη

Σε επόμενο βήμα, ελέγχεται η επίδραση στη αποικοδόμηση των κυκλοδεξτρινών, συγκεκριμένα των α -CD και HP- β -CD, που η κοιλότητά τους είναι πιθανό να φιλοξενήσει το μόριο της μετρονιδαζόλης.



Σχήμα ΙΑ.3.2. Δομή φυσικών κυκλοδεξτρινών

ΙΑ.3.1. Επίδραση απλών και γραμμικών εκδόχων στην φωτοχημική αποικοδόμηση της μετρονιδαζόλης.

Σειρά Α

Παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα παρακαταθήκης της μετρονιδαζόλης το οποίο χρησιμοποιείται για την παρασκευή των διαλυμάτων των οποίων μελετάται η φωτοχημική αποικοδόμηση. Όλα τα διαλύματα που παρασκευάζονται έχουν την ίδια συγκέντρωση στην δραστική ουσία και διαφοροποιούνται από τη συγκέντρωση και τη σύσταση του προστιθέμενου εκδόχου. Το πρωτόκολλο που ακολουθείται είναι το ίδιο για όλα τα διαλύματα και περιγράφεται αναλυτικά.

Παρασκευή διαλυμάτων

172,8 mg μετρονιδαζόλης μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 500 mL και αραιώνονται με υπερκάθαρο νερό μέχρι χαραγής ($2,02 \times 10^{-3}$ M, διάλυμα S1). Το διάλυμα φυλάσσεται προστατευμένο από το φως.

111,3 mg PVP μεταφέρονται σε φιάλη 100,0 mL και αραιώνονται με 80 mL νερού. Ακολουθεί η παραμονή του διαλύματος στους υπερήχους για τη διευκόλυνση της διαλυτοποίησης του πολυμερούς και ακολούθως συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι χαραγής με τον ίδιο διαλύτη (διάλυμα Π, 111,3 % w/v PVP).

Παρασκευάζονται τα υδατικά διαλύματα της μετρονιδαζόλης του πίνακα ΙΔ.3.1 ($1,01 \times 10^{-4}$ M).

Πίνακας ΙΔ.3.1. Παρασκευή υδατικών διαλυμάτων μετρονιδαζόλης, $1,01 \times 10^{-4}$ M, με διαφορετική σύσταση σε έκδοχα για την παρακολούθηση της φωτοχημικής τους συμπεριφοράς.

<i>Διάλυμα</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>	<i>V</i>	<i>VI</i>	<i>VII</i>
mL Μετρονιδαζόλης $2,02 \times 10^{-3}$ M	5	5	5	5	5	5	5
mL διαλύματος Π 111,3 % w/v PVP	-	5	10	40	-	-	-
mg λακτόζης	-	-	-	-	40,5	-	-
mg σουκρόζης	-	-	-	-	-	41,5	-
mg μαλτοδεξτρίνης	-	-	-	-	-	-	41,8
<i>Τελικός όγκος (mL)</i>	<i>100</i>	<i>100</i>	<i>100</i>	<i>100</i>	<i>100</i>	<i>100</i>	<i>100</i>

Περιγραφή πειράματος αποικοδόμησης

Μεταφέρονται 4,0 mL από το διάλυμα I σε τρεις κυψελίδες εργασίας, σφραγίζονται ερμητικά και τοποθετούνται στον θάλαμο ακτινοβολίας από τη λυχνία τόξου αερίου Ξένου. Η κάθε κυψελίδα απομακρύνεται μετά από 20, 40 και 60 min αποικοδόμησης και το περιεχόμενό τους μεταγγίζεται σε άλλον περιέκτη. Οι κυψελίδες συμπληρώνονται με άλλα 4,0 mL από το διάλυμα I και η παρακολούθηση της αποικοδόμησης συνεχίζεται αντίστοιχα για 80, 100 και 120 min.

Το παραπάνω πρωτόκολλο επαναλαμβάνεται για τα διαλύματα II έως VII την ίδια εργαστηριακή ημέρα.

Παρασκευή καμπύλης αναφοράς

28,6 mg μετρονιδαζόλης μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100,0 mL και αραιώνονται μέχρι τη χαραγή με νερό. Από το διάλυμα αυτό και με τις κατάλληλες αραιώσεις παρασκευάζονται τα διαλύματα της καμπύλης αναφοράς, από $3,34$ έως $10,4 \times 10^{-5}$ M. Από τα εμβάδα των κορυφών τους,

προκύπτει η εξίσωση που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της μετρονιδαζόλης στα διαλύματα της αποικοδόμησης.

Αποτελέσματα

Τα δείγματα που συλλέγονται από τις επτά σειρές αποικοδόμησης αναλύονται χρωματογραφικά και υπολογίζεται η συγκέντρωση της μετρονιδαζόλης στο κάθε διάλυμα. Τα αποτελέσματα συγκεντρώνονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας ΙΔ.3.2. Φωτοχημική αποικοδόμηση διαλυμάτων μετρονιδαζόλης συγκέντρωσης $\sim 10^{-4}$ M, παρουσία διαφορετικών εκδόχων (κυψελίδα όγκου 4 mL και με ένταση ακτινοβολίας 750 W/m²)

		Συγκέντρωση Μετρονιδαζόλης ($\times 10^{-5}$ M)						
Διάλυμα		I	II	III	IV	V	VI	VII
Χρόνος (min)	0	9,94	9,90	9,89	9,43	9,90	9,75	9,87
	20	8,71	8,66	8,66	8,26	8,67	8,52	8,62
	40	7,44	7,37	7,39	-	7,44	7,27	7,39
	60	6,67	6,55	6,56	6,23	6,62	6,45	6,53
	80	5,64	5,52	5,64	-	5,50	5,24	5,56
	100	5,06	4,93	4,95	5,09	5,02	4,84	5,31
	120	4,31	4,21	4,30	4,02	4,28	4,17	4,24
k ($\times 10^{-7}$ M·min ⁻¹)		<u>4,64</u>	<u>4,71</u>	<u>4,63</u>	<u>4,34</u>	<u>4,66</u>	<u>4,67</u>	<u>4,53</u>
\pm ($\times 10^{-7}$ M·min ⁻¹)		<u>0,64</u>	<u>0,67</u>	<u>0,65</u>	<u>0,78</u>	<u>0,68</u>	<u>0,77</u>	<u>0,76</u>

Στον πίνακα των αποτελεσμάτων έχει προστεθεί για την κάθε σειρά η σταθερά ταχύτητας της φωτοχημικής αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης σε κάθε ένα από τα διαφορετικά διαλύματα που περιέχουν έκδοχα. Έχει προκύψει από την κλίση της ευθείας που εκφράζει τη συγκέντρωση του δείγματος σε συνάρτηση με τον χρόνο που υφίσταται την επίδραση της ακτινοβολίας.

Σχόλια-Παρατηρήσεις

Ο ρυθμός της φωτοεπαγόμενης αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης δεν μεταβάλλεται σημαντικά από την παρουσία των εκδόχων που μελετήθηκαν.

Η επίδραση του PVP θα μελετηθεί και σε λίγο υψηλότερη συγκέντρωση διαλυμάτων μετρονιδαζόλης, σε αντιστοιχία με την μελέτη που έγινε στην καρβεδιλόλη.

Σειρά Β

Παρασκευάζονται υδατικά διαλύματα ίδιας συγκέντρωσης μετρονιδαζόλης και διαφορετικής συγκέντρωσης PVP. Τα διαλύματα αυτά υφίστανται ακτινοβολία και παρακολουθούνται όσο αφορά την φωτοχημική αποικοδόμηση της μετρονιδαζόλης.

Παρασκευή διαλυμάτων

44,1 mg μετρονιδαζόλης μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 250 mL και συμπληρώνονται μέχρι όγκου με υπερκάθαρο νερό (διάλυμα S2, $1,03 \times 10^{-3}$ M).

56,7 mg PVP μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και αραιώνονται μέχρι τη χαραγή με το διάλυμα S2 (διάλυμα Π1).

10,0 mL από το διάλυμα Π1 μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και συμπληρώνονται μέχρι όγκου με το διάλυμα S2 (διάλυμα Π2).

Τα διαλύματα Π1 και Π2 έχουν την ίδια συγκέντρωση μετρονιδαζόλης με το διάλυμα S2 και διαφέρουν ως προς τη συγκέντρωσή τους στο πολυμερές.

Περιγραφή πειράματος αποικοδόμησης

Μεταφέρονται 4,0 mL από το διάλυμα S2 σε 4 κυψελίδες εργασίας, σφραγίζονται ερμητικά και τοποθετούνται στον θάλαμο ακτινοβολίας από τη λυχνία τόξου αερίου Ξένου. Η κάθε κυψελίδα απομακρύνεται μετά από 30, 60, 90 και 120 min αντίστοιχα.

Το παραπάνω πρωτόκολλο επαναλαμβάνεται για τα διαλύματα Π1 και Π2 την ίδια εργαστηριακή ημέρα.

Το περιεχόμενο της κάθε κυψελίδας, όπως και τα πρότυπα διαλύματα, ετοιμάζονται για την χρωματογραφική ανάλυση με αραιώση 2 mL στα 20 mL με νερό.

Αποτελέσματα

Τα δείγματα που συλλέγονται από την κάθε αποικοδόμηση αναλύονται χρωματογραφικά και η συγκέντρωση της μετρονιδαζόλης που υπολογίζεται για το κάθε διάλυμα δίνεται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας ΙΑ.3.3. Σύγκριση της επίδρασης του PVP στη φωτοχημική αποικοδόμηση διαλυμάτων μετρονιδαζόλης συγκέντρωσης $1,03 \times 10^{-3}$ M (κυψελίδα όγκου 4 mL και με ένταση ακτινοβολίας 750 W/m^2)

		Συγκέντρωση Μετρονιδαζόλης ($\times 10^{-4}$ M)		
Διάλυμα		S2 Δίχως PVP	Π1 PVP:0,57 mg/mL	Π2 PVP:0,06 mg/mL
Χρόνος (min)	0	10,60	11,05	10,60
	30	10,11	10,47	10,02
	60	9,46	9,77	9,55
	90	8,88	9,20	9,08
	120	8,38	8,59	8,66
$k (\times 10^{-6} \text{ M}\cdot\text{min}^{-1})$		1,88	2,07	1,60
Διακύμανση $k (\times 10^{-6} \text{ M}\cdot\text{min}^{-1})$		0,15	0,11	0,17

Στο τέλος του πίνακα παρατίθενται οι τιμές για την σταθερά ταχύτητας της φωτοχημικής αποικοδόμησης που υπολογίζονται για τα αντίστοιχα διαλύματα καθώς και η διακύμανση της τιμής.

Σχόλια-Παρατηρήσεις

Δεν παρατηρείται κάποια επίδραση του PVP στην ταχύτητα της αποικοδόμησης όπως στην περίπτωση της καρβεδιλόλης, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση της δραστικής και του πολυμερούς. Η διακύμανση των αποτελεσμάτων δεν θεωρείται στατιστικά σημαντική και δεν μπορεί να αξιολογηθεί.

ΙΔ.3.2. Επίδραση κυκλοδεξτρινών στην φωτοχημική αποικοδόμηση της μετρονιδαζόλης

Η επίδραση των κυκλοδεξτρινών στη φωτοχημική αποικοδόμηση της μετρονιδαζόλης μελετάται επιλέγοντας τις α -CD και HP- β -CD. Τα διαλύματα που υφίστανται την επίδραση της φωτεινής ακτινοβολίας έχουν 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις της δραστικής ουσίας, ώστε να μελετηθεί η επίδραση τόσο στην περιοχή της μηδενοταξική όσο και στην περιοχή της πρωτοταξικής κινητικής.

Επίσης, η ευρύτητα της χρήσης και το λογικότερο κόστος της HP- β -CD επιτρέπει την μελέτη της σε διαφορετικές αναλογίες με την δραστική ουσία.

Επιλέγεται η παρακολούθηση της επίδρασης των κυκλοδεξτρινών να πραγματοποιηθεί με σύντομα πειραματικά πρωτόκολλα που θα επιτρέπουν την αξιολόγηση της επίδρασης.

Παρασκευή διαλυμάτων

91,1 mg μετρονιδαζόλης μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 200 mL και αραιώνονται μέχρι τη χαραγή με υπερκάθαρο νερό (διάλυμα M1, $2,7 \times 10^{-3}$ M). Από το διάλυμα αυτό 3 mL μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 200 mL και αραιώνονται με τον ίδιο διαλύτη (διάλυμα M2, $4,0 \times 10^{-5}$ M).

Χρησιμοποιώντας ως διαλύτες τα διαλύματα M1 και M2, παρασκευάζονται τα διαλύματα του πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας ΙΔ.3.4. Παρασκευή διαλυμάτων μετρονιδαζόλης συγκέντρωσης 10^{-3} M για την παρακολούθηση της φωτοχημικής τους αποικοδόμησης παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων α - και HP- β - κυκλοδεξτρινών.

				Τελικός όγκος (mL) με διάλυμα:	
		mg α -CD	mg HP- β -CD	M1 $C_{MET}=2,7 \times 10^{-3}$ M	M2 $C_{MET}=4,0 \times 10^{-5}$ M
Διάλυμα	A1	105,0	-	20	-
	A2	6,4	-	-	25
	A3	2,0	-	-	25
	A4	23,9	-	-	25
	B1	-	83,0	20	-
	B2	-	408,5	20	-
	B3	-	1526,1	20	-
	B4	-	3,8	-	25
	B5	-	9,1	-	25
	B6	-	33,5	-	25

Περιγραφή πειράματος αποικοδόμησης

Όλα τα διαλύματα του πίνακα ΙΔ.3.4 προστατεύονται από το φως και αφήνονται για 40 ώρες σε ανάδευση. Την ανάδευση ακολουθεί η αποικοδόμηση..

4,0 mL από το διάλυμα M1 μεταφέρονται σε 2 κυψελίδες εργασίας και υφίστανται την ακτινοβολία λυχνίας τόξου αερίου Ξένου για 60 και 120 min αντίστοιχα. Στο τέλος της κάθε χρονικής στιγμής, η κυψελίδα απομακρύνεται και το περιεχόμενό της αποθηκεύεται προστατευμένο από το το φως. Τα δείγματα ετοιμάζονται για την χρωματογραφική διάταξη πραγματοποιώντας την αραιώση 2,0 mL στα 100 mL.

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για τα διαλύματα A1, B1, B2 και B3.

4,0 mL από το διάλυμα M2 μεταφέρονται σε 3 κυψελίδες εργασίας και δέχονται την ακτινοβολία για 20, 40 και 60 min αντίστοιχα. Η κάθε κυψελίδα απομακρύνεται από τον θάλαμο την κατάλληλη χρονική στιγμή και το περιεχόμενό της αναλύεται χρωματογραφικά.

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για τα διαλύματα A2, A3, A4, B4, B5, B6.

Παρασκευή καμπύλης αναφοράς

25,0 mg μετρονιδαζόλης μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100,0 mL και με τις κατάλληλες αραιώσεις παρασκευάζονται τα διαλύματα της καμπύλης αναφοράς, από $4,76 \times 10^{-6}$ M έως $1,46 \times 10^{-4}$ M.

Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα που υπολογίζονται με την βοήθεια της καμπύλης αναφοράς για όλα τα δείγματα συγκεντρώνονται στους πίνακες που ακολουθούν. Έχει προστεθεί για το κάθε διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης μετρονιδαζόλης, η σταθερά ταχύτητας που υπολογίζεται.

Πίνακας ΙΑ.3.5. Αποτελέσματα φωτοχημικής αποικοδόμησης διαλυμάτων μετρονιδαζόλης συγκέντρωσης $2,66 \times 10^{-3}$ M παρουσία κυκλοδεξτρινών.

		Συγκέντρωση μετρονιδαζόλης ($\times 10^{-3}$ M)				
		M1	A1	B1	B2	B3
Χρόνος (min)	0	2,66	2,51	2,55	2,49	2,44
	60	2,58	2,43	2,42	2,36	2,20
	120	2,44	2,30	2,23	2,14	1,94
k ($\times 10^{-6}$ M/min)		1,82	1,75	2,65	2,92	4,20
Απόκλιση k ($\times 10^{-6}$ M/min)		0,37	0,19	0,55	0,17	0,17

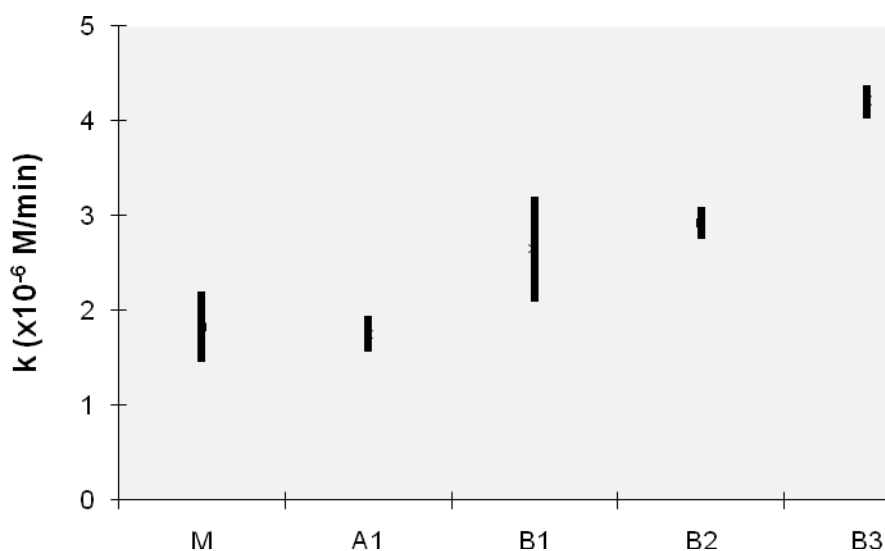
Πίνακας ΙΑ.3.6. Αποτελέσματα φωτοχημικής αποικοδόμησης διαλυμάτων μετρονιδαζόλης συγκέντρωσης $3,84 \times 10^{-5}$ M παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων α - και ΗΡ- β -κυκλοδεξτρινών.

		Συγκέντρωση μετρονιδαζόλης ($\times 10^{-5}$ M)				Συγκέντρωση μετρονιδαζόλης ($\times 10^{-5}$ M)			
		M2	A2	A3	A4	M2	B4	B5	B6
Χρόνος (min)	0	3,82	3,82	3,80	3,82	3,82	3,80	3,81	3,81
	20	3,20	3,19	3,18	3,12	3,18	3,17	3,19	3,19
	40	2,67	2,66	2,66	2,69	2,66	2,64	2,66	2,65
	60	2,22	2,23	2,23	2,24	2,20	2,19	2,23	2,21

Σχόλια

Ο πίνακας ΙΔ.3.6. δείχνει τα αποτελέσματα από την παρακολούθηση της φωτοχημικής αποικοδόμησης διαλυμάτων μετρονιδαζόλης συγκέντρωσης $3,8 \times 10^{-5} \text{M}$. Η συγκέντρωση αυτή ανήκει στην περιοχή όπου η κινητική ακολουθεί πρωτοταξική πορεία.

Στο σχήμα ΙΔ.3.1. παρατίθενται οι σταθερές φωτοχημικής αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης $2,7 \times 10^{-3} \text{M}$ που προκύπτουν από διαλύματα με διαφορετική περιεχόμενη κυκλοδεξτρίνη.



Σχήμα ΙΔ.3.1. Οι σταθερές φωτοχημικής αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης $2,7 \times 10^{-3} \text{M}$ που προκύπτουν από διαλύματα με διαφορετική περιεχόμενη κυκλοδεξτρίνη (M) σκέτη μετρονιδαζόλη (A1) αCD 5,3 mg/mL (B1) HP-β-CD 4,2 mg/mL (B2) HP-β-CD 10,4 mg/mL (B3) HP-β-CD 76,3 mg/mL.

Παρατηρήσεις

Η φωτοχημική αποικοδόμηση της μετρονιδαζόλης δεν επηρεάζεται από την παρουσία της α-CD τόσο σε χαμηλές όσο και σε υψηλές συγκεντρώσεις.

Η παρουσία της HP-β-CD στα διαλύματα μετρονιδαζόλης χαμηλής συγκέντρωσης δεν αλλάζει την ταχύτητα της αποικοδόμησης. Όταν όμως η

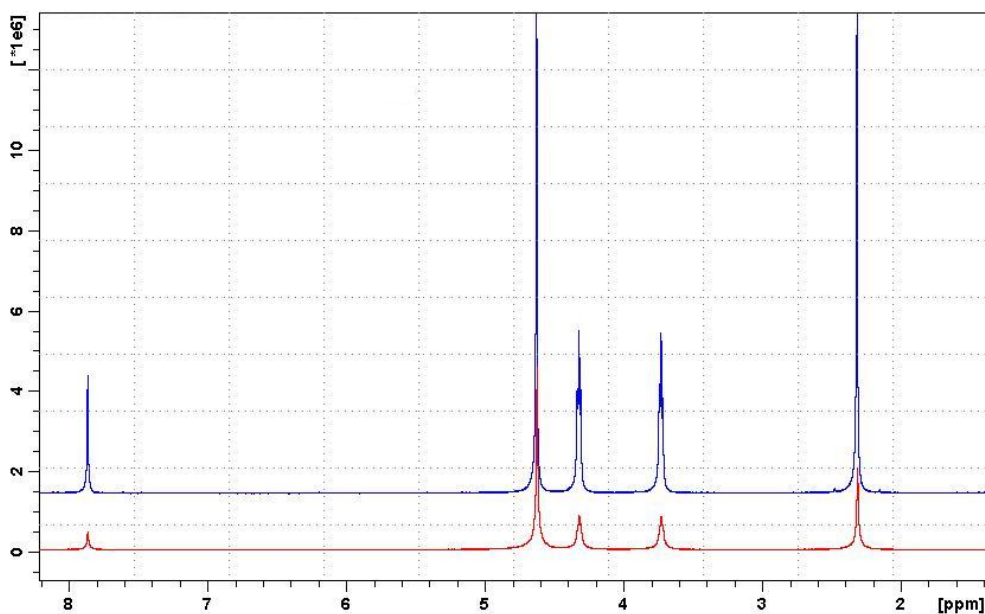
συγκέντρωση είναι μεγάλη (σχήμα ΙΔ.3.1), παρατηρείται πως η αύξηση της συγκέντρωσης της HP-β-CD επιταχύνει την φωτοχημική αποικοδόμηση της μετρονιδαζόλης.

ΙΔ.4. Φασματοσκοπία μετρονιδαζόλης

Η επιλογή της μετρονιδαζόλης για τη μελέτη της φωτοχημικής της αποικοδόμησης βασίζεται τόσο στην απλότητα του μορίου όσο και στην απουσία διαμοριακών αλληλεπιδράσεων που εξαρτώνται από τη συγκέντρωση του διαλύματος αυξάνουν τις παραμέτρους που επηρεάζουν τη φωτοχημική αποικοδόμηση. Ένδειξη της απουσίας των αλληλεπιδράσεων αυτών είναι η σταθερότητα του σήματος στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$. Θα επιβεβαιωθεί με σύντομο πρωτόκολλο η ύπαρξη ή μη αλληλεπιδράσεων που να εξαρτώνται από τη συγκέντρωση του μορίου.

Το μόριο είναι αρκετά απλό και η απόδοση των θωρακίσεων των πρωτονίων στο NMR είναι αρκετά εύκολη.

- Το μόνο αρωματικό πρωτόνιο του πενταμελή δακτυλίου εμφανίζεται στα 7,9 ppm ως μονή κορυφή.
- Το μεθύλιο του πενταμελή βρίσκεται στα 2,35 ppm και είναι κ εμφανίζει κ αυτό απλή κορυφή.
- Τα δυο αλειφατικά πρωτόνια που βρίσκονται κοντά στο οξυγόνο εμφανίζονται ως τριπλέτα στα 3,75 ppm ενώ τα δυο αλειφατικά πρωτόνια δίπλα από το άζωτο εμφανίζονται στα 4,35 ppm.



Σχήμα ΙΔ.4.1. $^1\text{H-NMR}$ φάσμα της μετρονιδαζόλης σε D_2O . 2 διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων (-) 20 M και (-) 3 M.

ΙΕ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΦΩΤΟΧΗΜΙΚΩΝ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΕΩΝ

Η παρακολούθηση της κινητικής μιας χημικής αντίδρασης έγκειται στην παρακολούθηση της αλλαγής της συγκέντρωσης ενός από τα κύρια συστατικά, είτε αντιδρώντων είτε παραγόμενων, σε συνάρτηση με τον χρόνο. Για μια αντίδραση της μορφής



η ταχύτητα της αντίδρασης $[dC/dt]$ θα δίνεται από την εξίσωση

$$-\frac{dC}{dt} = k \times [A]^a \times [B]^b \dots \quad \text{Εξίσωση ΙΕ.2}$$

με $[A]$ τη συγκέντρωση του συστατικού A και με το άθροισμα $a+b\dots$ να εκφράζει την τάξη της αντίδρασης.

Οι φωτοχημικές αποικοδομήσεις, όπως περιγράφηκαν στο κεφάλαιο Γ, περιλαμβάνουν την διέγερση ενός μορίου και ξεκινούν από τη διεγερμένη κατάσταση του, οπότε η ταχύτητά τους εξαρτάται κυρίως από 1 συστατικό^{147 147} και οι εξισώσεις ΙΕ.1 και ΙΕ.2 μπορούν να μετατραπούν στις ΙΕ.3 και ΙΕ.4



$$-\frac{dC}{dt} = k \times [A]^a \quad \text{Εξίσωση ΙΕ.4}$$

Η παρακολούθηση της φωτοχημικής αποικοδόμησης τόσο της καρβεδιλόλης όσο και της μετρονιδαζόλης πραγματοποιήθηκε διατηρώντας σταθερές όλες τις συνθήκες και παραμέτρους που επηρεάζουν το ρυθμό της αποικοδόμησης και την κινητική και μεταβάλλοντας την αρχική συγκέντρωση του μελετώμενου διαλύματος. Έχοντας τη γνώση των δεδομένων αυτών ήταν εύκολο να αξιολογηθεί στη φωτοχημική αποικοδόμηση η επίδραση της παρουσίας των εκδόχων.

Η κινητική του κάθε πειράματος αξιολογήθηκε ακολουθώντας έναν αρκετά γνωστό και αποδεκτό τρόπο εργασίας:

1. Παρακολούθηση της μεταβολής της συγκέντρωσης του αρχικού συστατικού σε συνάρτηση με τον χρόνο.

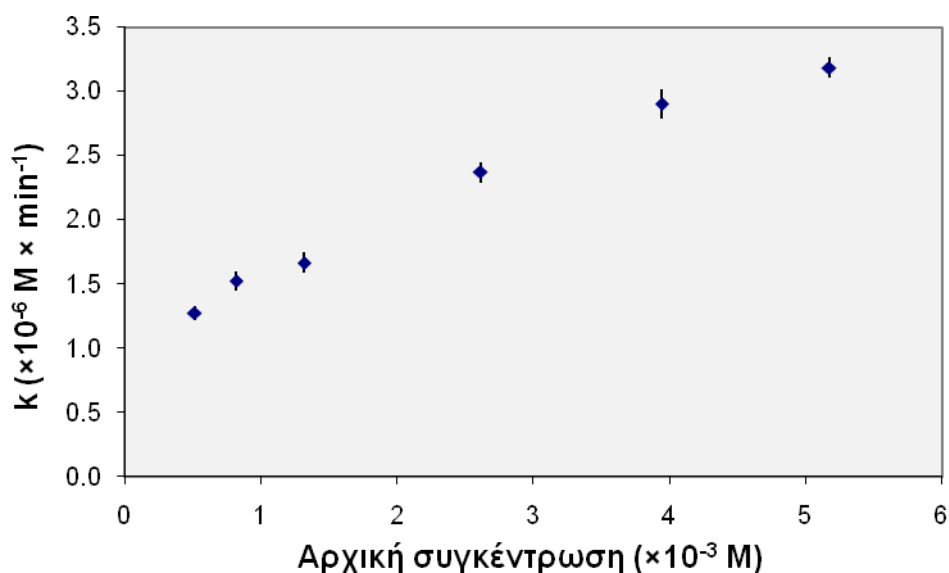
2. Σχεδιασμός του διαγράμματος απεικόνισης της μεταβολής της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με τον χρόνο.
3. Εκτίμηση της τάξης αντίδρασης σύμφωνα με το ποιο από τα μαθηματικά μοντέλα της εξίσωσης ΙΕ.4, μηδενοταξική ($\alpha=0$), πρωτοταξική ($\alpha=1$) ή δευτεροταξική ($\alpha=2$) εφαρμόζει καλύτερα στα δεδομένα.
4. Εξαγωγή της σταθεράς ταχύτητας k από την εκτιμώμενη εξίσωση ΙΕ.4.

Για την καρβεδιλόλη, της οποίας η φωτοχημική αποικοδόμηση ήταν αρκετά αργή, όλες οι κινητικές αξιολογήθηκαν ως μηδενοταξικές, με την ταχύτητα της αποικοδόμησης να αυξάνεται με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης. Έγινε δυνατό να συσχετιστεί η ταχύτητα με την αρχική συγκέντρωση, όπως παρουσιάστηκαν στο σχήμα ΙΑ.3.11. Ο φυσικός λογάριθμος της σταθεράς ταχύτητας των μηδενοταξικών αντιδράσεων παρουσίασε μια πολύ καλή γραμμική συσχέτιση με τον φυσικό λογάριθμο της αρχικής συγκέντρωσης ($R^2=0,995$). Η εξίσωση που προέκυψε και για το εύρος των συγκεντρώσεων που ελέχθησαν, επιτρέπει την πρόβλεψη της σταθεράς ταχύτητας της φωτοχημικής αποικοδόμησης μεθανολικών διαλυμάτων καρβεδιλόλης όταν είναι γνωστή η αρχική συγκέντρωση. Στην δυνατότητα αυτή στηρίχθηκε η μελέτη της επίδρασης των εκδόχων στην ταχύτητα της φωτοχημικής αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης. Διαπιστώθηκε πως τόσο η παρουσία του PVP όσο και της HP- β -CD επιταχύνουν την φωτοχημική αποικοδόμηση. Ιδιαίτερα το PVP παρατηρήθηκε να έχει συγκεκριμένη δυναμική στην επιτάχυνση και να μεγιστοποιείται η επίδρασή του όταν είναι σε περίσσεια, στις συνθήκες των πειραμάτων.

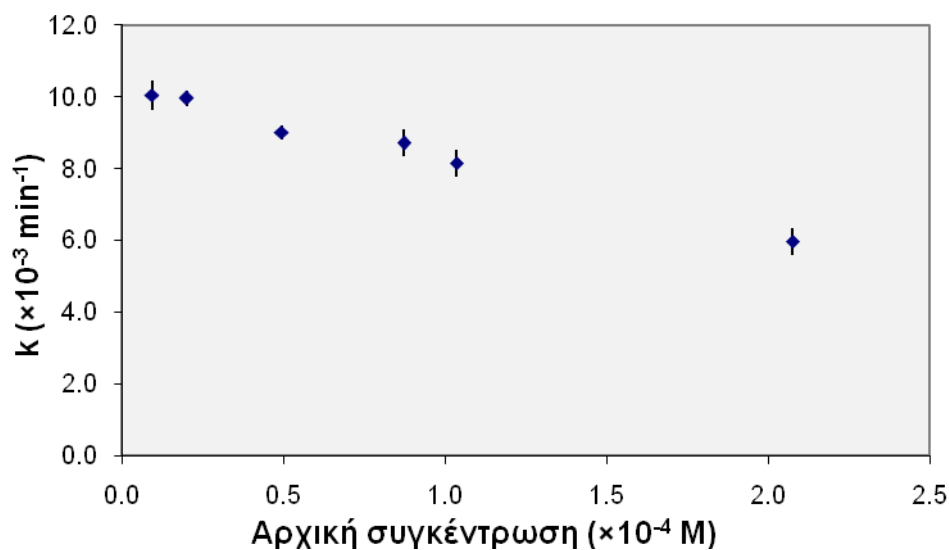
Από τις συνθήκες των πειραμάτων, διερευνήθηκε η επίδραση της μεταβολής του διαλύτη και διαπιστώθηκε πως η σύστασή του επηρεάζει σημαντικά την ταχύτητα της φωτοχημικής αποικοδόμησης. Παρατηρήθηκε αυξημένη αποικοδόμηση της καρβεδιλόλης σε υδατικό περιβάλλον, δεν διαπιστώθηκε όμως αναλογική σχέση με τη σύσταση του διαλύτη.

Στην περίπτωση της μετρονιδαζόλης και σύμφωνα με την γραφική απεικόνιση, στις μικρές συγκεντρώσεις εκτιμήθηκε πρωτοταξική κινητική και στις υψηλές μηδενοταξική κινητική. Η εκτίμηση της κινητικής δεν ήταν εύκολη

στα δείγματα με ενδιάμεσες αρχικές συγκεντρώσεις, όπου τόσο το γραμμικό όσο και το εκθετικό μοντέλο συσχετίζουν ικανοποιητικά τα δεδομένα. Η περιοχή της κάθε κινητικής αποδόθηκε γραφικά ξεχωριστά στα σχήματα ΙΕ.1α και ΙΕ.1β δίχως να εξαχθεί κάποιο μοντέλο.



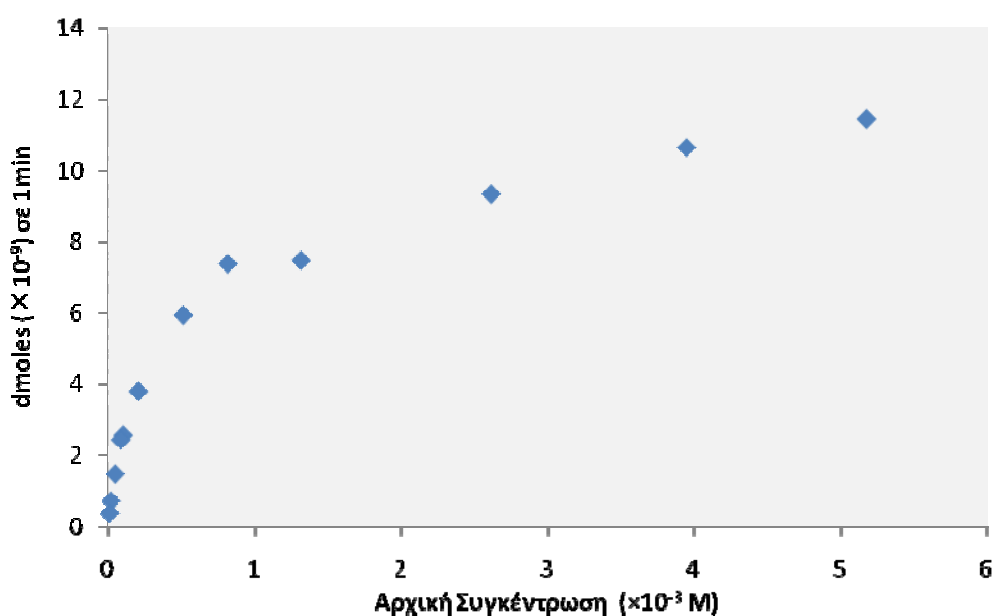
Σχήμα ΙΕ.1α: Διάγραμμα απεικόνισης των σταθερών ταχύτητας σε συνάρτηση με την αρχική συγκέντρωση των διαλυμάτων μετρονιδαζόλης, για τις περιπτώσεις που οι κινητικές χαρακτηρίστηκαν ως μηδενοταξικές



Σχήμα ΙΕ.1β. Διάγραμμα απεικόνισης των σταθερών ταχύτητας σε συνάρτηση με την αρχική συγκέντρωση των διαλυμάτων μετρονιδαζόλης, για τις περιπτώσεις που οι κινητικές χαρακτηρίστηκαν ως πρωτοταξικές

Η επίδραση της παρουσίας των εκδόχων στην ταχύτητα της φωτοχημικής αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης μελετήθηκε συγκρίνοντάς την με την ταχύτητα απουσία εκδόχου στις ίδιες συνθήκες. Η σύγκριση των τιμών έδειξε πως η HP-β-CD και το PVP κυρίως επιταχύνουν τη φωτοχημική αποικοδόμηση. Στις μικρές συγκεντρώσεις της μετρονιδαζόλης, σημειώθηκε η πιθανότητα προστατευτικής δράσης του PVP στη φωτοαποικοδόμηση του μορίου.

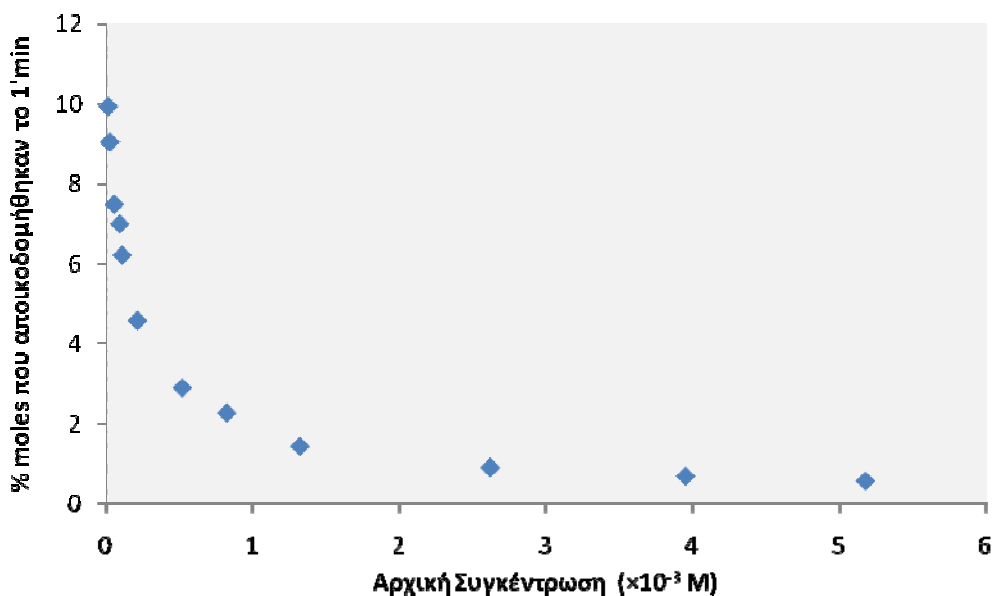
Διερευνήθηκε ένας τρόπος παρουσίασης των αποτελεσμάτων της μετρονιδαζόλης που να επιτρέπει τη σύγκριση όλων των πειραμάτων, ανεξάρτητα με την παρατηρούμενη κινητική. Η ταχύτητα της αντίδρασης εκφράζεται ως η μεταβολή της συγκέντρωσης ή των moles στη μονάδα του χρόνου. Στο σχήμα ΙΕ.2 παρουσιάζεται η μεταβολή αυτή ως προς την αρχική συγκέντρωση του δείγματος.



Σχήμα ΙΕ.2 Γραφική απεικόνιση των πειραματικών τιμών για τη μεταβολή των moles στο λεπτό στην φωτοχημική αποικοδόμηση της μετρονιδαζόλης σε συνάρτηση με την αρχική συγκέντρωση των διαλυμάτων.

Στο σχήμα ΙΕ.2 παρατηρείται πως ο αριθμός των mole μετρονιδαζόλης που φωτοαποικοδομούνται αυξάνεται με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης

του δείγματος. Το σχήμα όμως ΙΕ.3 τα mole έχουν μετατραπεί σε % των αρχικών mole και φαίνεται πως το % της αρχικής ποσότητας που αποικοδομείται μειώνεται με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης, παρόλο που ο καθαρός αριθμός των μορίων αυξάνεται.



Σχήμα ΙΕ.3. Γραφική απεικόνιση των πειραματικών τιμών για το % μεταβολής των mole στο λεπτό της φωτοχημικής αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης σε συνάρτηση με την αρχική συγκέντρωση των διαλυμάτων.

Αναφέρθηκε για τις φωτοχημικές αντιδράσεις πως σημαντικές παράμετροι που επηρεάζουν την έκταση του φαινομένου (κεφάλαιο Γ) είναι το φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου και η αρχή απείρου πάχους (inner filter effect και infinite thickness law). Το φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου αφορά στην μείωση της απόδοσης της αντίδρασης λόγω της παρουσίας ουσιών και πιθανών προσμίξεων στο δείγμα. Στα συγκεκριμένα πειράματα το φαινόμενο παρατηρείται στις χαμηλές αρχικές συγκεντρώσεις μετρονιδαζόλης, όπου μικρή μεταβολή της αρχικής συγκέντρωσης προκαλεί μεγάλη μεταβολή του ποσοστού της δραστηκής που αποικοδομείται.

Η αρχή απείρου πάχους αφορά συνθήκες πυκνότητας του διαλύματος που προσομοιάζουν τα στερεά, όπου η επίδραση της ακτινοβολίας περιορίζεται στην επιφάνειά τους. Η επιλογή της μετρονιδαζόλης για την μελέτη της φωτοχημικής αποικοδόμησης έγινε βάση της έλλειψης μοριακών αλληλεπιδράσεων που επηρεάζονται από τη συγκέντρωση του διαλύματος. Η μικρή % αναλογία της

μετρονιδαζόλης που διασπάται στην περίπτωση των διαλυμάτων υψηλής αρχικής συγκέντρωσης αποδίδεται στην υψηλή πυκνότητα του διαλύματος για τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες. Μικρή μεταβολή της αρχικής συγκέντρωσης δεν μεταβάλλει σημαντικά το % της μετρονιδαζόλης που θα αποικοδομηθεί, καθιστώντας σταθερότερα τα υψηλής συγκέντρωσης φαρμακευτικά διαλύματα

Η προσπάθεια για ενοποίηση των αποτελεσμάτων της μετρονιδαζόλης σε ένα διάγραμμα, μας επιστρέφει στην εξίσωση ΙΕ.4 και μας δίνει την δυνατότητα να δούμε την φωτοχημική αποικοδόμηση ως φαινόμενο συνεχές ως προς την συγκέντρωση. Η ΙΕ.4 λογαριθμείται:

$$-\frac{dC}{dt} = k \times [A]^a \Rightarrow \ln \left[-\frac{dC}{dt} \right] = \ln[k \times [A]^a]$$

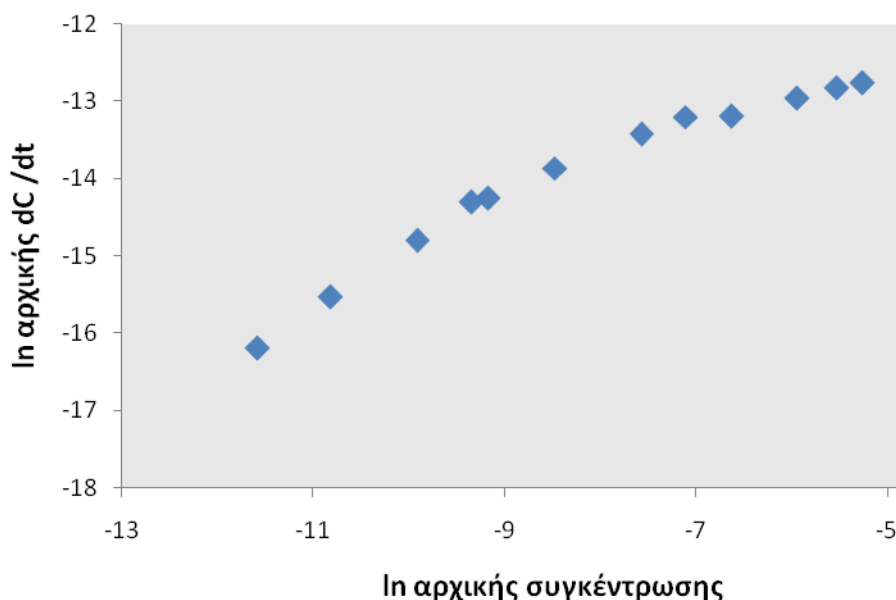
$$\Rightarrow \ln \left[-\frac{dC}{dt} \right] = \ln k + a \ln[A] \quad \text{Εξίσωση ΙΕ.5}$$

Μεταβάλλουμε με τον τρόπο αυτό την συσχέτιση με την αρχική συγκέντρωση και αντί της υπολογιζόμενης σταθεράς ταχύτητας γίνεται μια προσπάθεια να χρησιμοποιηθεί η ταχύτητα μεταβολής της συγκέντρωσης στο πρώτο λεπτό. Υπολογίζεται από τα γραφήματα και από τα πρώτα δεδομένα της κάθε περίπτωσης, η μεταβολή της αρχικής συγκέντρωσης στη μονάδα του χρόνου, που για τα πειράματα της μετρονιδαζόλης είναι το 1 min. Ο αντίστοιχος πίνακας του κεφαλαίου ΙΔ μετατρέπεται στον πίνακα ΙΕ.1.

Πίνακας ΙΕ.1. Συγκεντρωτικός πίνακας όλων των αρχικών ταχυτήτων και των σταθερών ταχύτητας που υπολογίστηκαν σε κάθε αρχική συγκέντρωση διαλύματος μετρονιδαζόλης.

	Αρχική Συγκέντρωση (M)	dC/dt του 1 ^{ου} λεπτού
1	$5,17 \times 10^{-3}$	$2,87 \times 10^{-6}$
2	$3,95 \times 10^{-3}$	$2,67 \times 10^{-6}$
3	$2,61 \times 10^{-3}$	$2,34 \times 10^{-6}$
4	$1,32 \times 10^{-3}$	$1,87 \times 10^{-6}$
5	$8,17 \times 10^{-4}$	$1,85 \times 10^{-6}$
6	$5,13 \times 10^{-4}$	$1,48 \times 10^{-6}$
7	$2,08 \times 10^{-4}$	$9,49 \times 10^{-7}$
8	$1,04 \times 10^{-4}$	$6,44 \times 10^{-7}$
9	$8,72 \times 10^{-5}$	$6,10 \times 10^{-7}$
10	$4,95 \times 10^{-5}$	$3,71 \times 10^{-7}$
11	$2,00 \times 10^{-5}$	$1,81 \times 10^{-7}$
12	$9,36 \times 10^{-6}$	$9,31 \times 10^{-8}$

Το διάγραμμα ΙΕ.4 περιλαμβάνει τους φυσικούς λογαρίθμους του πίνακα ΙΕ.1 και οπτικοποιεί την μεταβολή της ταχύτητας της αντίδρασης ως προς την αρχική συγκέντρωση.

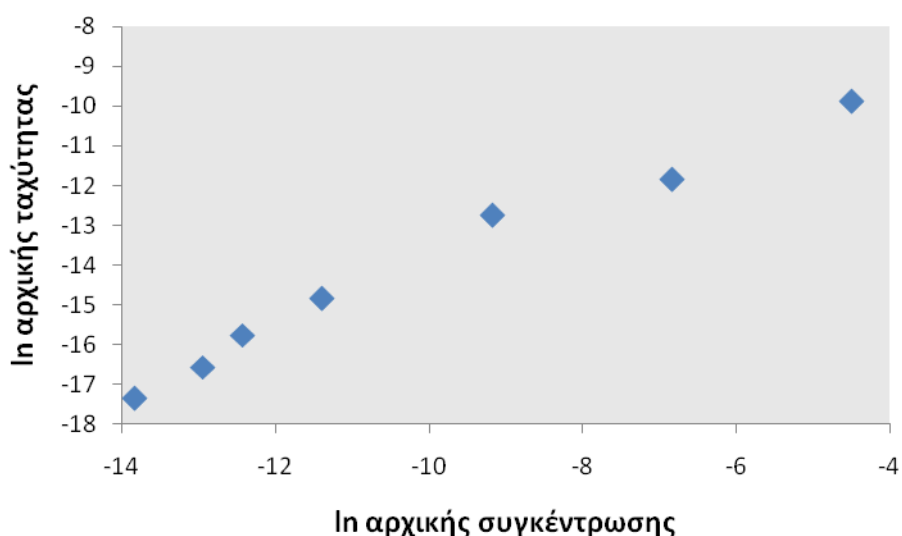


Σχήμα ΙΕ.4. Γραφική απεικόνιση των πειραματικών τιμών για τη αρχική ταχύτητα της φωτοχημικής αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης σε συνάρτηση με την αρχική συγκέντρωση του διαλύματος έχοντας λογαριθμίσει όλες τις τιμές.

Παρατηρείται στο σχήμα ΙΕ.4 η συνέχεια της συσχέτισης της αρχικής ταχύτητας με τον λογάριθμο της αρχικής συγκέντρωσης. Δεν είναι η αναμενόμενη ευθεία σύμφωνα με την εξίσωση ΙΕ.6 αλλά ούτε φαίνεται να υπάρχει απλό μαθηματικό μοντέλο που να συσχετίζει αποτελεσματικά τα σημεία. Τα 4 πρώτα σημεία μπορούν να θεωρηθούν ευθεία με $R^2=0,999$ και σε αντιστοιχία με την εξίσωση ΙΕ.5 η κλίση της ευθείας, 0,835, είναι η φαινομενική τάξη της αντίδρασης, αρκετά κοντά στη μονάδα και συσχετίζεται καλά με τον χαρακτηρισμό «πρωτοταξική» που είχαν αξιολογηθεί τα συγκεκριμένα πειράματα. Σε ευθεία μπορούν να αντιστοιχηθούν και τα 4 τελευταία σημεία με $R^2=0,999$ και από την αντίστοιχη εξίσωση η φαινομενική τάξη της αντίδρασης είναι 0,315, τιμή πολύ μικρή που ερμηνεύει και την αξιολόγηση των συγκεκριμένων κινητικών ως «μηδενοταξικές» κατά την αρχική τους επεξεργασία.

Στα ενδιάμεσα σημεία των δυο ευθειών οι κινητικές ήταν δύσκολο να αξιολογηθούν ως καθαρές μηδενοταξικές ή πρωτοταξικές από την αρχική επεξεργασία. Οι κινητικές αυτές είναι μικτές κινητικές.

Επιλέγεται να εφαρμοσθεί η ίδια επεξεργασία και στα αποτελέσματα της καρβεδιλόλης ανεξάρτητα με το γεγονός πως όλες οι κινητικές είχαν αξιολογηθεί ως μηδενοταξικές. Προκύπτει το σχήμα ΙΕ.5, σχεδόν ίδιο με το αρχικό σχήμα ΙΑ.3.11.



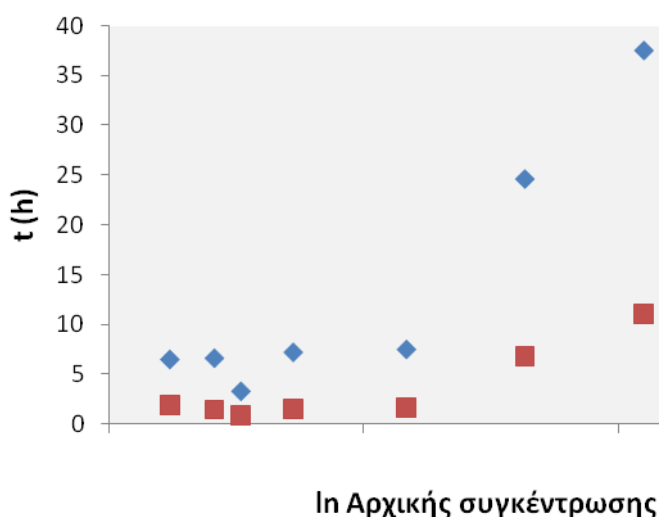
Σχήμα ΙΕ.5. Γραφική απεικόνιση των πειραματικών τιμών για την αρχική ταχύτητα της φωτοχημικής αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης σε συνάρτηση με την αρχική συγκέντρωση του μεθανολικού διαλύματος έχοντας λογαριθμίσει όλες τις τιμές.

Το διάγραμμα του σχήματος ΙΕ.5 για την καρβεδιλόλη μπορεί να ερμηνευθεί με τη γνώση του διαγράμματος της μετρονιδαζόλης. Τα σημεία είναι πολύ λιγότερα για να εξαχθεί με βεβαιότητα η πληροφορία της ευθείας στις υψηλές συγκεντρώσεις ενώ όσο αφορά τις χαμηλές αρχικές συγκεντρώσεις, η σειρά των συμπληρωματικών πειραμάτων δείχνει μια περιοχή μεγαλύτερης κλίσης από αυτή των υψηλότερων συγκεντρώσεων. Τα 4 πρώτα σημεία του διαγράμματος, συγκεντρώσεις από 10^{-6} έως 10^{-5} M δίνουν ευθεία με $R^2=0,99$ και κλίση 1,06. Πρέπει να σημειωθεί πως στις υψηλές συγκεντρώσεις της καρβεδιλόλης, 10^{-4} - 10^{-2} M, έχουμε καταγράψει την ύπαρξη μοριακών

αλληλεπιδράσεων που έχουν τη δυνατότητα να επηρεάσουν την ταχύτητα της φωτοχημικής αποικοδόμησης.

Επεξεργασία αποτελεσμάτων φωτοχημικών αποικοδομήσεων ως προς $t_{95\%}$ και $t_{80\%}$

Η επεξεργασία και η σύγκριση των αποτελεσμάτων της καρβεδιλόλης μεταξύ των πειραμάτων επιλέγεται να γίνει με τους χρόνους στους οποίους η αρχική συγκέντρωση έχει μειωθεί κατά 5% και 20%. Υπολογίζεται από τα δεδομένα του κάθε πειράματος η $t_{95\%}$ και $t_{80\%}$ και παρουσιάζεται σε συνάρτηση με τον λογάριθμο της αρχικής συγκέντρωσης.

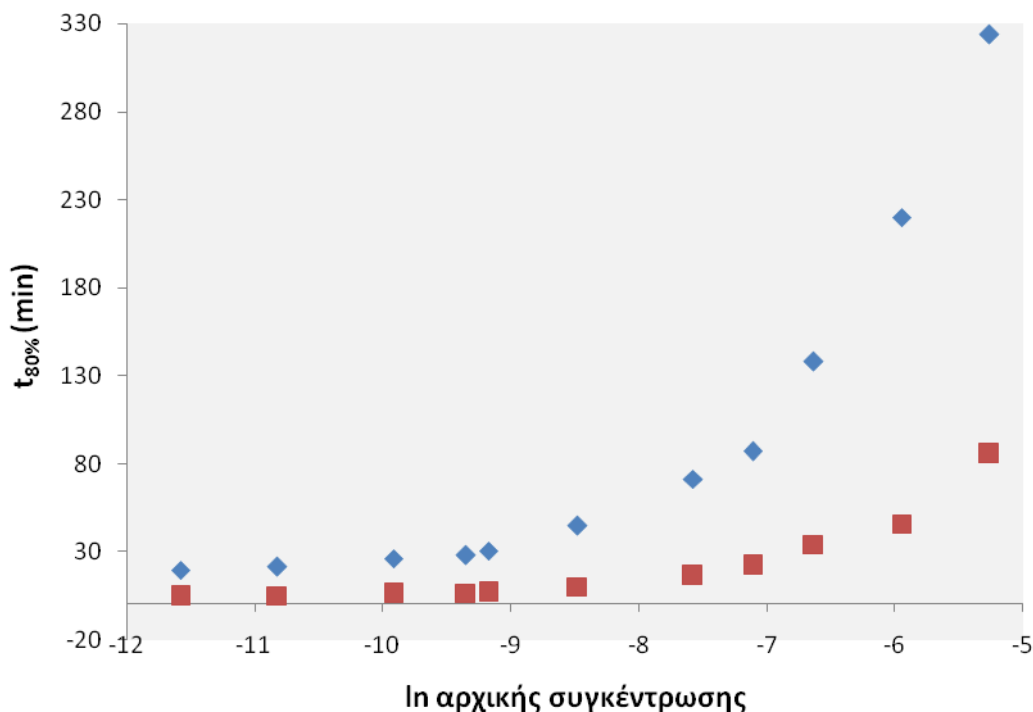


Σχήμα ΙΕ.6. Γραφική απεικόνιση των πειραματικών τιμών για τον χρόνο $t_{95\%}$ (■) και $t_{80\%}$ (◆) της φωτοχημικής αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης σε συνάρτηση με τον λογάριθμο της αρχικής συγκέντρωσης των μεθανολικών διαλυμάτων.

Παρατηρείται πως στις χαμηλές συγκεντρώσεις η τιμή $t_{80\%}$ έχει διακυμάνσεις και μια τάση για αύξηση ενώ στις 2 ψηλότερες συγκεντρώσεις έχει αυξηθεί σημαντικά. Στις μικρές συγκεντρώσεις, οι παραπλήσιες τιμές $t_{80\%}$ είναι ένδειξη πρωτοταξικής [$t_{80\%} = (\ln 80\%) / k_f$]. Ακριβώς το ίδιο παρατηρείται και στο διάγραμμα του $t_{95\%}$.

Η σύνθετη φύση της φωτοχημικής αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης επιβεβαιώνεται και με τη χρήση των τιμών $t_{95\%}$ ή $t_{80\%}$.

Το αντίστοιχο διάγραμμα από τα πειράματα της μετρονιδαζόλης παρουσιάζεται στο σχήμα ΙΕ.7.



Σχήμα ΙΕ.7. Γραφική απεικόνιση των πειραματικών τιμών για τον χρόνο $t_{95\%}$ (■) και $t_{80\%}$ (◆) της φωτοχημικής αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης σε συνάρτηση με τον λογάριθμο της αρχικής συγκέντρωσης των διαλυμάτων.

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα ΙΕ.7 και στη μετρονιδαζόλη, στις χαμηλές συγκεντρώσεις που η κινητική της φωτοχημικής αποικοδόμησης έχει χαρακτηριστεί ως πρωτοταξική, ο χρόνος $t_{80\%}$ μεταβάλλεται πολύ λιγότερο με την αύξηση της συγκέντρωσης από ότι γίνεται στις υψηλές συγκεντρώσεις και στις μηδενοταξικές κινητικές.

Συζήτηση

Η παράμετρος γύρω από την οποία κινήθηκαν όλες οι προσπάθειες αξιολόγησης, είναι η αρχική συγκέντρωση των μελετώμενων διαλυμάτων. Η έκφραση «αρχική συγκέντρωση» αφορά τη γνωστή συγκέντρωση από την οποία ξεκινά και παρακολουθείται η φωτοχημική αποικοδόμηση και θα μπορούσε να είναι η συγκέντρωση της κάθε χρονικής στιγμής εάν το διάλυμα ήταν καθαρό από προϊόντα αποικοδόμησης. Τόσο η φυσική παρουσία τους όσο και οι πιθανές χημικές ιδιότητές τους μπορούν να παρεμποδίσουν ή να επιταχύνουν την εξέλιξη του φαινομένου μειώνοντας τη μελετώμενη συμβολή της συγκέντρωσης στο φαινόμενο. Καταγράφοντας την επίδραση της «αρχικής συγκέντρωσης» στην «αρχική ταχύτητα» της φωτοχημικής αποικοδόμησης αποκαλύπτεται η συνέχεια που έχει γραφικά η συσχέτισή τους και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη της σταθερότητας ενός διαλύματος όταν βρεθεί στις αντίστοιχες συνθήκες.

Γνωρίζοντας την ταχύτητα της φωτοχημικής αποικοδόμησης που αντιστοιχεί σε συγκεκριμένη συγκέντρωση μπορεί να αξιολογηθεί η επίδραση της παρουσίας των εκδόχων ή άλλων παραγόντων, όπως των προϊόντων φωτοχημικής αποικοδόμησης, στην εξέλιξη του φαινομένου.

Σε κάθε περίπτωση αξιολόγησης, αναλόγως της παραμέτρου που επιλέχθηκε να συσχετιστεί με την αρχική συγκέντρωση του δραστικού μορίου, η γνώση που λαμβάνεται είναι σημαντική. Για την πρόβλεψη σταθερότητας ενός φαρμακευτικού σκευάσματος, η εργασία και η σύγκριση $t_{95\%}$ (ή $t_{90\%}$) ή η καταγραφή του % που αποικοδομείται στη μονάδα του χρόνου είναι οι πιο συνηθισμένες.

Η παρακολούθηση των φωτοχημικών αποικοδομήσεων με στόχο την πρόγνωση απαιτεί καλή γνώση των παραμέτρων που την επηρεάζουν και ο έλεγχος των συνθηκών για επαναλήψιμο τρόπο εργασίας. Παρόλες τις παραδοχές που μερικές φορές γίνονται, η δυνατότητα αξιολόγησης των αποτελεσμάτων με διαφορετικούς τρόπους που δίνουν παραπλήσια αποτελέσματα, επιβεβαιώνει τη σταθερότητα του πρωτοκόλλου εργασίας και τη δυνατότητα διερεύνησης, μεθοδικά, των παραμέτρων που αφορούν την επίδραση του φωτός σε φαρμακευτικά μόρια και σκευάσματα.

ΙΣΤ. ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

ΙΣΤ.1. Αναλυτικές τεχνικές -Χρωματογραφία

ΙΣΤ.1.1. Εισαγωγή

Η υγρή χρωματογραφία είναι μια τεχνική συνεχούς διφασικής κατανομής κατ' αντιστροφή, βασίζεται δηλαδή στην κατανομή των προς διαχωρισμό ουσιών εντός δύο φάσεων, όπου η μία φάση διατηρείται ακίνητη (στατική φάση) ενώ η δεύτερη βρίσκεται υπό συνεχή ροή (κινητή φάση).

Το υλικό της στήλης και η σύσταση της κινητής φάσης είναι που καθορίζουν το είδος και την επιτυχία του διαχωρισμού. Έτσι μπορούμε να έχουμε, ανάλογα με το φαινόμενο που λαμβάνει χώρα, χρωματογραφία προσρόφησης, κατανομής, ανταλλαγής ιόντων, ζεύγους ιόντων, ιοντική χρωματογραφία, χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους, συγγένειας ή χειρόμορφη χρωματογραφία. Η σπουδαιότητα της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) στηρίζεται στην παραπάνω ποικιλία διαχωρισμών που πραγματοποιούνται με μικρή προετοιμασία.

Αν και η καρδιά της χρωματογραφίας είναι η στήλη και το είδος της αλληλεπίδρασης της με την κινητή φάση, σημαντικός είναι και ο ανιχνευτής που χρησιμοποιείται στο τέλος της χρωματογραφικής διάταξης για την παρακολούθηση των εκλουομένων ουσιών.

ΙΣΤ.1.2. Στατική Φάση

Τις χρωματογραφικές στήλες μπορούμε να τις χωρίσουμε στις αναλυτικές, με τυπική διάμετρο 2-6 mm και μήκος 10-30 cm για υλικό με μικροπορώδη σωματίδια ή 50-100 cm για πορώδη σωματίδια, και στις παρασκευαστικές, με διάμετρο μεγαλύτερη των 6mm και μήκος 25-100 cm. Η χωρητικότητα της στήλης σε δείγμα είναι ανάλογη του τετραγώνου της διαμέτρου της και η συμπεριφορά της εξαρτάται κατά κύριο λόγο από το μέγεθος των σωματιδίων πλήρωσης καθώς και από το μήκος της. Η πλειονότητα των πληρωτικών υλικών που χρησιμοποιούνται για αναλυτικές εφαρμογές αποτελούνται από σφαιρικά σωματίδια και όχι ακανόνιστα διότι αυξάνουν την απόδοση, τη σταθερότητα και την χαμηλή πίεση της στήλης.

Το οξείδιο του πυριτίου είναι υλικό μεγάλης πολικότητας που στην επιφάνειά του φέρει ελεύθερες ομάδες σιλανόλης και γέφυρες σιλοεξανίου και πρόκειται για το βασικό υλικό πλήρωσεως των χρωματογραφικών στηλών για τις περισσότερες εφαρμογές HPLC. Εκτός από την υψηλή φυσική αντοχή που παρουσιάζει ως ανόργανο πληρωτικό υλικό, παρέχει κατάλληλη επιφάνεια πάνω στην οποία προσδένεται πληθώρα υποκαταστατών χρησιμοποιώντας την πολύ γνωστή τεχνολογία της σιλανοποίησης. Με την τεχνική της τροποποίησης της επιφάνειας του διοξειδίου του πυριτίου παρασκευάζονται πληρωτικά υλικά κατάλληλα για όλες τις προαναφερθείσες χρωματογραφίες και είναι συμβατά με μεγάλη ποικιλία πολικών και μη πολικών διαλυτών. Αδυναμία τους είναι η μειωμένη σταθερότητά τους σε υδατικές αλκαλικές κινητές φάσεις. Γενικά ενδείκνυται η χρήση πληρωτικών υλικών που βασίζονται στο SiO₂ στην περιοχή pH 2 έως 8, διότι ενώ σε όλο το εύρος του pH η διασυνδεδεμένη φάση είναι σταθερή, το βασικό πληρωτικό υλικό διαλύεται στις μεγάλες τιμές.

Στο βασικό πληρωτικό υλικό, διοξείδιο του πυριτίου, μπορούν να συνδεθούν διάφορες χαρακτηριστικές ομάδες ή και ολόκληρες αλυσίδες, η συμπεριφορά των οποίων καθορίζει και το είδος του διαχωρισμού που λαμβάνει χώρα στη στατική φάση. Όσο μεγαλύτερη είναι η ανθρακική αλυσίδα των υποκαταστατών, τόσο πιο δύσκολα μπορεί να αλληλεπιδράσει η κινητή φάση αλλά και οι αναλυόμενες ουσίες με τα οξυγόνα του πυριτίου ενώ ταυτόχρονα καθιστά τη στατική φάση αρκετά πιο άπολη κατά την ανάλυση.

Οι C18 στήλες αποτελούνται από χημικά συνδεδεμένη υέλη πυριτίου που φέρει αλειφατικές αλυσίδες με 18 άτομα άνθρακα στη θέση των πολικών -OH ομάδων της. Είναι εξαιρετικά μη πολική στατική φάση και έχει τις περισσότερες εφαρμογές. Οι ελεύθερες υδροξυλομάδες της επιφάνειας μπορούν να συμμετέχουν σε χρωματογραφικούς διαχωρισμούς κανονικής φάσης ή να αντικαθίστανται σε κάποιο βαθμό από υδρόφοβες αλυσίδες και να συμμετέχουν έτσι σε χρωματογραφίες αντιστρόφου φάσης. Τεχνικές που εξασφαλίζουν την προστασία της βάσης του υλικού πλήρωσης ποικίλουν από την αντικατάσταση των υδροξυλομάδων με υδρόφοβες ομάδες, μεθύλια ή και -Si(CH₃)₃, την παρουσία ογκωδών ομάδων στη βάση των αλυσίδων όπως οι C18, αλλά και από διαφόρους συνδυασμούς των παραπάνω.

Μια από τις εξελικτικές μορφές των C18 στηλών, που να αντιμετωπίζει την αστάθεια του βασικού πληρωτικού υλικού, είναι οι στήλες XTerra. Το υλικό

πλήρωσης των XTerra στηλών συνδυάζει την υψηλή απόδοση και την μηχανική δύναμη του οξειδίου του πυριτίου με την αντοχή σε ακραίες τιμές pH των πολυμερών. Στην υβριδική τεχνολογία σχηματισμού σωματιδίων (hybrid particle technology), που ακολουθείται από τη WATERS για την κατασκευή του υλικού πλήρωσης των στηλών αυτών, μια στις τρεις σιλανόλες έχει αντικατασταθεί κατά τη σύνθεση από μια μεθυλομάδα. Αυτές οι μεθυλομάδες είναι ομογενώς κατανεμημένες στην επιφάνεια των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης επιτρέποντας την χρήση του σε pH από 1 έως 12.

Στη χρωματογραφία κανονικής φάσης η στατική φάση είναι πολικότερη της κινητής φάση ενώ στην περίπτωση της αντιστρόφου φάσης τον πολικό χαρακτήρα έχει η κινητή φάση. Για την ανάπτυξη και εφαρμογή μιας χρωματογραφικής μεθόδου, πρέπει να είναι γνωστά κάποια στοιχεία σχετικά με την συμπεριφορά του δείγματος και των αναλυόμενων ουσιών, διαφορετικά η επιλογή της στήλης γίνεται με βάση το διαλύτη στον οποίο έχει διαλυτοποιηθεί το δείγμα.

Ο διαχωρισμός των εκλουόμενων ουσιών βασίζεται τόσο στην διαφορετική κατανομή τους μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης όσο και στην διαφορετική τους προσρόφηση στην στατική φάση. Λόγω της φύσης της χρωματογραφίας αντιστρόφου φάσης, μεγαλύτερους χρόνους ανάσχεσης έχουν τα μη πολικά συστατικά. Στις περιπτώσεις παρόμοιας πολικότητας, ο χρόνος συγκράτησης αυξάνει με το μέγεθος του μορίου.

ΙΣΤ.1.3. Κινητή Φάση

Αρχικά για τους διαλύτες HPLC είναι πολύ σημαντική η υψηλή, φασματοσκοπική καθαρότητα των διαλυτών, να είναι ελεύθεροι σωματιδίων, ώστε να μην παρεμβαίνουν στην ανίχνευση των αναλυόμενων ουσιών υπολείμματα ή άλλα στοιχεία του διαλύτη. Επίσης θα πρέπει να είναι διηθημένοι και απαερωμένοι διότι η παρουσία φυσαλίδων αέρα στα συστήματα του χρωματογράφου εμποδίζει αρχικά την ομαλή και ομοιόμορφη ροή της κινητής φάσης και στη συνέχεια το σήμα του ανιχνευτή. Αυτονόητο για τους επιλεγόμενους διαλύτες είναι η συμβατότητά τους με τα συστατικά του δείγματος, να είναι καλή η διαλυτοποίησή τους και να μην αντιδρούν μεταξύ

τους. Σε βιομηχανικές μονάδες, μια ακόμα σημαντική παράμετρος είναι το χαμηλό κόστος τους.

Χαρακτηριστικά των διαλυτών είναι η εκλουστική τους ικανότητα και η εκλουστική τους εκλεκτικότητα, πόσο εύκολα μπορούν να συμπαρασύρουν τις αναλυόμενες ουσίες και πόσο αυτή τους η ιδιότητα διαφοροποιείται από τη φύση των ουσιών αυτών. Καθότι ο διαχωρισμός των ουσιών μέσα στις χρωματογραφικές στήλες πέραν της πολικότητας οφείλεται συχνά και στην προσρόφηση τους, σημαντικά χαρακτηριστικά των διαλυτών είναι η εκλεκτικότητα προσρόφησης και η πολικότητα τους, ενώ η σύγχρονη χρήση δυο διαφορετικών διαλυτών σε μίγμα καθιστά την αναμιξιμότητά τους μια ακόμα παράμετρο επιλογής.

Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία κατατάσσονται σε εκλουστικές σειρές με βάση κάποιο από τα προηγούμενα χαρακτηριστικά τους. Οι σειρές αυτές δεν είναι ίδιες σε κάθε περίπτωση διότι μπορεί μεταξύ δυο διαλυτών ο ένας να είναι πιο πολικός αλλά ο δεύτερος να εκλούει γρηγορότερα τις πολικές ουσίες σε συγκεκριμένη στατική φάση λόγω διαφορετικής προσρόφησης του σε αυτήν.

Αν και οι πρώτες μέθοδοι της χρωματογραφίας αποτελούσαν εφαρμογές της κανονικής φάσης, οι περισσότερες μέθοδοι πλέον αφορούν διαχωρισμό με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι πολικοί διαλύτες, ή μίγματά τους, με κύριο εκπρόσωπο το νερό ή μίγματα με νερό. Το νερό, χρωματογραφικής πάντα καθαρότητας, δεν είναι τοξικό, υπάρχει σε αφθονία σε σχέση με τους υπολοίπους και αποτελεί τον καλύτερα μελετημένο φυσικά και χημικά διαλύτη, παράμετρος που είναι αρκετά σημαντική στην πρόβλεψη και ερμηνεία των φαινομένων διαχωρισμού. Η εκλουστική δράση του νερού μπορεί να ρυθμιστεί από την ιονική ισχύ του καθώς και από την ανάμιξή του με άλλους διαλύτες. Οι παράμετροι αυτοί τον έχουν καθιερώσει ως τον βασικότερο διαλύτη στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης.

Τέλος οι διαλύτες που επιλέγονται για την χρωματογραφική ανάλυση πρέπει να είναι συμβατοί και με τον ανιχνευτή του συστήματος.

ΙΣΤ.1.4. Ανιχνευτής

Ο ανιχνευτής αποτελεί απαραίτητο εξάρτημα ενός χρωματογραφικού συστήματος αν και δεν συμβάλλει στον διαχωρισμό. Πρόκειται για το κομμάτι

που επιτρέπει την παρατήρηση των αποτελεσμάτων του όποιου διαχωρισμού επιτυγχάνεται με τη στατική και την κινητή φάση.

Ο ιδανικός ανιχνευτής για την υγρή χρωματογραφία πρέπει να είναι ευαίσθητος στη συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας, να έχει μικρό θόρυβο και μικρή ολίσθηση του σήματος, μεγάλη γραμμική περιοχή, μικρό όγκο κυψελίδας ανίχνευσης, μικρό κόστος και να είναι εύχρηστος.

Συνήθως για την ανίχνευση των εκκλουομένων ουσιών χρησιμοποιούνται φασματοσκοπικές τεχνικές, όπως ο ανιχνευτής υπερύθρου (IR), ο φθορισμομετρικός ανιχνευτής, και, σε μεμονωμένες πειραματικές περιπτώσεις NMR. Κυριότεροι όμως εκπρόσωποι είναι ο ανιχνευτής απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-vis) και ο ανιχνευτής μάζας. Εξέλιξη των ανιχνευτών UV-vis είναι οι ανιχνευτές σειράς διόδων που επιτρέπουν την συνεχή καταγραφή του φάσματος του εκλούσματος της στήλης (Diode Array Detectors) και την παράλληλη παρακολούθηση πολλών τιμών μήκους κύματος. Η χρήση UV-vis ανιχνευτή περιορίζει τη χρήση κινητής φάσης, διότι είναι απαραίτητο αυτή να μην έχει σημαντική απορρόφηση στην περιοχή του φάσματος που απορροφούν οι αναλυόμενες ουσίες.

Οι ανιχνευτές UV-vis έχουν αρχίσει να αντικαθιστούνται με τους ανιχνευτές μάζας. Έχουν μεγαλύτερο κόστος σαν συσκευές αλλά βελτιώνουν κατά πολύ την εκλεκτικότητα της χρωματογραφίας επιτρέποντας την παρακολούθηση διαφορετικών συνεκλουομένων ουσιών, ενώ παράλληλα μειώνουν κατά πολύ τα όρια ανίχνευσης. Η βασικότερη προϋπόθεση μιας μεθόδου για τη χρήση του ανιχνευτή μάζας είναι η πτητικότητα της κινητής φάσης. Οι τιμές μαζών που δίνει ο ανιχνευτής προέρχονται από αέρια σωματίδια, φορτισμένα καταλλήλως και για το λόγο αυτό η μετατροπή των εισαγόμενων στον ανιχνευτή ποσοτήτων σε αέρια φάση είναι απαραίτητη.

Άλλοι ανιχνευτές με μικρότερη έκταση εφαρμογών είναι οι ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές, οι ραδιενεργοί, ο ανιχνευτής δείκτη διάθλασης, ο ανιχνευτής σκέδασης φωτός, ο αγωγιμομετρικός ανιχνευτής.

ΙΣΤ.2. Καρβεδιλόλη -Αναλυτικές τεχνικές προσδιορισμού

Στην βιβλιογραφία αναφέρονται αρκετές τεχνικές προσδιορισμού της καρβεδιλόλης, οι περισσότερες σε βιολογικά υγρά με σκοπό την εκτέλεση τοξικολογικών και φαρμακοκινητικών μελετών και κάποιες από αυτές αναφέρονται στον πίνακα ΙΣΤ.2.1. Η χρήση όμως βιολογικών δειγμάτων προαπαιτεί απομόνωση των μελετώμενων ουσιών σε καθαρή μορφή καθώς και σε κάποιες περιπτώσεις, όπου πραγματοποιείται μελέτη και σύγκριση των δυο εναντιομερών της καρβεδιλόλης, τον διαχωρισμό τους.

Πίνακας ΙΣΤ.2.1 : Αναλυτικές τεχνικές στη βιβλιογραφία για τον προσδιορισμό της καρβεδιλόλης

Βιβλιογραφία		
117	Capillary Electr.	Cap. Elect. με laser induced ανιχνευτή
118		Cap. Elect. με την κάθοδο σε UV ανιχνευτή και στα 200 nm
148	HPLC με ανιχνευτή φθορισμού	Μικροπροσδιορισμός με HPLC-φθορισμομετρία της καρβεδιλόλης στο πλάσμα
149		HPLC με ανιχνευτή φθορισμού (διέγερση στα 238 nm και εκπομπή στα 350 nm)
119	Χειρόμορφη χρωματογραφία	Δείγματα ορού
150	Χρωματογραφία με ανιχνευτή μάζας	HPLC-ESI MS με παρακολούθηση της έκλυσης με DAD.
151		LC- APCI –MS για την παρακολούθηση 22 β-blockers στο πλάσμα
132	Χρωματογραφία με ανιχνευτή MS/MS	LC-MS/MS για σε ανθρώπινο πλάσμα
152		UPLC – MS/MS για παρακολούθηση φαρμακοκινητικής σε ποντίκια
153		LC-MS/MS για την παρακολούθηση β-blockers σε δείγματα ούρων
120		HPLC – MS/MS stereoselective analysis of carvedilol in human plasma after chiral derivatization
154	Χρωματογραφία με ηλεκτροχημική ανίχνευση	LC- με ηλεκτροχημική ανίχνευση σε πλάσμα
137	Χρωματογραφία LC×LC-FLD	Βιοϊσοδυναμία μεταξύ 2 φαρμακευτικών μορφών

Στις περισσότερες χρωματογραφικές τεχνικές που παρατίθενται του πίνακα ΙΣΤ.2.1 πραγματοποιείται χρωματογραφία αντίστροφης φάσης.

Σχόλια-Μελέτη και σύγκριση τεχνικών βιβλιογραφίας για καρβεδιλόλη

Μελετώντας τον πίνακα ΙΣΤ.2.1 το υλικό στήλης που έχει χρησιμοποιηθεί στις περισσότερες περιπτώσεις για χρωματογραφία αντίστροφης φάσης είναι C18, υλικό χαρακτηριστικά μη πολικό.

Επίσης η κινητή φάση τις περισσότερες φορές αποτελεί μίγμα υδατικής φάσης με όξινο pH και οργανικού τροποποιητή. Το pH κυμαίνεται από 2 έως 3,8 και η επιλογή του όξινου περιβάλλοντος δικαιολογείται από τη δομή της καρβεδιλόλης. Για τη γρηγορότερη έκλυση της καρβεδιλόλης σε χρωματογραφία αντίστροφης φάσης πρέπει να αυξηθεί η πολικότητά της και αυτό απαιτεί όξινο περιβάλλον στο οποίο και οι δυο αμινομάδες είναι πρωτονιωμένες και το φορτίο της θετικό. Στην κάθε περίπτωση όμως, η τελική ενεργότητα των πρωτονίων της κινητής φάσης επηρεάζεται από την φύση και αναλογία του οργανικού τροποποιητή.

Οι ευρύτερα χρησιμοποιούμενοι οργανικοί τροποποιητές είναι η μεθανόλη και το ακετονιτρίλιο. Συγκρινόμενα ως προς την τοξικότητά τους, παράμετρος που αναφέρθηκε ως σημαντική στην επιλογή ενός διαλύτη, η μεθανόλη θεωρείται καλύτερη επιλογή. Τα μίγματα όμως μεθανόλης – νερού αυξάνουν την πίεση που ασκείται στη στήλη διότι έχουν υψηλότερο ιξώδες από τα αντίστοιχα μίγματα ακετονιτρίλιου-νερού, με αποτέλεσμα συχνά να προτιμάται το ακετονιτρίλιο παρόλη την πιθανή του τοξικότητα και το αυξημένο, συγκριτικά, κόστος του.

Μια ακόμη παράμετρος σημαντική στην περίπτωση ανιχνευτή υπεριώδους, είναι το φάσμα του διαλύτη και η απορρόφησή του στην περιοχή μέτρησης. Υπάρχει μια ενδεικτική τιμή μήκους κύματος κάτω από την οποία αποφεύγονται οι μετρήσεις (cut off) και ενώ για την μεθανόλη είναι τα 205 nm για το ακετονιτρίλιο είναι τα 195 nm.

ΙΣΤ.3. Καρβεδιλόλη -Βιομηχανικός προσδιορισμός σε δισκία (ELPEN)

Ο ποιοτικός έλεγχος της παραγωγής δισκίων καρβεδιλόλης απαιτεί τη χρήση αναλυτικής τεχνικής που να επιτρέπει τον προσδιορισμό της, αντιμετωπίζοντας πιθανή παρεμπόδιση από τα συνυπάρχοντα έκδοχα και τα προϊόντα διάσπασής της.

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία (XM0) είναι χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, με ανιχνευτή UV-vis και παρακολούθηση των εκλουομένων ουσιών στα 242 nm. Η στατική φάση είναι οξείδιο του πυριτίου με C18 υποκαταστάτες και διαστάσεις στήλης μήκος 250 mm, διάμετρο 4,5 mm και μέγεθος σωματιδίων 5 μ. Η κινητή φάση είναι καλά απαερωμένο μίγμα ρυθμιστικού διαλύματος και ακετονιτριλίου σε αναλογία 52 προς 48 αντιστοίχως, με ροή 0,9 mL/min. Το ρυθμιστικό διάλυμα έχει τιμή $3,8 \pm 0,2$ και παρασκευάζεται από φωσφορικά άλατα.

ΙΣΤ.4. Καρβεδιλόλη -Ανάπτυξη χρωματογραφικής μεθόδου για καρβεδιλόλη και το υπό μελέτη άγνωστο προϊόν της

Σκοπός είναι η ανάπτυξη χρωματογραφικής μεθόδου με ανιχνευτή UV που να είναι εκλεκτική ως προς την καρβεδιλόλη και το άγνωστο προϊόν της. Επίσης θα πρέπει οι δυο ουσίες αυτές να διαχωρίζονται και από τα γνωστά προϊόντα διάσπασης της καρβεδιλόλης. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά προσφέρονται και από τη XM0. Σημαντική απαίτηση από τη νέα μέθοδο είναι ο μικρότερος δυνατός χρόνος ανάλυσης ώστε να αυξηθεί ο αριθμός των δειγμάτων που ελέγχονται κατά το χρονικό διάστημα των πειραμάτων. Επίσης, μελετώντας τη σταθερότητα του αγνώστου προϊόντος, ο μικρός χρόνος ανάλυσης του μειώνει τα σφάλματα της αστάθειας που παρουσιάζει.

ΙΣΤ.4.1. Επιλογή στατικής φάσης

Η πολικότητα της καρβεδιλόλης είναι δεδομένη λόγω της παρουσίας ευκίνητων υδρογόνων στο μόριό της οπότε για την εκτέλεση χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης επιλέγεται μη πολική στατική φάση. Αρχική στήλη είναι η μη πολική C18 με διαστάσεις 250 mm×4,6 mm και μέγεθος πόρων 5 μm. Το

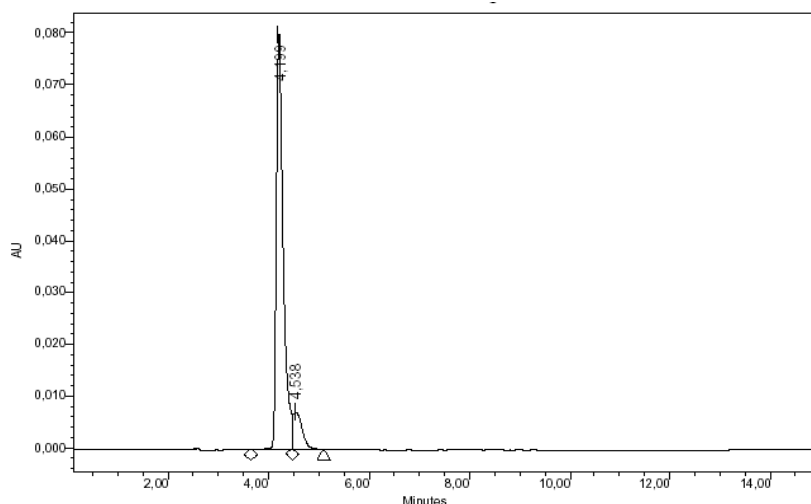
μεγάλο σχετικά μήκος της στήλης βασίζεται στο σκεπτικό του καλύτερου διαχωρισμού των εκλουόμενων ουσιών, αν και αυξάνει το χρόνο αλληλεπίδρασης τους με στατική τη φάση.

ΙΣΤ.4.2. Βελτιστοποίηση κινητής φάσης

ΙΣΤ.4.2.1. Επιλογή – XM1

Έχοντας κάνει τις παραπάνω παρατηρήσεις και με σκοπό την ανάπτυξη χρωματογραφικής μεθόδου με ανιχνευτή UV, επιλέγεται ως κινητή φάση ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 3,8 και μεθανόλη, αναλογία 53 / 47, και ροή 0,8 mL/min.

Τα χρωματογραφήματα των πρώτων δοκιμαστικών εισαγωγών με τις συνθήκες αυτές (XM1) έδωσαν για την καρβεδιλόλη μη συμμετρικό σχήμα κορυφής (σχήμα ΙΣΤ.4.1).

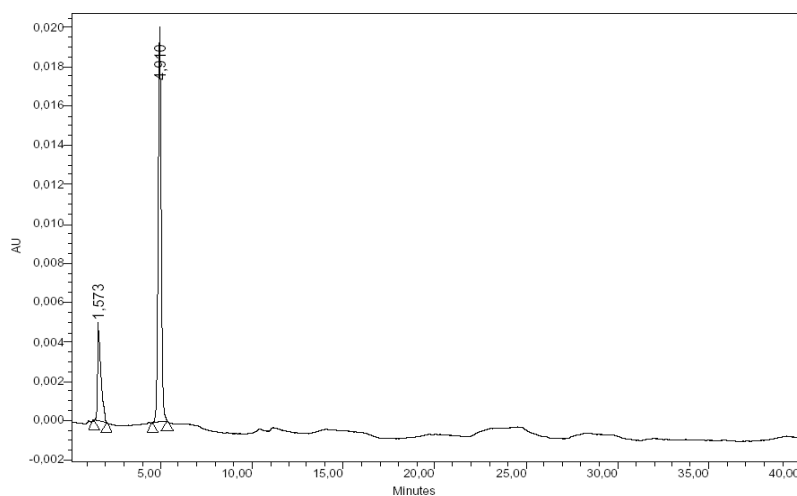


Σχήμα ΙΣΤ.4.1. Χρωματογράφημα καρβεδιλόλης με τη μέθοδο XM1.

ΙΣΤ.4.2.2. Οργανικός Τροποποιητής - Μέθοδος XM2

Αλλάζεται ο διαλύτης ώστε να έχει καλύτερη έκλουση η καρβεδιλόλη και πιο συμμετρική κορυφή. Αντικαθίσταται η μεθανόλη από το ακετονιτρίλιο που χαρακτηρίζεται από καλύτερη εκλουστική ικανότητα, όπως προαναφέρθηκε. Οι υπόλοιπες χρωματογραφικές συνθήκες διατηρούνται σταθερές (XM2) και ελέγχεται η συμπεριφορά του ίδιου δείγματος καρβεδιλόλης. Παρατηρείται

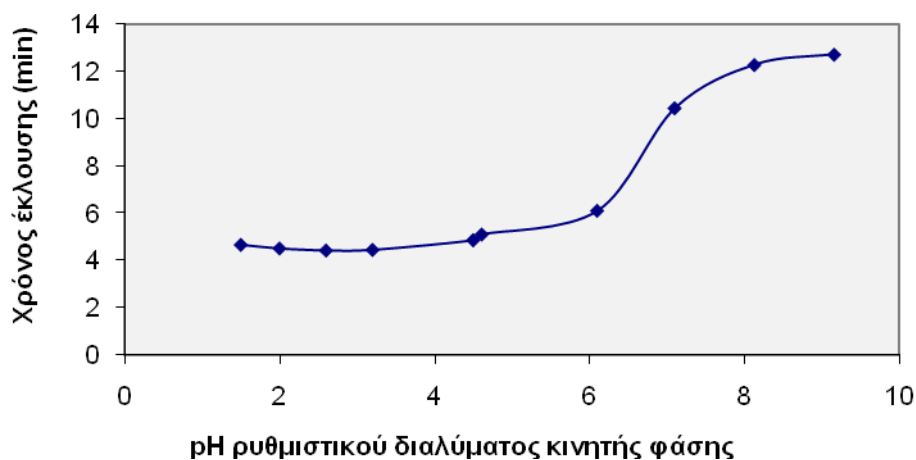
βελτίωση της συμμετρίας της κορυφής και εδραιώνεται η χρήση του ακετονιτριλίου ως οργανικός τροποποιητής (σχήμα ΙΣΤ.4.2)



Σχήμα ΙΣΤ.4.2. Χρωματογράφημα καρβεδιλόλης με τη μέθοδο ΧΜ2.

ΙΣΤ.4.2.3. pH κινητής φάσης – Μέθοδος ΧΜ3

Διατηρούνται οι συνθήκες της μεθόδου ΧΜ2 και γνωρίζοντας τη δομή της καρβεδιλόλης εκτιμάται πως το pH θα είναι σημαντικός χρωματογραφικός παράγοντας. Αλλάζοντας το pH της ΧΜ2 σε μεγάλο εύρος τιμών του, καταγράφεται ο χρόνος ανάσχεσης της καρβεδιλόλης. Τα αποτελέσματα δίνονται γραφικά στο σχήμα ΙΣΤ.4.3.



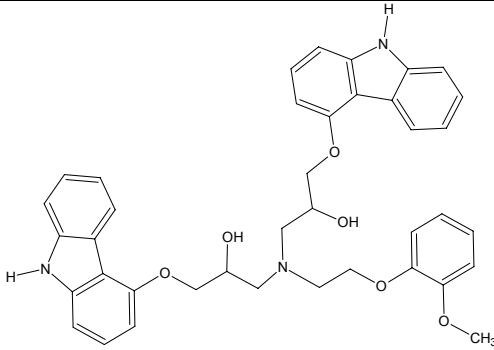
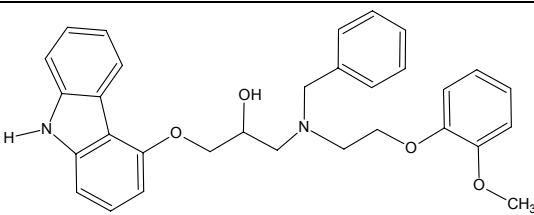
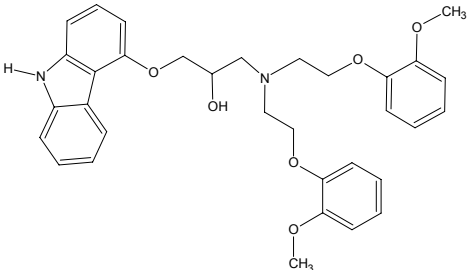
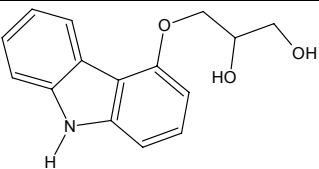
Σχήμα ΙΣΤ.4.3. Γράφημα απεικόνισης της εξάρτησης του χρόνου έκλουσης της καρβεδιλόλης από το pH του ρυθμιστικού της κινητής φάσης

Το πείραμα αυτό έχει χρησιμοποιηθεί στην αξιολόγηση και προσέγγιση της δομής του αγνώστου προϊόντος στο κεφάλαιο Δ.8 του πειραματικού μέρους. Η μεταβολή του χρόνου ανάσχεσης της καρβεδιλόλης μετά το pH 6 και η σχετική σταθεροποίησή του μετά το pH~8 οφείλεται στη αποπρωτονίωση της δευτεροταγούς αμινομάδας της.

Επειδή σημαντικός είναι ο διαχωρισμός του αγνώστου προϊόντος από την καρβεδιλόλη, ελέγχεται ο χρόνος ανάσχεσης του στις ίδιες κινητές φάσεις

Τέλος, επειδή πέραν της εκλεκτικότητας ως προς καρβεδιλόλη και άγνωστο προϊόν, ως στόχο της υπό ανάπτυξης μεθόδου έχει τεθεί η διαχωριστότητά τους και από τα γνωστά προϊόντα διάσπασης της καρβεδιλόλης, ελέγχεται ενδεικτικά και σε αυτά ο χρόνος ανάσχεσής τους σε κάποιες από τις κινητές φάσεις. Τα αποτελέσματα σημειώνονται στον πίνακα ΙΣΤ.4.1.

Πίνακας ΙΣΤ.4.1. Γνωστές προμιξείες της καρβεδιλόλης από τη συνθετική διαδικασία και χρόνοι ανάσχεσης σε ενδεικτικές τιμές pH.

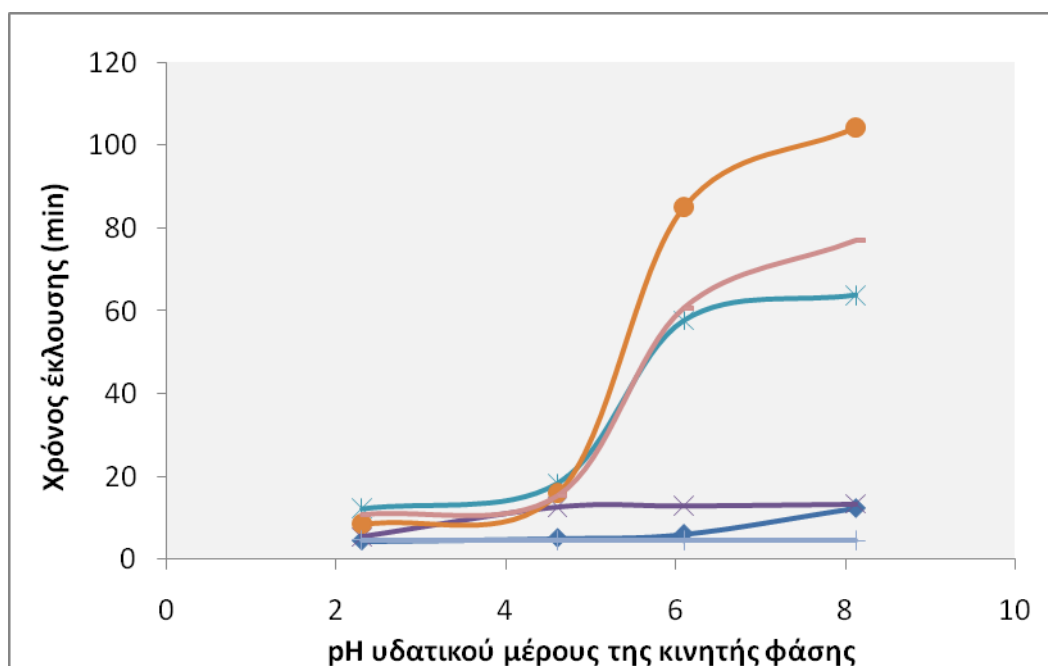
Δομή - Συμβολισμός/Όνομασία	Συντακτικός τύπος (M.B.)	Χρόνος ανάσχεσης (min) για 4 pH υδατικής φάσης			
		2,3	4,5	6,5	8,3
Καρβεδιλόλη	$C_{24}H_{25}O_4N_2$ (406)	4,40	4,68	7,64	14,00
 πρόσμιξη Β	$C_{39}H_{39}O_6N_3$ (645)	12,26	18,42	57,73	63,90
 πρόσμιξη C	$C_{31}H_{32}O_4N_2$ (482)	8,50	15,93	84,96	104,26
 πρόσμιξη F	$C_{33}H_{36}O_6N_2$ (552)	10,74	15,33	60,80	77,17
 πρόσμιξη E	$C_{15}H_{17}O_3N$ (259)	4,56	4,61	4,49	4,50

Ο έλεγχος του χρόνου ανάσχεσης των προϊόντων διάσπασης σταμάτησε πριν την αλκαλική περιοχή. Η μεγάλη αύξηση του χρόνου ανάσχεσης των

κορυφών απαγορεύει την εκτέλεση χρωματογραφικού ελέγχου σε αλκαλικό περιβάλλον.

Από τη μελέτη των δομών, φαίνεται πως το imp E είναι κομμάτι της δομής της καρβεδιλόλης, και πως έχει τον μικρότερο μοριακό όγκο από τις υπόλοιπες προσμίξεις. Επίσης διαθέτει 2 αλειφατικές υδροξυλομάδες αλλά όχι την αλειφατική αμινομάδα.

Όλα τα αποτελέσματα συγκεντρώνονται στο διάγραμμα ΙΣΤ.4.4.



Σχήμα ΙΣΤ.4.4. Ενδεικτικό γράφημα της εξάρτησης του χρόνου έκλουσης από το pH του ρυθμιστικού της κινητής φάσης της καρβεδιλόλης (♦), των γνωστών της προσμίξεων [B (*), C (●), E (+), F ()] και του ΑΠ (×)

Από το διάγραμμα ΙΣΤ.4.4 διαπιστώνεται πως για φαινομενικό pH από 2 έως 4,5 η συμπεριφορά της καρβεδιλόλης δεν αλλάζει, και επειδή είναι επιθυμητός ο πλήρης ιονισμός της, η επιλογή του pH θα γίνει από την περιοχή αυτή. Όσο πιο μικρή η τιμή που θα επιλεγεί, τόσο πιο μικρός θα είναι ο χρόνος ανάσχεσης των κορυφών. Ακόμα και στις τιμές pH που πλησιάζουν το 2, οι προσμίξεις της καρβεδιλόλης δεν συνεκλούνται μεταξύ τους, ενώ το άγνωστο προϊόν εκλύεται πριν από αυτές και μετά την καρβεδιλόλη. Στη συνέχεια, ο διαχωρισμός των παραπάνω ουσιών θα ρυθμιστεί με την επιλογή της κατάλληλης ροής και της περιεκτικότητας του οργανικού τροποποιητή στην κινητή φάση.

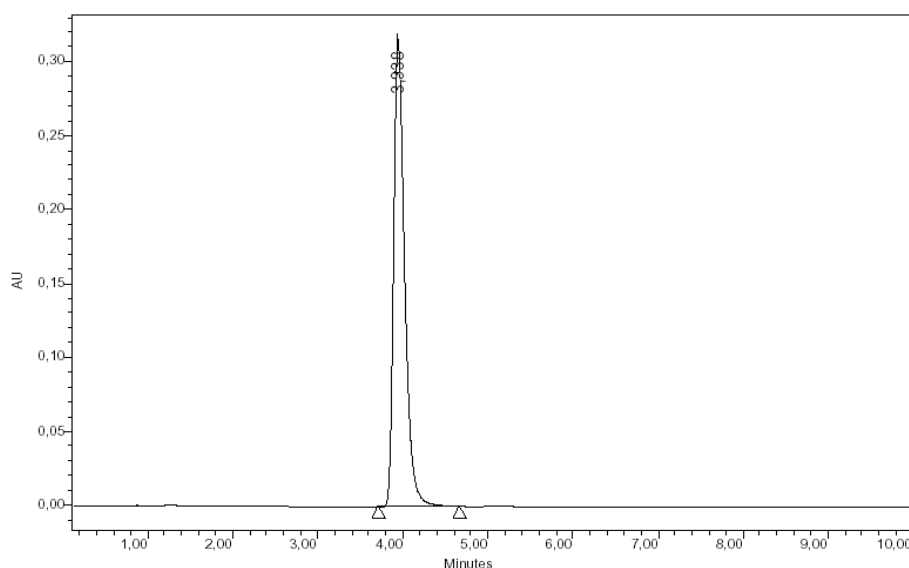
ΙΣΤ.4.2.4 Στήλη – Μέθοδος ΧΜ3

Οι συμβατικές C18 στήλες, όπως έχει ήδη ειπωθεί, δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται πολύ σε pH μικρότερα από 2. Γνωρίζοντας όμως την επιλογή που έγινε από τη διερεύνηση του pH, αλλάζει η ποιότητα του υλικού πλήρωσης της στήλης σε XTerra C18, πιο σταθερό σε ακραίες τιμές pH. Στις διαστάσεις που επιλέγονται μειώνεται το μήκος στα 100 mm ώστε να μειωθεί και η διάρκεια της χρωματογραφικής ανάλυσης. Τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά της παραμένουν ίδια, διάμετρος 4,6 mm και μέγεθος σωματιδίων 5 µm.

Θεωρητικά, για να κρατηθεί σταθερός ο χρόνος ανάσχεσης των κορυφών, πρέπει η ροή της στήλης να μειωθεί, με μείωση ανάλογη της μεταβολής του μήκους.

$$\rho\sigma\eta_2 = \rho\sigma\eta_1 \times \frac{\mu\eta\kappa\omicron\varsigma_2}{\mu\eta\kappa\omicron\varsigma_1} = 0,8 \times \frac{100}{250} = 0,32\text{mL}/\text{min} \quad \text{Εξίσωση ΙΣΤ.1.}$$

Η ροή αυτή είναι αρκετά μικρή οπότε επιλέγεται ροή 0,60 mL/min και ελέγχεται ο χρόνος ανάσχεσης της καρβεδιλόλης στις συνθήκες αυτές. Το χρωματογράφημα (Σχήμα ΙΣΤ.4.5) δείχνει μείωση του χρόνου ανάσχεσης της καρβεδιλόλης στα 3,9 min. .



Σχήμα ΙΣΤ.4.5. Χρωματογράφημα καρβεδιλόλης με τη μέθοδο ΧΜ3.

ΙΣΤ.4.2.6 Τελική Μέθοδος– Μέθοδος XM4

Όμως η ροή που θα επιλεγεί θα εξαρτηθεί από την κινητή φάση και την αναλογία του ακετονιτριλίου σε αυτήν. Όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα του ακετονιτριλίου, τόσο αυξάνεται και η εκλουστική ικανότητα της κινητής φάσης, οπότε μειώνοντας τη ροή στη στήλη, αντιμετωπίζεται η έντονη μείωση της διάρκειας της εισαγωγής. Το αντίστροφο, αύξηση της ροής, συνοδεύει τη μείωση του ακετονιτριλίου, στην προσπάθεια εύρεσης των βέλτιστων συνθηκών για την κινητή φάση.

Για να μειωθεί η εκλουστική ικανότητα της κινητής φάσης, όπως αυτή αυξήθηκε στις συνθήκες της μεθόδου XM3, και για να απομακρύνουμε την καρβεδιλόλη από το μη κατακρατούμενο PVP, μειώνεται η περιεκτικότητα του ακετονιτριλίου σε 33,3 % (το 1/3 της κινητής φάσης) και αυξάνεται λίγο την ροή της κινητής φάσης σε 0,8 mL/min. Η αύξηση της υδατικής αναλογίας στην κινητή φάση μειώνει την εκλουστικότητά της και θα μεγάλωνε το χρόνο ανάσχεσης της καρβεδιλόλης που η αύξηση της ροής δεν επιτρέπει να συμβεί. Το pH του ρυθμιστικού παραμένει 2 και παρασκευάζεται σύμφωνα με τις οδηγίες της ευρωπαϊκής φαρμακοποιίας, 6,75 g KCl στα 900 mL νερού ρύθμιση του pH στο 2 με HCl και συμπλήρωση του όγκου στα 1000 mL.

Δοκιμάστηκαν οι παρακάτω συνθήκες κινητής φάσης, εκφρασμένες ως αναλογία ρυθμιστικού pH 2 προς ακετονιτρίλιο, ως ροή κινητής φάσης και θερμοκρασία στήλης

α. Ρυθμιστικό pH 2/ ακετονιτρίλιο 9/7 και ροή 0,6 mL/min

Η πρόσμιξη E δεν διαχωρίζεται καλά από την καρβεδιλόλη

β. Ρυθμιστικό pH 2/ ακετονιτρίλιο 10/6 και ροή 0,8 mL/min

Καλύτερος ο διαχωρισμός των καρβεδιλόλη και πρόσμιξη E, αλλά η πρόσμιξη B βγαίνει πολύ αργά...

γ. Ρυθμιστικό φωσφορικών pH 3,5 / ακετονιτρίλιο 2/1 και ροή 0,6 mL/min

Αντί απλά να βελτιωθεί η διαχωριστικότητα με την αύξηση του pH, το άγνωστο προϊόν παρουσιάζει μεγάλο χρόνο, 18 min, οπότε το νέο pH εγκαταλείπεται.

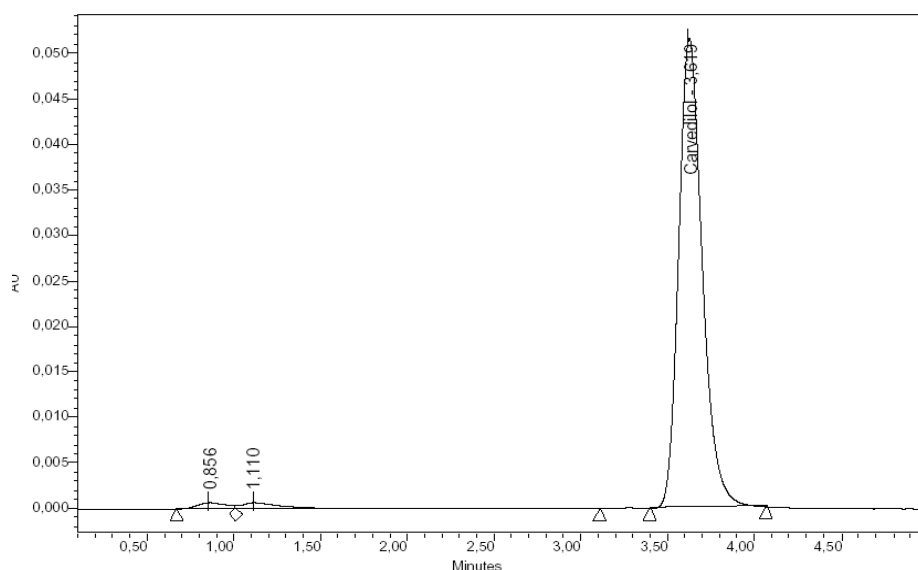
δ. Ρυθμιστικό pH 2/ ακετονιτρίλιο 10/4 και ροή 1,0 mL/min

Μείωση του ακετονιτριλίου για να αυξηθεί η διαχωριστικότητα των αγνώστου προϊόντος και καρβεδιλόλης, αλλά οι χρόνοι ανάσχεσης είναι ήδη μεγάλοι (19,5 και 12,5 min αντίστοιχα).

ε. Ρυθμιστικό pH 2/ ακετονιτρίλιο 3/2 και ροή 0,8 mL/min

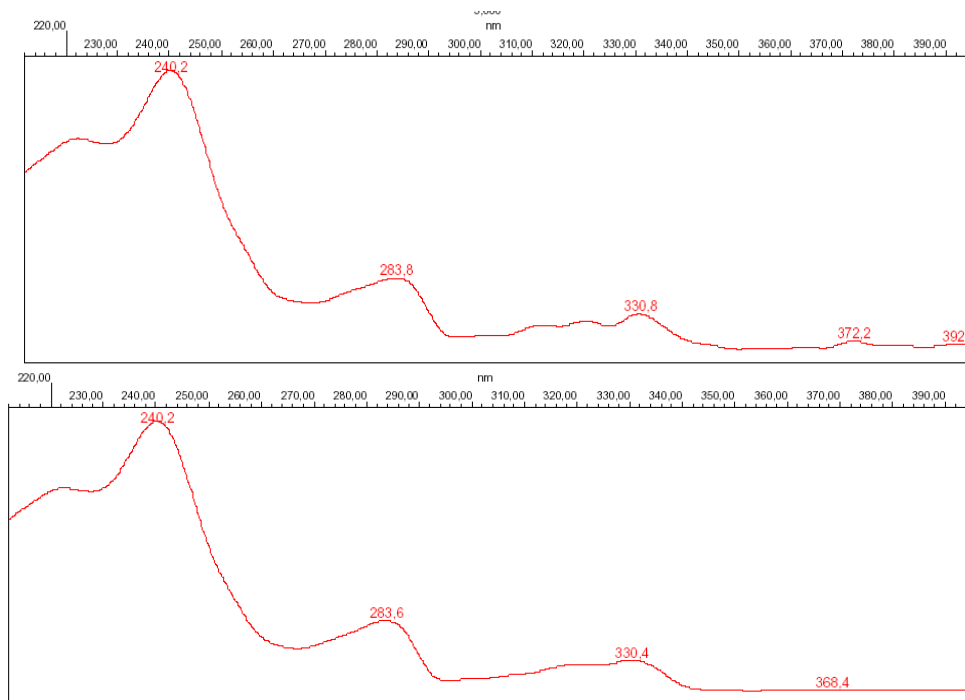
Ικανοποιητικότερο αποτέλεσμα και οι συνθήκες αυτές επιλέγονται για την τελική μέθοδο (XM4)

Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα της καρβεδιλόλης στις συνθήκες της μεθόδου XM4 παρατίθεται στο σχήμα ΙΣΤ.4.6.



Σχήμα ΙΣΤ.4.6. Χρωματογράφημα καρβεδιλόλης με τη μέθοδο XM4.

Στις τελικές χρωματογραφικές συνθήκες το μήκος κύματος παρακολούθησης των εκλουομένων ουσιών επιλέγεται από το μέγιστο στο φάσμα της μελετώμενης ουσίας. Στο σχήμα ΙΣΤ.4.7 δίνονται τα φάσματα UV-VIS των καρβεδιλόλης και αγνώστου προϊόντος και παρατηρείται πως παρουσιάζουν μέγιστο στα 240 nm.



Σχήμα ΙΣΤ.4.7. UV φάσμα καρβεδιλόλης και αγνώστου προϊόντος στην κινητή φάση. Μέγιστο απορρόφησης για την καρβεδιλόλη και επιλογή του ως μήκος κύματος παρατήρησης για τη μέθοδο ΧΜ4.

Όλα τα παραπάνω στάδια ανάπτυξης της μεθόδου παρατίθενται στον πίνακα ΙΣΤ.4.2.

Πίνακας ΙΣΤ.4.2. Στάδια ανάπτυξης μεθόδου XM4

Κωδικός	Συνθήκες	Παρατηρήσεις	Συμπεράσματα
XM1	(1) C18 250 mm x 4,6 mm, 5 μm (2) pH 3,8/μεθανόλη 53/47 (3) 35 °C (4) 0,8 mL/min (5) UV , 240 nm	Άσχημη μορφή η κορυφή της καρβεδιλόλης	Αλλαγή τροποποιητή σε ακετονιτρίλιο 1 ^{ον} για καλύτερευση της μορφής της εκλουόμενης κορυφής 2 ^{ον} το μέγιστο απορρόφησης και παρακολούθησης της καρβεδιλόλης είναι στα 240nm
XM2	(1) C18 250 mm x 4,6 mm, 5 μm (2) pH 3,8/ακετονιτρίλιο 53/47 (3) 35 °C (4) 0,8 mL/min (5) UV , 240 nm	Βελτιστοποίηση της κινητής φάσης ελέγχοντας διάφορα pH.	Αλλαγή pH σε ποιο όξινο και παράλληλα αλλαγή στήλης για να είναι πιο συμβατή με την όξινη κινητή φάση.
XM3	(1) XTerra C18 100 mm x 4,6 mm, 5μm (2) ρυθμιστικό φωσφορικών/ακετονιτρίλιο pH 2,0 53/47 (3) 35 °C (4) 0,6 mL/min (5) UV 240 nm	Χρόνου ανάσχεσης καρβεδιλόλης μείωση κατά 1 λεπτό (4,9 min → 3,9 min)	Μείωση εκλουστικότητας κινητής φάσης μειώνοντας την περιεκτικότητά της σε ακετονιτρίλιο (από 53/47 σε 3/2) και αυξάνοντας την ροή της σε 0,8mL/min.
XM4	(1) XTerra C18 100 mm x 4,6 mm, 5μm (2) ρυθμιστικό φωσφορικών/ακετονιτρίλιο pH 2,0 3/2 (3) 30 °C (4) 0,8 mL/min (5) UV 240 nm	Η θερμοκρασία της στήλης μειώθηκε στους 30°C διότι αυξάνει την εκλουστικότητα της κινητής φάσης. Όγκος εισαγωγής 10 μL.	Ο χρόνος ανάσχεσης της καρβεδιλόλης μειώθηκε λίγο ακόμα στα 3,6min

Προσαρμογή XM4 σε LC-MS

Κωδικός	Συνθήκες	Παρατηρήσεις	Συμπεράσματα
XM5	(1) XTerra C18 100 mm x 4,6 mm, 5μm (2) νερό/ακετονιτρίλιο 1/1/ με 400 μL μυρμηκικό οξύ/L και pH 2,7 (3) 30 °C (4) 0,3 mL/min (5) 200-1000m/z	Η M3 αλλάζει για να είναι συμβατή με MS. Η ροή της κινητής φάσης, για να είναι συμβατή με τον ιονιστή του MS γίνεται 0,3mL/min. Ως κινητή φάση κρατείται μίγμα νερού ακετονιτρίλιου σε αναλογία όμως 1:1 και οξυνίζεται ελαφρά με μυρμηκικό οξύ. Όγκος εισαγωγής 20 μL.	Προσαρμογή της XM4 για την πραγματοποίηση ανάλυσης σε MS. Γνωρίζοντας τη συμπεριφορά όλων των μελετώμενων ουσιών, η αλλαγή του pH δεν κρίθηκε σημαντική.

Προσαρμογή XM4 σε ημιπαρασκευαστική χρωματογραφία

Κωδικός	Συνθήκες	Παρατηρήσεις	Συμπεράσματα
XM6	(1) Symmetry C18 100 mm x 7,8 mm, 5 μm (2) ρυθμιστικό φωσφορικών pH 3,8 53 %, ακετονιτρίλιο 47 % (4) 2,3 mL/min (5) UV 240 nm	Το pH 3,8 επιτρέπει παραλαβή καθαρότερου ΑΠ για τις μεγάλες συγκεντρώσεις καρβεδιλόλης διότι μεγαλώνεται η διαχωριστικότητα (resolution) των κορυφών. Όγκος εισαγωγής 200 μL.	ΗΜΙΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΓΝΩΣΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

Συνθήκες: (1) στατική φάση (2) κινητή φάση (3) συνθήκες στήλης (4) ροή κινητής φάσης (5) ανιχνευτής

ΙΣΤ.5. Καρβεδιλόλη -Επικύρωση Μεθόδου ΧΜ4

Η μέθοδος επικυρώνεται ελέγχοντάς την ως προς την εκλεκτικότητα, τη γραμμικότητα, την επαναληψιμότητα και την ακρίβεια.

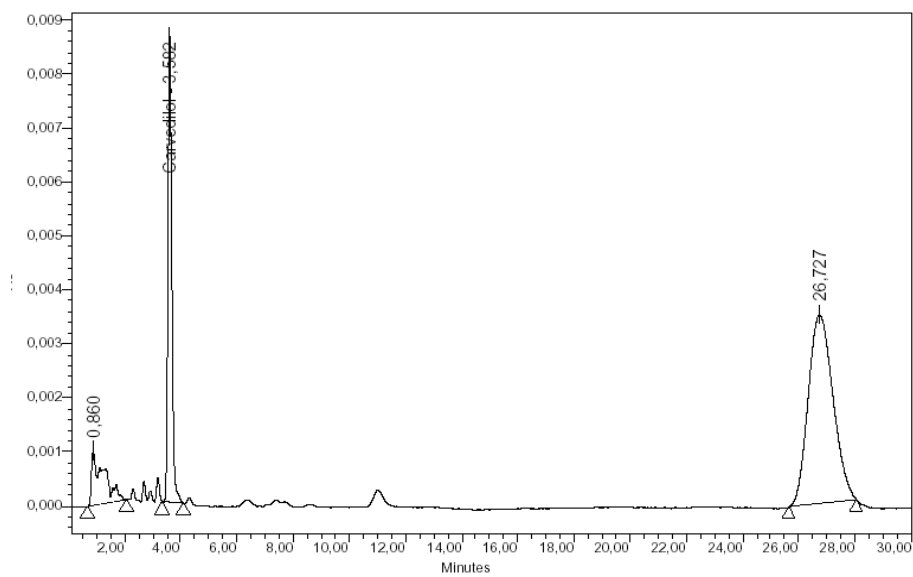
Ως διαλύτης σε όλες τις αραιώσεις έχει χρησιμοποιηθεί η κινητή φάση, ρυθμιστικό pH 2 / ακετονιτρίλιο 3:2.

ΙΣΤ.5.1. Εκλεκτικότητα

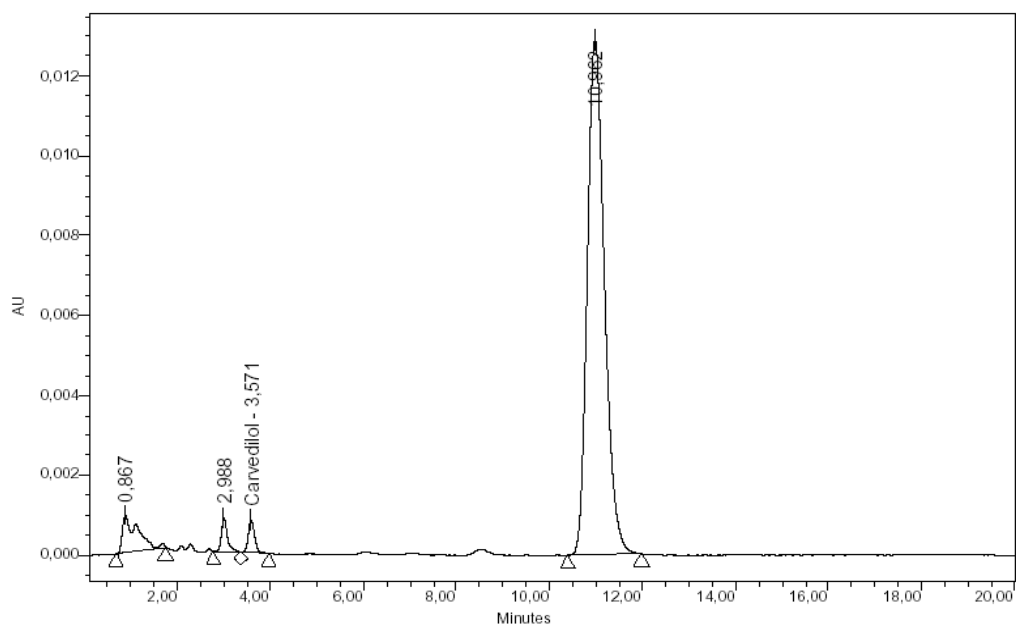
Η μέθοδος ελέγχεται ως προς την εκλεκτικότητά της στην καρβεδιλόλη παρουσία του PVP, των υπολοίπων εκδόχων των δισκίων και των λοιπών προσμίξεών της, B, C, E και F. Οι χρόνοι έκλουσής τους παρουσιάζονται στον πίνακα ΙΣΤ.5.1.

Πίνακας ΙΣΤ.5.1. Χρόνοι και σχετικοί χρόνοι ανάσχεσης γνωστών κορυφών στη μέθοδο ΧΜ4

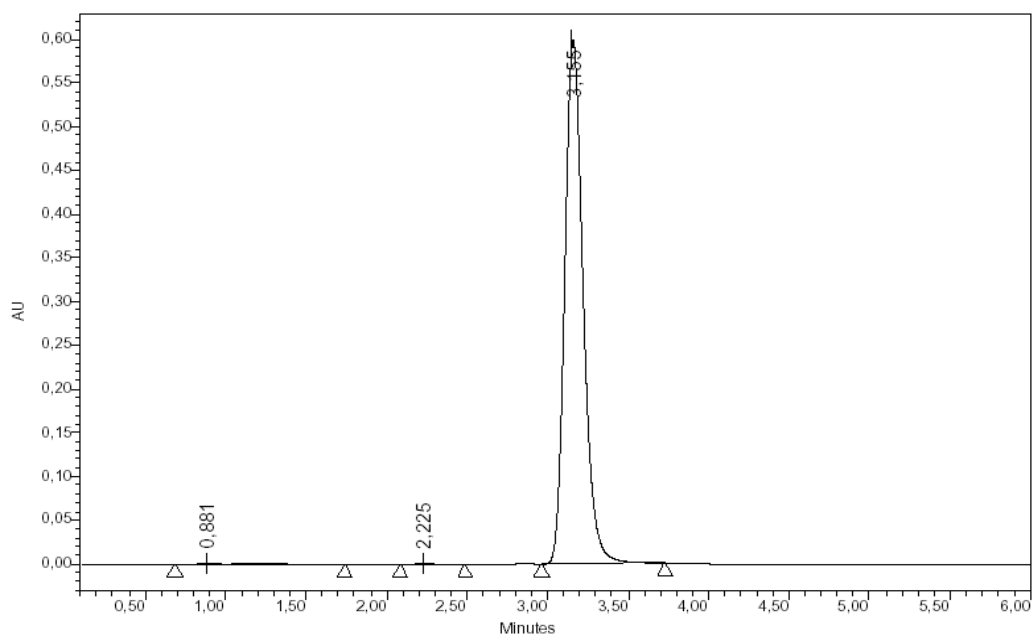
	Χρόνος Ανάσχεσης (min)	Σχετικός Χρόνος Ανάσχεσης	Σχήμα
πρόσμιξη B	26,7	7,5	ΙΣΤ.5.1.
πρόσμιξη C	11,0	3,1	ΙΣΤ.5.2.
πρόσμιξη E	3,2	0,9	ΙΣΤ.5.3.
πρόσμιξη F	14,0	3,9	ΙΣΤ.5.4.
Έκδοχα	1,7	0,3	ΙΣΤ.5.5.
καρβεδιλόλη	3,6	1,0	ΙΣΤ.5.6.
ΑΠ	12,3	3,4	ΙΣΤ.5.7.



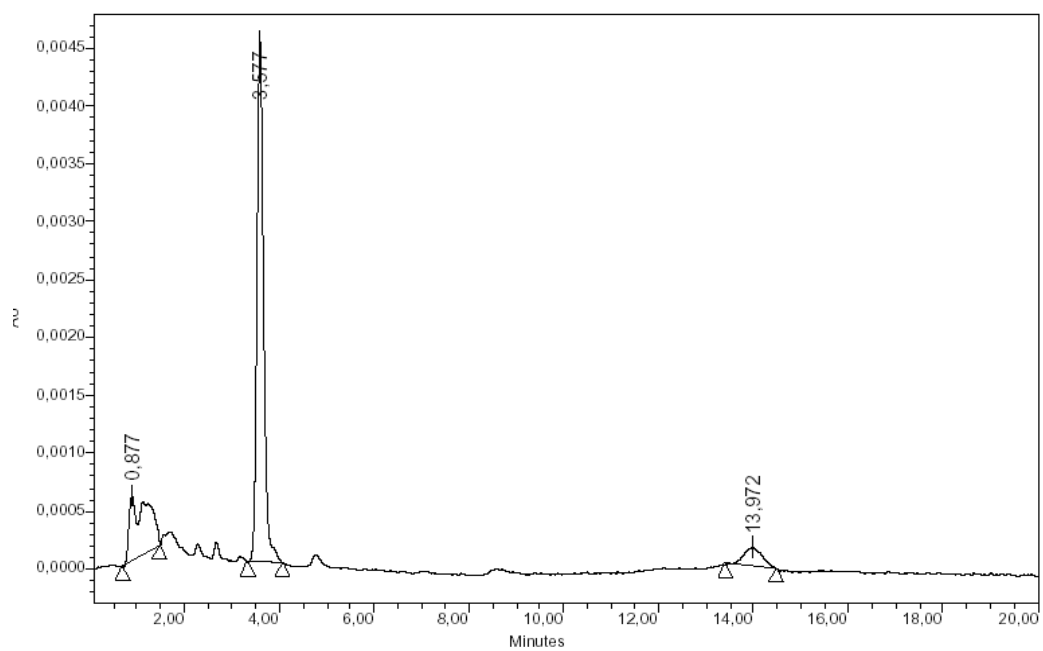
Σχήμα ΙΣΤ.5.1. Χρωματογράφημα πρόσμειξης Β με τη μέθοδο ΧΜ4.



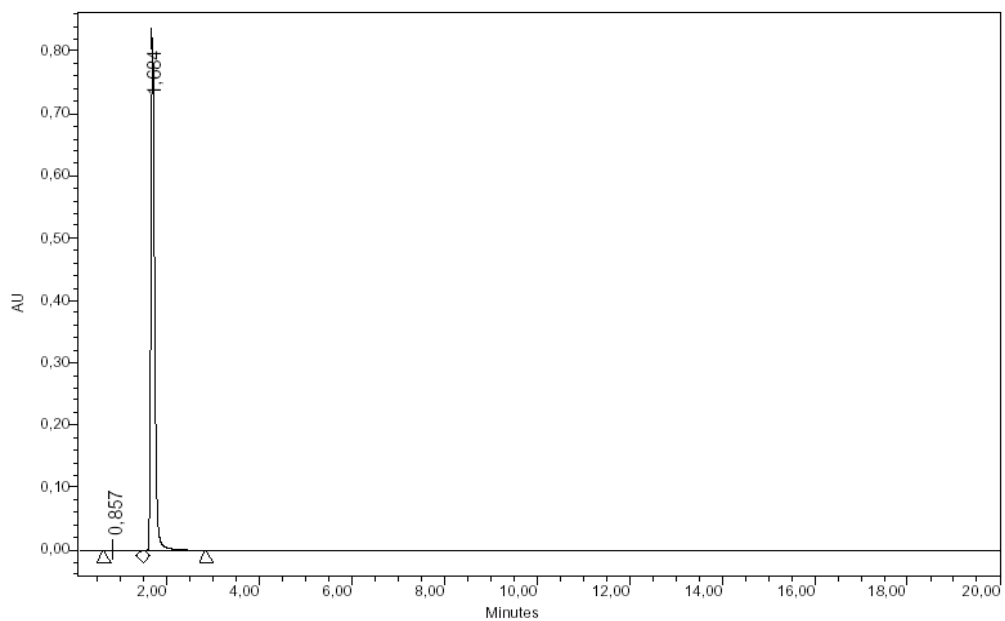
Σχήμα ΙΣΤ.5.2. Χρωματογράφημα πρόσμειξης C με τη μέθοδο ΧΜ4.



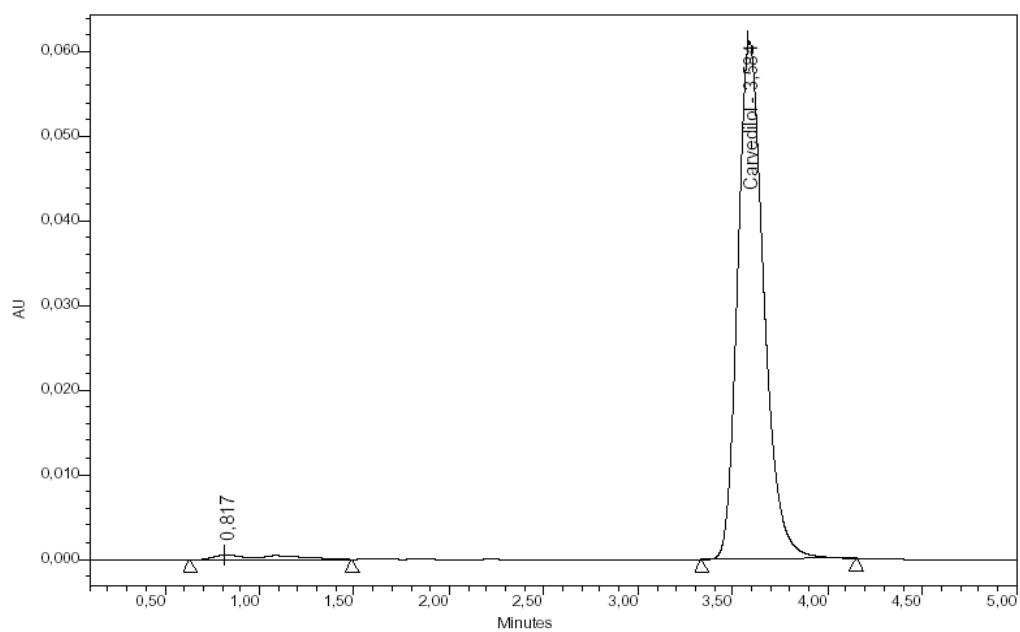
Σχήμα ΙΣΤ.5.3. Χρωματογράφημα πρόσμειξης Ε με τη μέθοδο ΧΜ4.



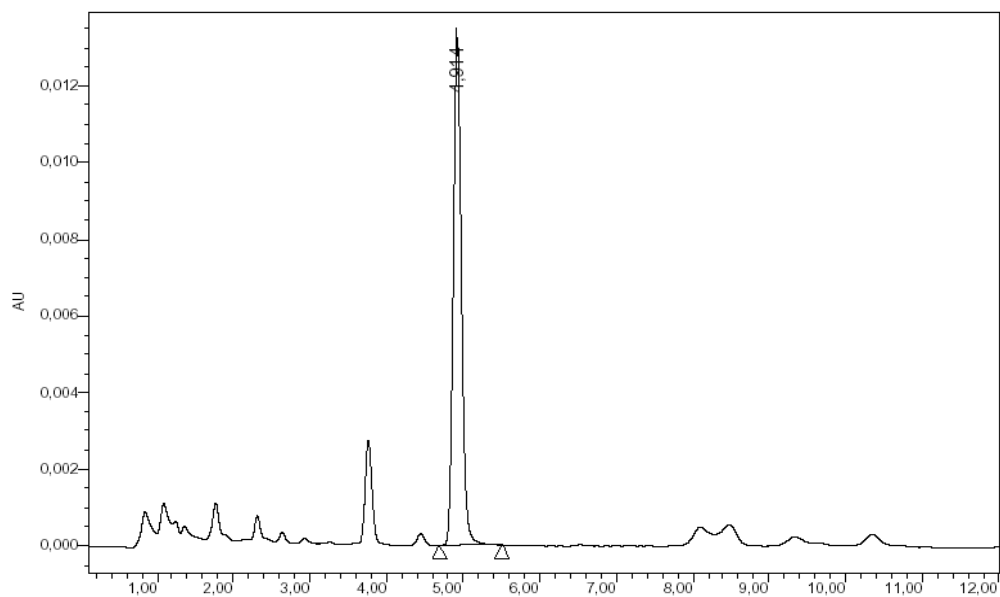
Σχήμα ΙΣΤ.5.4. Χρωματογράφημα πρόσμειξης F με τη μέθοδο ΧΜ4.



Σχήμα ΙΣΤ.5.5. Χρωματογράφημα εκδόχων με τη μέθοδο ΧΜ4.



Σχήμα ΙΣΤ.5.6. Χρωματογράφημα καρβεδιλόλης με τη μέθοδο ΧΜ4.



Σχήμα ΙΣΤ.5.7. Χρωματογράφημα αγνώστου προϊόντος με τη μέθοδο ΧΜ4.

ΙΣΤ.5.2. Όριο Ανίχνευσης – Όριο Ποσοτικοποίησης

Χρησιμοποιώντας το γενικό κριτήριο των ορίων ανίχνευσης (*lod*) και ποσοτικοποίησης (*loq*), αυτά χαρακτηρίζονται από την συγκέντρωση του αναλυτή που δίνει 3,33 και 10 φορές αντίστοιχα το ύψος της γραμμής βάσης. Εισάγοντας αραιά διαλύματα έχουμε τα αποτελέσματα του πίνακα ΙΣΤ.5.2.

Πίνακας ΙΣΤ.5.2. Δεδομένα υπολογισμού *loq* και *lod* της καρβεδιλόλης, μέθοδος ΧΜ4

ppb	Σήμα καρβεδιλόλης ($\times 10^{-4}$)	Σήμα θορύβου ($\times 10^{-5}$)	s/n	
100	6,98	5,5	12,7	10,1= loq
100	7,05	7,8	9,04	
100	6,90	8,0	8,65	
20	2,10	6,2	3,38	3,38
15	1,69	5,7	2,86	2,86
10	1,45	5,6	2,59	2,33
10	1,43	6,9	2,07	

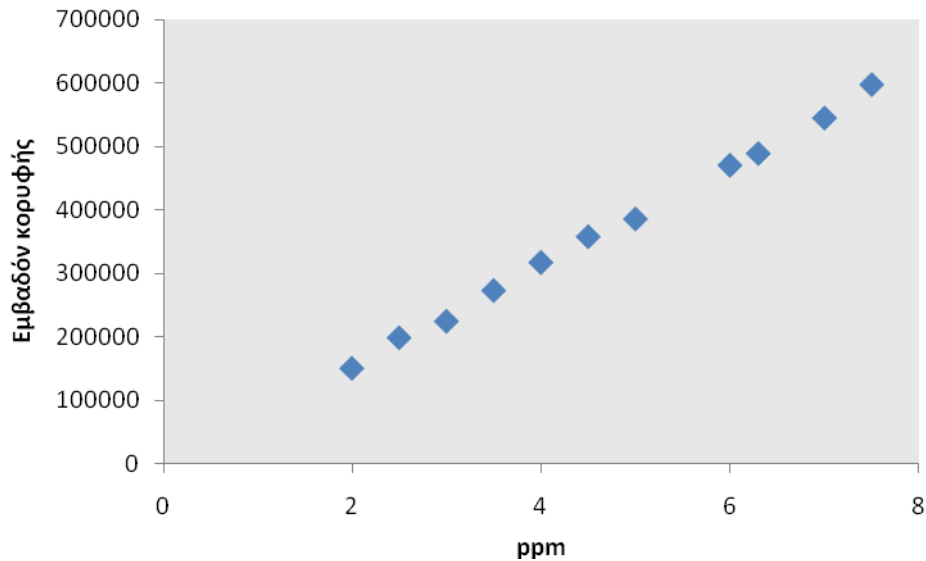
Από τον πίνακα φαίνεται πως το loq είναι τα 100 ppb ενώ το lod είναι γύρω στα 20 ppb

ΙΣΤ.5.3. Γραμμικότητα

Η γραμμικότητα της μεθόδου για την καρβεδιλόλη ελέγχθηκε στην περιοχή 2 ppm – 7,5 ppm, εύρος 50 % έως 150% της επιθυμητής συγκέντρωσης των 5 ppm . Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα ΙΣΤ.5.3.

Πίνακας ΙΣΤ.5.3. Δεδομένα γραμμικότητα της καρβεδιλόλης στη μέθοδο ΧΜ4

ppm	Εμβαδό
2,0	149819
2,5	198081
3,0	224223
3,5	272731
4,0	317120
4,5	357839
5,0	385710
6,0	470816
6,3	489329
7,0	545436
7,5	598299



Σχήμα ΙΣΤ.5.8. Απεικόνιση γραμμικότητα της μεθόδου ΧΜ4 για την καρβεδιλόλη.

Η γραμμικότητα του διαγράμματος ΙΣΤ.5.8 είναι

$$[\text{εμβαδόν}] = 79853,28[\text{ppb}] - 7772,52 \quad \text{με } R^2 = 0,999.$$

Η τυπική απόκλιση της κλίσης είναι $s_a=973,75$

Η τυπική απόκλιση σταθερού παράγοντα είναι $s_b=4851,59$

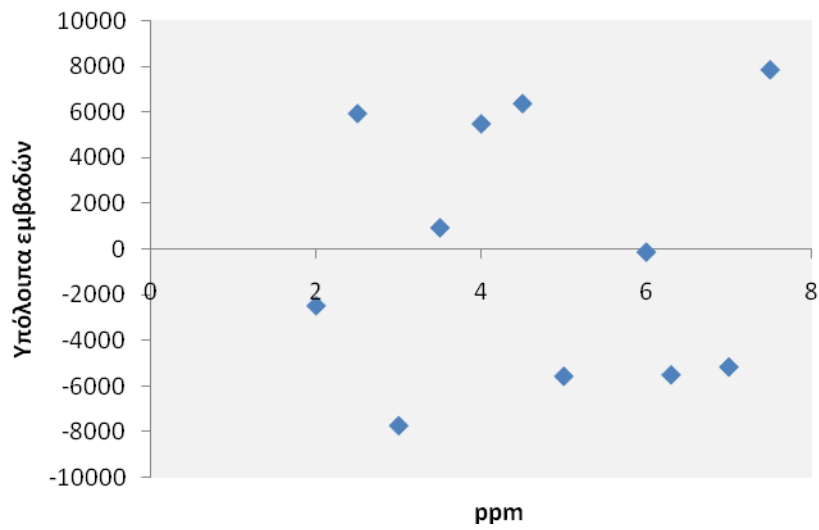
Για $P=95\%$ και για $n-2=9$ βαθμούς ελευθερίας, $t_9=2,262$, τα όρια εμπιστοσύνης για την κλίση είναι

$$a \pm t \cdot s_a \Rightarrow 77650,65 < a < 82055,91$$

ενώ τα αντίστοιχα όρια για τον σταθερό παράγοντα είναι

$$b \pm t \cdot s_b \Rightarrow -18526,81 < b < 3421,77$$

Το διάγραμμα των υπολοίπων που αντιστοιχεί στην γραμμικότητα του διαγράμματος ΙΣΤ.5.8 είναι αυτό του σχήματος ΙΣΤ.5.9.



Σχήμα ΙΣΤ.5.9. Γράφημα υπολοίπων των δεδομένων γραμμικότητας της μεθόδου XM4.

Το άθροισμα των υπολοίπων είναι της τάξης του 10^{-14} και θεωρείται προσεγγιστικά μηδέν.

ΙΣΤ.5.4. Πιστότητα

Για την πιστότητα (precision) της μεθόδου παρασκευάζονται δείγματα καθαρής καρβεδιλόλης και συγκρίνεται η πειραματικά υπολογιζόμενη συγκέντρωση με την θεωρητική.

1^η μέρα

Η πιστότητα της μεθόδου ελέγχεται σε όλο το εύρος εργασίας και τα αποτελέσματα δίνονται στον πίνακα ΙΣΤ.5.4.

Πίνακας ΙΣΤ.5.4. Δεδομένα 1^{ης} σειράς μετρήσεων για την πιστότητα της καρβεδιλόλης στη μέθοδο XM4.

a/a	Υπολογιζόμενη περιεκτικότητα (ppm)	Θεωρητική περιεκτικότητα (ppm)	% ανάκτηση	$(x_i - \bar{x}_{\text{μέσο}})^2$
1	2,49	2,52	101,09	2,5657
2	2,49	2,50	100,46	0,9285
3	2,49	2,45	98,43	1,1226
4	4,65	4,63	99,63	0,0182
5	4,65	4,64	99,92	0,1804
6	4,65	4,48	96,35	9,9023
7	7,49	7,47	99,79	0,0860
8	7,49	7,44	99,42	0,0046
9	7,49	7,49	99,99	0,2455
10	7,49	7,48	99,85	0,1299

Η στατιστική εκτίμηση της πρώτης ομάδας αποτελεσμάτων δίνει τα ακόλουθα νούμερα:

Μέσος όρος: 99,49 %

$$\text{Διακύμανση: } s_a^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} = 1,299\%$$

Τυπική απόκλιση: $s_a = 1,687\%$

$$\text{Σχετική τυπική απόκλιση: } rsd = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 = 1,305\%$$

Όρια εμπιστοσύνης για κάθε τιμή, για 10 βαθμούς ελευθερίας και πιθανότητα 95% ($t_{10}=2,228$)

$$\bar{x} - t \cdot s < \mu < \bar{x} + t \cdot s \Rightarrow \mu = \pm 3,759$$

ενώ τα όρια εμπιστοσύνης για την μέση τιμή είναι

$$\bar{x} - \frac{t \cdot s}{\sqrt{n}} < \mu < \bar{x} + \frac{t \cdot s}{\sqrt{n}} \Rightarrow \mu = \pm 1,133\%$$

2^η μέρα

Η μέτρηση της πιστότητας υπολογίζεται και για μια δεύτερη σειρά διαλυμάτων. με τα αποτελέσματα του πίνακα ΙΣΤ.5.5.

Πίνακας ΙΣΤ.5.5. Δεδομένα 2^{ης} σειράς μετρήσεων για την πιστότητα της καρβεδιλόλης στη μέθοδο ΧΜ4

α/α	Υπολογιζόμενη περιεκτικότητα (ppm)	Θεωρητική περιεκτικότητα (ppm)	% ανάκτηση	$(x_i - x_{\text{μέσο}})^2$
1	2,42	2,40	99,06	2,8758
2	2,32	2,38	102,70	3,7840
3	2,29	2,24	98,02	7,4426
4	4,49	4,59	102,32	2,4631
5	4,55	4,61	101,22	0,2211
6	4,34	4,44	102,20	2,0980
7	7,60	7,54	99,18	2,4753
8	7,34	7,52	102,43	2,8198
9	7,50	7,57	100,88	0,0155
10	7,56	7,55	99,85	0,8182

Η στατιστική εκτίμηση της δεύτερης ομάδας δίνει τα ακόλουθα αποτελέσματα:

Μέσος όρος: 100,79 %

$$\text{Διακύμανση: } s_b^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1} = 2,778\%$$

Τυπική απόκλιση: $s_b = 1,667\%$

$$\text{Σχετική τυπική απόκλιση: } rsd = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 = 1,654\%$$

Όρια εμπιστοσύνης για κάθε τιμή για 9 βαθμούς ελευθερίας και πιθανότητα 95 % ($t_9 = 2,262$)

$$\bar{x} - t \cdot s < \mu < \bar{x} + t \cdot s \Rightarrow \mu = \pm 3,771\%$$

ενώ τα όρια εμπιστοσύνης για την μέση τιμή είναι

$$\bar{x} - \frac{t \cdot s}{\sqrt{n}} < \mu < \bar{x} + \frac{t \cdot s}{\sqrt{n}} \Rightarrow \mu = \pm 1,192\%$$

Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα (intermediate precision)

Ελέγχεται η αναπαραγωγικότητα των αποτελεσμάτων μεταξύ των 2 σειρών πειραμάτων (1^η και 2^η μέρα). Συγκεντρωτικά όλα τα αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα ΙΣΤ.5.6.

Πίνακας ΙΣΤ.5.6. Δεδομένα και των 3 σειρών μετρήσεων για την ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα της καρβεδιλόλης στη μέθοδο ΧΜ4

α/α	Υπολογιζόμενη περιεκτικότητα (ppm)	Θεωρητική περιεκτικότητα (ppm)	% ανάκτηση	$(x_i - \bar{x}_{μέσο})^2$
1	2,49	2,52	101,09	0,8358
2	2,49	2,50	100,46	0,0762
3	2,49	2,45	98,43	3,0523
4	4,65	4,63	99,63	0,3052
5	4,65	4,64	99,92	0,0691
6	4,65	4,48	96,35	14,7023
7	7,49	7,47	99,79	0,1555
8	7,49	7,44	99,42	0,5709
9	7,49	7,49	99,99	0,0369
10	7,49	7,48	99,85	0,1070
11	2,42	2,40	99,06	1,2608
12	2,32	2,38	102,70	6,3414
13	2,29	2,24	98,02	4,6447
14	4,49	4,59	102,32	4,5899
15	4,55	4,61	101,22	1,0883
16	4,34	4,44	102,20	4,0861
17	7,60	7,54	99,18	1,0007
18	7,34	7,52	102,43	5,0724
19	7,50	7,57	100,88	0,4867
20	7,56	7,55	99,85	0,1099

Το σύνολο των αποτελεσμάτων υφίσταται την ίδια στατιστική επεξεργασία με τις επιμέρους ομάδες, οπότε έχουμε τα ακόλουθα αποτελέσματα:

Μέσος όρος: 100,14 %

$$\text{Διακύμανση: } s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1} = 2,556\%$$

Τυπική απόκλιση: $s=1,599$ %

$$\text{Σχετική τυπική απόκλιση: } rsd = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 = 1,596\%$$

Όρια εμπιστοσύνης για κάθε τιμή. για 19 βαθμούς ελευθερίας και πιθανότητα 95 % ($t_{19}=2,093$)

$$\bar{x} - t \cdot s < \mu < \bar{x} + t \cdot s \Rightarrow \mu = \pm 3,347\%$$

ενώ τα όρια εμπιστοσύνης για την μέση τιμή είναι

$$\bar{x} - \frac{t \cdot s}{\sqrt{n}} < \mu < \bar{x} + \frac{t \cdot s}{\sqrt{n}} \Rightarrow \mu = \pm 0,748\%$$

Σύγκριση των 2 μέσων τιμών

Αυτή γίνεται υπολογίζοντας τη συνδυασμένη τυπική απόκλιση

$$s_{1-2} = \sqrt{\frac{\sum_i^{n_1} (x_i - \bar{x}_1)^2 + \sum_j^{n_2} (x_j - \bar{x}_2)^2}{n_1 + n_2 - 2}} \Rightarrow s_{1-2} = 1,642\%$$

και στη συνέχεια υπολογίζοντας και το t_{exp} με την παρακάτω σχέση

$$t_{\text{exp}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s_{1-2}} \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}} = \frac{|100,19 - 99,87|}{1,338} \cdot \sqrt{\frac{17 \cdot 12}{(17+12)}} = 1,762$$

Για 18 βαθμούς ελευθερίας ($10+10-2=18$) και για στάθμη εμπιστοσύνης 95 % η θεωρητική τιμή του t είναι $t=2,101$ και είναι κατά πολύ μεγαλύτερη της πειραματικής τιμής. Δεν υπάρχει δηλαδή στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 μέσων όρων.

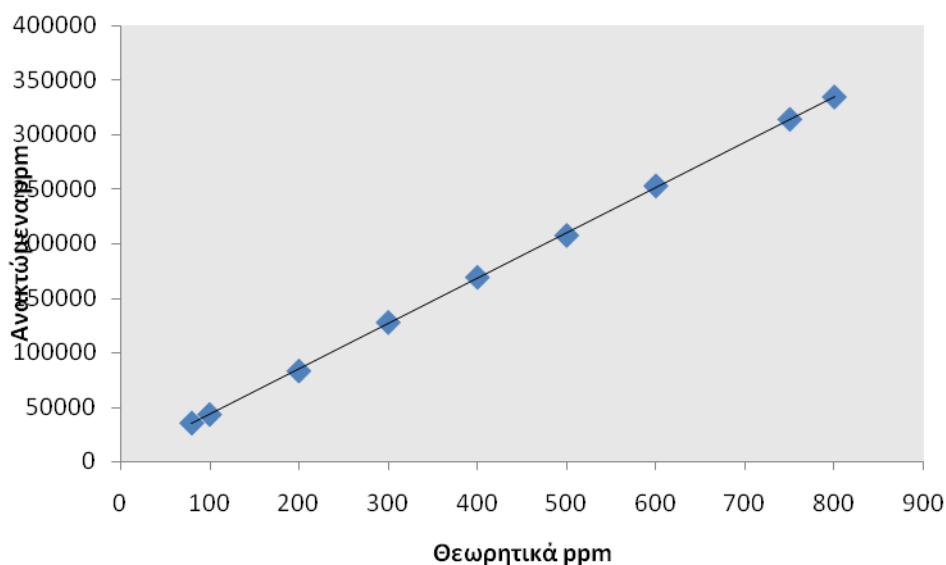
ΙΣΤ.5.5. Ακρίβεια

Για την ακρίβεια (accuracy) της μεθόδου, σε σταθερή ποσότητα διαλύματος καρβεδιλόλης και PVP προστίθενται διαφορετικές ποσότητες της δραστικής ουσίας και μετράται πειραματικά η συγκέντρωση των διαλυμάτων. Στη συνέχεια συγκρίνεται η ανακτώμενη σε σχέση με την προστιθέμενη ποσότητα.

Πίνακας ΙΣΤ.5.7. Δεδομένα ακρίβειας της καρβεδιλόλης στη μέθοδο ΧΜ4.

Προστιθέμενα ppm	Ανακτώμενα ppm	% ανάκτηση	% σφάλμα
2,49	2,52	101,09	1,09
2,49	2,50	100,46	0,46
2,49	2,45	98,43	-1,57
4,65	4,63	99,63	-0,37
4,65	4,64	99,92	-0,08
4,65	4,48	96,35	-3,65
7,49	7,47	99,79	-0,21
7,49	7,44	99,42	-0,58
7,49	7,49	99,99	-0,01
7,49	7,48	99,85	-0,15

Μέσο σφάλμα 0,82



Σχήμα ΙΣΤ.5.10. Απεικόνιση της γραμμικότητας για τον έλεγχο της ακρίβειας της μεθόδου ΧΜ4 για την καρβεδιλόλη.

Η γραμμικότητα του διαγράμματος ΙΣΤ.5.10. δίνεται από τη σχέση

$$[\text{ανακτώμενα } \rho_{rb}] = 0,9983 \cdot [\text{θεωρητικά } \rho_{rb}] - 0,0178$$

με συντελεστή γραμμικότητας

$$R^2 = 0,9994$$

Η κλίση της παραπάνω εξίσωσης τείνει στο 1, δηλαδή δεν υπάρχει αναλογικό σφάλμα. Όσο αφορά στον σταθερό όρο, αυτός τείνει στο μηδέν, οπότε δεν υπάρχει πιθανότητα ούτε σταθερού σφάλματος.

ΙΣΤ.5.6. Ανθεκτικότητα (Ruggedness)

Με σκοπό την προσέγγιση της ανεκτικότητας της μεθόδου προσδιορισμού της καρβεδιλόλης σε μικρές αλλαγές στις συνθήκες, καταγράφηκαν τα χαρακτηριστικά της κορυφής σε διακυμάνσεις του οργανικού διαλύτη της κινητής φάσης $\pm 2\%$, της ροής της κινητής φάσης αλλά και του υλικού της στήλης. Η επίδραση του pH της κινητής φάσης είχε μελετηθεί κατά την ανάπτυξη της μεθόδου αποκαλύπτοντας τη σπουδαιότητά του στους χρόνους ανάσχεσης τόσο της καρβεδιλόλης όσο και των γνωστών της παραπροϊόντων σύνθεσης και προϊόντων διάσπασης.

Οι τιμές που παρακολουθούνται κατά τον έλεγχο της ανθεκτικότητας της μεθόδου είναι:

- ▲ η ασυμμετρία της κορυφής, ο λόγος δηλαδή τμημάτων στο εύρος της κορυφής στο 10 % του ύψους της,

$$T = \frac{b_{0,1}}{a_{0,1}} \quad \text{Εξίσωση ΙΣΤ.1}$$

όπου $b_{0,1}$ η απόσταση από το μέγιστο της κορυφής μέχρι το τέλος της κορυφής και $a_{0,1}$ η απόσταση από το μέτωπο της κορυφής έως το μέγιστο.

- ▲ ο αριθμός των θεωρητικών πλακών, στο 10 % του ύψους.

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 \quad \text{Εξίσωση ΙΣΤ.2}$$

όπου t_R ο χρόνος ανάσχεσης της κορυφής και w το εύρος της κορυφής.

- ▲ και η χωρητικότητα της στήλης εξεφρασμένη με την τιμή K του παράγοντα χωρητικότητας

$$K = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad \text{Εξίσωση ΙΣΤ.3}$$

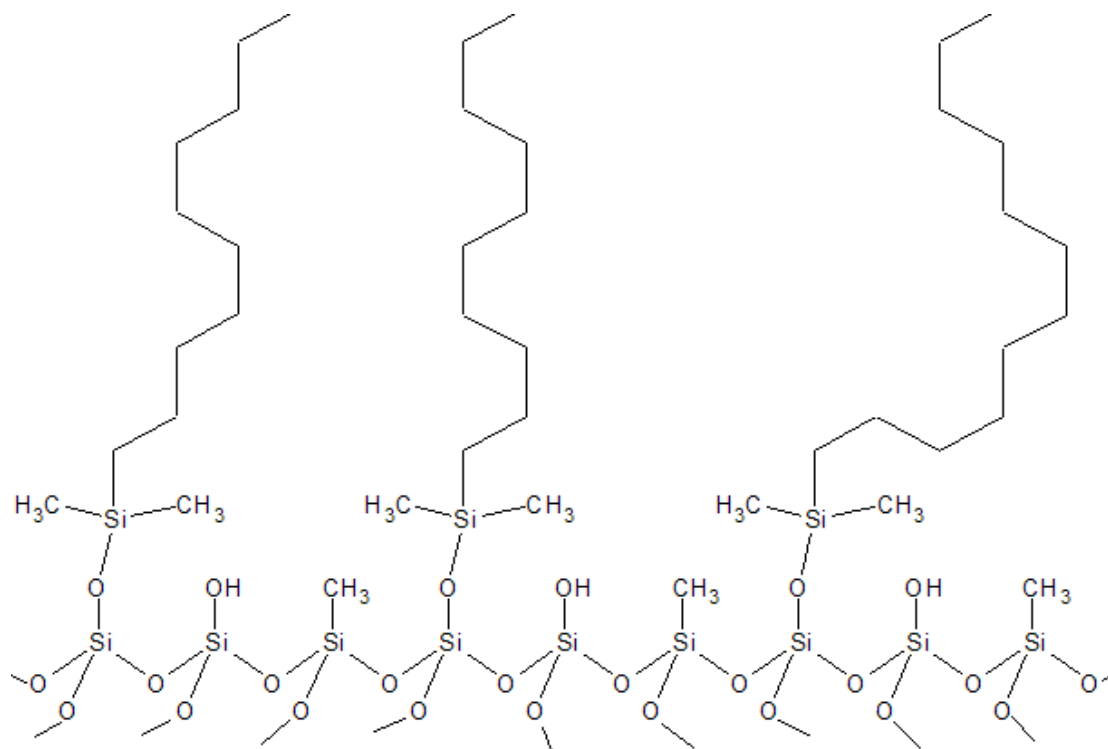
Στον πίνακα ΙΣΤ.5.8. παρουσιάζονται τα χρωματογραφικά χαρακτηριστικά της καρβεδιλόλης όταν η σύσταση της κινητής φάσης έχει μεταβληθεί από 40 % ακετονιτριλίου σε 42 % και σε 38 % (± 2 % του οργανικού διαλύτη) ή όταν η ροή έχει μεταβληθεί σε 0,6 mL/min ή 1,0 mL/min.

Πίνακας ΙΣΤ.5.8. Χαρακτηριστικά χρωματογραφίας για την καρβεδιλόλη, στο πρότυπο διάλυμα (Π) και στο δείγμα (Δ), στις συνθήκες της μεθόδου XM4 και στις αλλαγές που εφαρμόστηκαν για να διαπιστωθεί η ανεκτικότητα της μεθόδου.

	K Δ	RT (rsd %)	Εμβαδόν (rsd%)	Ασυμμετρία	Θεωρητικές πλάκες	Χωρητικότητα Στήλης	Λόγος Δ/Π
	Π	3,53 (0,04 %)	357789 (0,18 %)	1,234	3350	16,68	1,0076
	Δ	3,53 (0,08 %)	360503 (0,31 %)	1,238	3385	16,65	
42 % ακετ.	Π	3,20 (0,00 %)	362582 (0,16 %)	1,229	3315	15,00	1,0111
	Δ	3,13 (0,23 %)	366622 (0,10 %)	1,237	3263	14,64	
38 % ακετ.	Π	4,44 (0,18 %)	361339 (0,79 %)	1,231	3701	21,19	1,0121
	Δ	4,46 (0,06 %)	365712 (0,17 %)	1,226	3763	21,29	
0,6 mL/min	Π	4,74 (0,01 %)	478489 (0,10 %)	1,335	3597	22,72	1,0056
	Δ	4,74 (0,01 %)	481173 (0,21 %)	1,330	3571	22,71	
1,0 mL/min	Π	3,19 (0,07 %)	319067 (0,13 %)	1,244	3010	14,95	1,0073
	Δ	3,18 (0,00 %)	321397 (0,15 %)	1,239	3057	14,92	

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα του πίνακα ΙΣΤ.5.8. διαπιστώνεται πως για μειωμένο ποσοστό του οργανικού διαλύτη ή για μειωμένη ροή, ο χρόνος έκλουσης της καρβεδιλόλης αυξάνεται κατά 1 λεπτό, με τις αντίστοιχες επιπτώσεις σε θεωρητικές πλάκες και χωρητικότητα στήλης. Η ασυμμετρία της κορυφής χειροτερεύει όμως όσο μειώνεται η ροή. Το ίδιο αποτέλεσμα στην έκλουση έχουν η αύξηση του ακετονιτριλίου και η αύξηση στη ροή, με τη δεύτερη να υστερεί σε χρωματογραφικό διαχωρισμό διότι μειώνονται οι θεωρητικές πλάκες του συστήματος. Γενικότερα όμως, μικρές αλλαγές σε σύσταση και ροή, όπως φαίνονται στον πίνακα, δεν επηρεάζουν σημαντικά τις κορυφές και πολύ λιγότερο τον λόγο των εμβαδών σε δείγματος προς πρότυπο, άρα και τα εξαγόμενα αποτελέσματα.

Παράλληλα εξετάζεται και η ανθεκτικότητα της μεθόδου ως προς το υλικό πλήρωσης της στήλης. Υπενθυμίζεται πως η τεχνολογία των XTerra στηλών προστατεύει με μεθυλίωση, μια στις 3 σιλανόλες, την βάση του υλικού πλήρωσης προσφέροντας σταθερότητα σε ακραίες τιμές pH αλλά και μειωμένες ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις τους με τα αναλυόμενα συστατικά.



Σχήμα ΙΣΤ.5.11 : Επιφάνεια σωματιδίων υλικού πλήρωσης στηλών XTerra. Το οξείδιο του πυριτίου είναι συνδεδεμένο με αλυσίδες C18, με ελεύθερες υδροξυλομάδες και μεθύλια σε αναλογία 1:1:1.

Η απόδοση της χρωματογραφίας, με ενδείξεις τον αριθμό των θεωρητικών πλακών, τη χωρητικότητα της στήλης και τη συμμετρία των κορυφών εξετάζεται και για χρωματογραφικές στήλες C18 που όμως χαρακτηρίζονται από άλλη τεχνολογία παρασκευής τους και πιθανώς άλλη συμπεριφορά. Οι διαστάσεις των στηλών, μήκος και διάμετρος, καθώς και η σφαιρικότητα του υλικού πλήρωσης, παραμένουν σταθερά σε κάθε περίπτωση. Έτσι, συγκρίνονται με την XTerra C18 100 mm ×4,6 mm και 5 μ, οι ακόλουθες στήλες:

Lichrosphere RP18 100 mm ×4,6 mm και 5 μ (LiRP18): απλή στήλη με τις αλυσίδες των 18 C να συνδέονται με το υπόστρωμα. Το διοξείδιο του πυριτίου του υποστρώματος έχει αρκετές ελεύθερες για αλληλεπιδράσεις σιλανόλες.

Hypersil BDS C18 100 mm ×4,6 mm και 3 μ (H-BDS): Το διοξείδιο του πυριτίου στο υπόστρωμα του υλικού της στήλης είναι ειδικά απενεργοποιημένο (specially deactivated silica) ώστε να μην υπάρχουν ελεύθερες σιλανόλες στην επιφάνεια των σωματιδίων που αλληλεπιδρούν με τα αναλυόμενα συστατικά.

Symmetry Shield 100 mm ×4,6 mm και 5 μ (SS): Η τεχνολογία των στηλών αυτών βασίζεται στην παρουσία πολικών ομάδων στη βάση των αλυσίδων C18, εκεί όπου συνδέονται με το υπόστρωμα, οι οποίες μειώνουν τις αλληλεπιδράσεις με το διοξείδιο του πυριτίου και βελτιώνουν τις χρωματογραφικές κορυφές.

Spherisorb ODS-2 100 mm ×4,6 mm και 5 μ (S-ODS): Οι ODS στήλες έχουν πλήρως απενεργοποιημένο το υπόστρωμα του υλικού πλήρωσης (fully deactivated silica), καθαρό από υπολείμματα μετάλλων που προκαλούν την οξειδωσή του.

Η σφαιρικότητα των σωματιδίων του υποστρώματος βελτιώνει τη χρωματογραφία και καθιστά πιο ομογενοποιημένες τις αλληλεπιδράσεις στην έκταση της στήλης.

Τα αποτελέσματα του ελέγχου των παραπάνω στηλών, ως χρωματογραφικά χαρακτηριστικά της κορυφής της καρβεδιλόλης σε πρότυπο διάλυμα (Δ) και σε διάλυμα δείγματος (Π) παρατίθενται στον πίνακα ΙΣΤ.5.9.

Πίνακας ΙΣΤ.5.9. Χαρακτηριστικά χρωματογραφίας για την καρβεδιλόλη, εφαρμόζοντας τις συνθήκες της μεθόδου XM4 σε διαφορετικό υλικό πλήρωσης της στήλης

Στήλη	t _R (min) ΚΔ	Ασυμμετρία	Θεωρητικές Πλάκες	Χωρητικότητα Στήλης	Αποτέλεσμα
SS	3,64 (n=10, rsd=0,13 %)	1,55 (n=10, rsd=0,30 %)	3875 (n=10, rsd=0,86 %)	16,18 (n=10, rsd=0,14 %)	Αποδεκτή
S-ODS	1,77 (n=10, rsd=0,10 %)	1,34 (n=10, rsd=1,06 %)	2508 (n=10, rsd=1,01 %)	7,86 (n=10, rsd=0,11 %)	Μη αποδεκτή, με τη συγκεκριμένη κινητή φάση.
LiRP18	7,72	1,51	3220	37,5	Ακατάλληλη
H-BDS	3,68 (n=10, rsd=0,41 %)	1,18 (n=10, rsd=0,69 %)	8398 (n=10, rsd=0,54 %)	17,36 (n=10, rsd=0,27 %)	Αρκετά καλά αποτελέσματα

Από τις στήλες που δοκιμάστηκαν, διαπιστώνεται πως στην περίπτωση της SS τα αποτελέσματα είναι καλά ενώ για την H-BDS τα αποτελέσματα είναι αρκετά πιο ικανοποιητικά και οι στήλες ενδείκνυνται για υποκατάσταση της XTerra. Πιθανώς για την SS λόγω παρόμοιας δομής και υποκατάστασης της βάσης ενώ για την H-BDS λόγω της μικρότερης διαμέτρου σωματιδίων, αλλαγή από 5 μ σε 3 μ, που επιτρέπουν καλύτερο διαχωρισμό διότι αυξάνουν την επιφάνεια αλληλεπίδρασης, για τον ίδιο όγκο υλικού στήλης. Για την προτεινόμενη H-BDS οι χρόνοι έκλυσης των γνωστών προσμίξεων της καρβεδιλόλης καθώς και του αγνώστου προϊόντος δίνονται στον πίνακα ΙΣΤ.5.10.

Πίνακας ΙΣΤ.5.10. Χρόνοι έκλυσης σε στήλη Hypersil-BDS

	Χρόνος Έκλυσης (min)
Πρόσμιξη E	2,44
Καρβεδιλόλη	3,67
ΑΠ	4,80
Πρόσμιξη C	11,92
Πρόσμιξη F	16,77
Πρόσμιξη B	20,29

Για την S-ODS στήλη, ο χρόνος έκλυσης της καρβεδιλόλης είναι πολύ μικρός, ίδιος με των εκδόχων, και η στήλη είναι ακατάλληλη για αντικατάσταση της XTerra, τουλάχιστον κρατώντας σταθερές τις υπόλοιπες χρωματογραφικές συνθήκες (σύσταση κινητής φάσης, θερμοκρασία και διαλύτη δειγμάτων). Ίσως στην περίπτωση αυτή, λόγω της προστασίας των σιλανολών, δεν υπάρχουν αλληλεπιδράσεις με το διοξείδιο του πυριτίου που θα παρέτειναν την παραμονή της καρβεδιλόλης στην στήλη. Στην περίπτωση της LiRP18 που είναι η πιο απλή μορφή C18 στήλης που ελέγχθηκε, το μη προστατευμένο υλικό της στήλης καθυστερεί με έντονες αλληλεπιδράσεις μέχρι τα 7,7 min την έκλυση της καρβεδιλόλης. Όμως το φαινόμενο αυτό είναι μη επιθυμητό στη χρωματογραφία διότι έχει επιπτώσεις τόσο στη συμμετρία της κορυφής όσο και στον αριθμό των θεωρητικών πλακών. Αν και η καρβεδιλόλη στην περίπτωση αυτή εκλύεται σε διπλάσιο χρόνο από την XTerra, οι θεωρητικές πλάκες παραμένουν ίδιες και αποδίδεται στη μη ουσιαστική βελτίωση της χρωματογραφίας.

ΙΣΤ.6. Καρβεδιλόλη -Προσαρμογή αναλυτικής χρωματογραφικής διάταξης σε LC-ESI-MS

ΙΣΤ.6.1. Εισαγωγή

Η ανάγκη να μελετηθεί η αστάθεια του αγνώστου προϊόντος, όπως αυτή έχει διαπιστωθεί χρωματογραφικά, οδηγεί στην προσαρμογή της μεθόδου εργασίας και των παραμέτρων της ώστε να είναι συμβατή με τις απαιτήσεις της διάταξης LC-MS.

Χρησιμοποιείται ανιχνευτής μάζας Finnigan AQA με ιονισμό μέσω ηλεκτροδιάχυσης (ESI), δυναμικό ακίδας 3,0 kV και κώνου εισόδου 20 V. η καταγραφή και επεξεργασία των δεδομένων γίνεται με το αντίστοιχο πρόγραμμα Xcalibur IBM.

ΙΣΤ.6.2. Επιλογή συνθηκών – Προσαρμογή XM4

Η χρωματογραφική ανάλυση με ανιχνευτή μάζας διαφέρει σε σημαντικά σημεία από αυτήν με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού. Τα φωσφορικά άλατα που προτιμούνται στα ρυθμιστικά διαλύματα σε αναλύσεις UV-vis εξαιτίας της χαμηλής τους απορρόφησης, αποφεύγονται στους φασματογράφους μάζας λόγω της μικρής πτητικότητάς τους και της επακόλουθης συσσώρευσής τους στα εξαρτήματα της συσκευής. Άρα μια από τις πρώτες τροποποιήσεις που πρέπει να γίνουν είναι η αλλαγή του ρυθμιστικού μέσου της κινητής φάσης. Επίσης αποφεύγεται η χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων με μεγάλη περιεκτικότητα ανόργανων ιόντων διότι επικάθονται στα ιονισμένα μόρια των αναλυόμενων ουσιών και δίνουν μάζες μεγαλύτερες από τις αναμενόμενες. Το πιο ήπιο και σύνθητες οργανικό μέσο οξύνισης, λόγω της μεγάλης πτητικότητάς του και του μικρού του μοριακού βάρους είναι το μυρμηκικό οξύ. Εξίσου εύχρηστα για τους ίδιους λόγους, στα ρυθμιστικά των κινητών φάσεων χρησιμοποιούνται οξικά και αμμωνιακά άλατα.

Επίσης, κατά την εισαγωγή τους στον φασματογράφο μάζας, οι αναλυόμενες ουσίες πρέπει να είναι σε ιονισμένη μορφή διότι, όπως είναι γνωστό, αυτό που πραγματικά μετράται είναι ο λόγος της μάζας προς το φορτίο του μορίου. Στο σημείο αυτό χρησιμοποιούμε τα συμπεράσματα της μελέτης της χρωματογραφικής συμπεριφοράς του αγνώστου προϊόντος σε σχέση με την

καρβεδιλόλη σε διάφορα φαινομενικά pH της κινητής φάσης. Λόγω λοιπόν της δομής της η καρβεδιλόλης είναι πλήρως ιονισμένη ακόμη και σε ελαφρά όξινο περιβάλλον ενώ στο άγνωστο προϊόν μειώνεται σημαντικά ο ιονισμός του όταν το φαινομενικό pH της κινητής φάσης ξεπερνά την τιμή του 4.

Έτσι επιλέγουμε να αλλάξουμε το pH του υδατικού μέρους της κινητής φάσης σε 2,7, ουσιαστικά κινητή φάση ελαφρά οξυνισμένη με μυρμηκικό οξύ, 800 $\mu\text{L/l}$.

Η ροή της κινητής φάσης που εισέρχεται στον φασματογράφο μάζας πρέπει να είναι μικρότερη του 0,5 mL/min για να προλαβαίνουν να ιονιστούν όλα τα μόρια που εκλύονται κάθε στιγμή. Επειδή στο χρωματογραφικό σύστημα εργασίας, δεν υπάρχει ρυθμιστής της ποσότητας που οδηγείται στον ιονιστή, πρέπει η ροή της μεθόδου να είναι μικρή. Επιλέγεται η ροή 0,3 mL/min, μικρότερη της μέγιστης ενδεικνυόμενης για τον ανιχνευτή μάζας και λιγότερο από τη μισή της μεθόδου XM4. Για να προληφθεί ο τριπλασιασμός του χρόνου κάθε εισαγωγής, αυξάνεται η περιεκτικότητα του ακετονιτριλίου στην κινητή φάση από 33 % σε 50 %. Το ενδεχόμενο να αλλάξει ο διαχωρισμός των εκλουόμενων ουσιών δεν αποτελεί πρόβλημα διότι η διακριτική ικανότητα του φασματογράφου μάζας επιτρέπει την ανίχνευση συνεκλουόμενων ουσιών όταν έχουν διαφορετικό λόγο μάζα/φορτίο.

Για ροή 0,3 mL/min συνιστάται από τον παρασκευαστή να γίνεται η ρύθμιση της θερμοκρασίας του κώνου του ανιχνευτή στους 250 °C ενώ το εύρος των παρακολουθούμενων μαζών θα καθοριστεί από τις ενδείξεις των συνεκλουόμενων μορίων. Ως διαλύτης των δειγμάτων επιλέγεται η κινητή φάση, που δεν παρουσιάζει προβλήματα συμβατότητας και που διαλυτοποιεί πιο εύκολα την καρβεδιλόλη.

Οι νέες χρωματογραφικές συνθήκες αποτελούν την μέθοδο XM5 και στον πίνακα ΙΣΤ.6.1 συσχετίζεται με τις προηγούμενες μεθόδους.

Πίνακας ΙΣΤ.6.1. Συνθήκες μεθόδου XM4 που τροποποιούνται και προσαρμόζονται σε συμβατές με LC-MS παραμέτρους.

Προσαρμογή XM4 σε LC-MS

Κωδικός	Συνθήκες	Παρατηρήσεις
XM5	(1) XTerra C18 100 mm x 4,6 mm, 5μm (2) νερό/ακετονιτρίλιο 1/1/ με 400 μL μυρμηκικό οξύ/L και φαινομενικό pH 3,2 (3) 30 °C (4) 0,3 mL/min (5) T _{ms} ^o = 250 °C	Η M3 αλλάζει για να είναι συμβατή με MS. Η ροή της κινητής φάσης, για να είναι συμβατή με τον ιονιστή του MS γίνεται 0,3mL/min και για τη ροή αυτή προτεινόμενη θερμοκρασία εργασίας είναι οι 250 °C. Το παράθυρο παρακολούθησης έχει μεγάλο εύρος από 200 m/z έως 1000 m/z. Ως κινητή φάση κρατείται μίγμα νερού ακετονιτριλίου σε αναλογία όμως 1:1 και οξυνίζεται ελαφρά με μυρμηκικό οξύ.

Στη νέα μέθοδο ελέγχονται οι χρόνοι ανάλυσης καθώς και οι χαρακτηριστικές μάζες καρβεδιλόλης, PVP, αγνώστου προϊόντος καθώς και των imp B, C, E, F. Η μέθοδος ελέγχεται ως προς την γραμμικότητα και την επαναληψιμότητα. Η προσαρμοσμένη αυτή μορφή της XM4 σκοπό έχει να επιβεβαιώσει τόσο με τον χρόνο ανάλυσης όσο και με ανιχνευτή μάζας, σαν μια δεύτερη χρωματογραφική μέθοδο. Για τον σκοπό, λοιπόν αυτό, αξιολογούνται ως μη απαραίτητα ο έλεγχος της ακρίβεια, της επαναληψιμότητας μια άλλη χρονική στιγμή και της ανθεκτικότητας της μεθόδου.

ΙΣΤ.6.3. Χρόνοι ανάλυσης-Μάζες παρακολούθησης

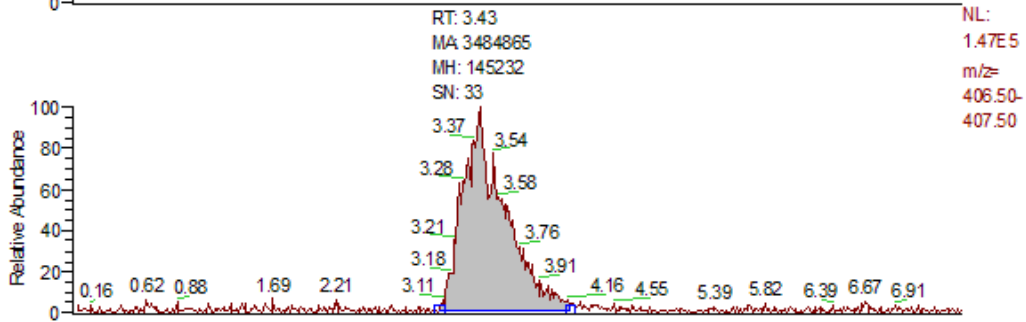
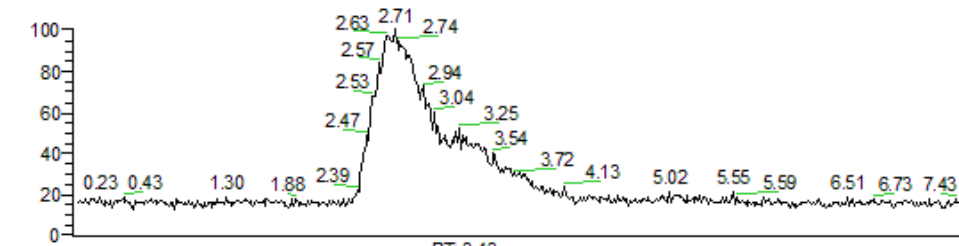
Εισάγονται στο σύστημα όλες οι μελετώμενες και οι πιθανώς εμφανιζόμενες ουσίες και καταγράφονται οι χρόνοι ανάλυσης τους μαζί με τις χαρακτηριστικές μάζες.

Πίνακας ΙΣΤ.6.2. Πίνακας με χρόνους και σήμα των σημαντικότερων ουσιών στην ανάλυση της XM5 καρβεδιλόλης με LC-MS.

Ουσία	t _{ανάλυσης} (min)	Σήμα (m/z)	Σχήμα
Καρβεδιλόλη	3,9	407,5	ΙΣΤ.6.1
PVP	8,5	332,0	ΙΣΤ.6.2
Πρόσμιξη B	3,1	645,0	ΙΣΤ.6.3
Πρόσμιξη C	4,5	497,2	ΙΣΤ.6.4
Πρόσμιξη E	6,0	258,0	ΙΣΤ.6.5
Πρόσμιξη F	3,3	557,0	ΙΣΤ.6.6
□ αγνωστο προϊόν	8,9	423,0	ΙΣΤ.6.7

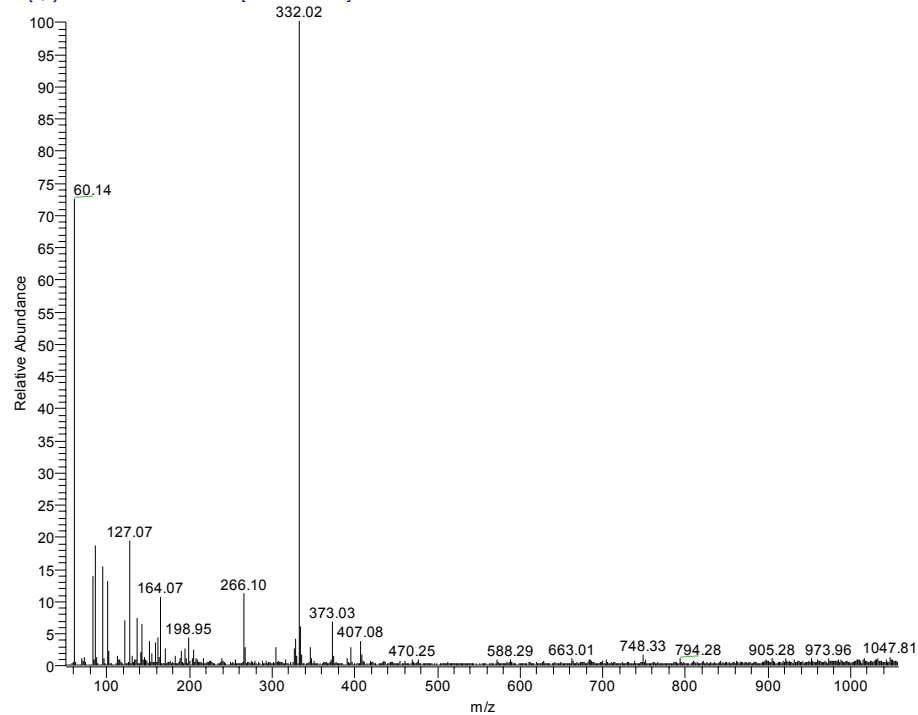
RT: 0.00 - 7.48

NL:
1.08E6
TIC MS



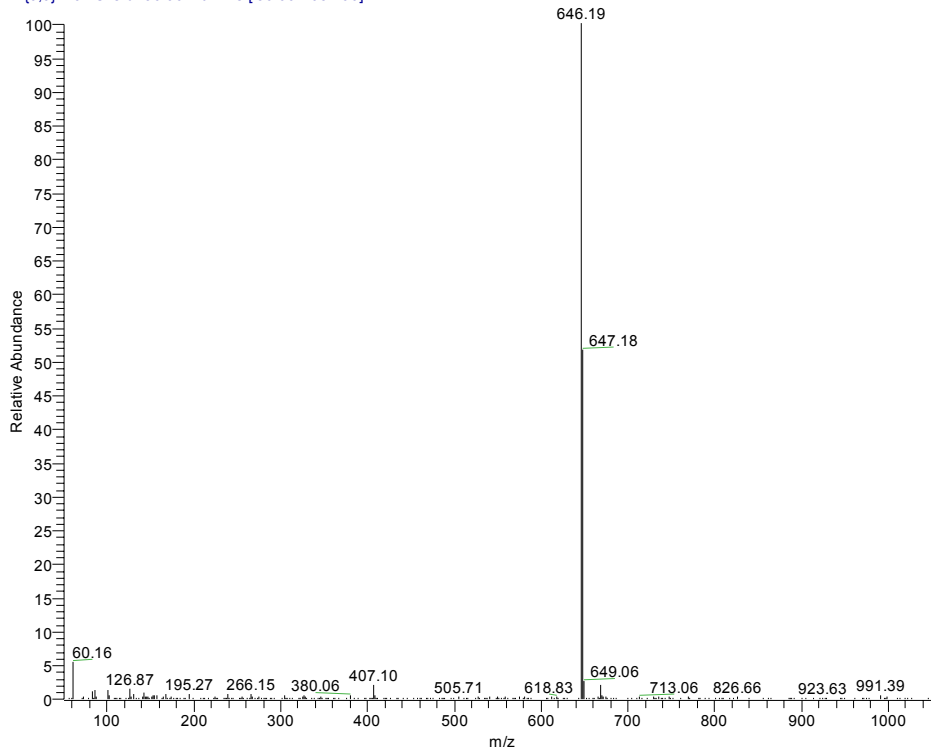
Σχήμα ΙΣΤ.6.1. Χρωματογράφημα παρακολούθησης καρβεδιλόλης με τη μέθοδο ΧΜ5.

run #8-749 RT: 0.15-11.39 AV: 742 NL: 6.78E4
T: {0,0} + c ESI sid=30.00 Full ms [50.00-1057.00]



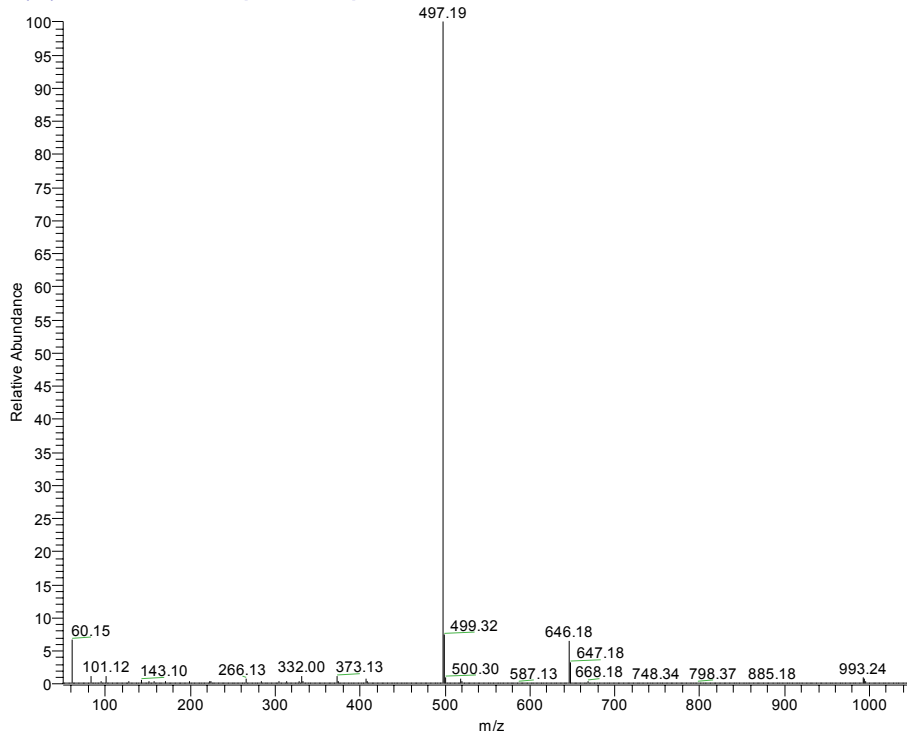
Σχήμα ΙΣΤ.6.2. Σήμα παρακολούθησης PVP με τη μέθοδο ΧΜ5.

impB#1 RT: 0.04 AV: 1 NL: 8.26E5
T: {0,0} + c ESI sid=30.00 Full ms [50.00-1057.00]



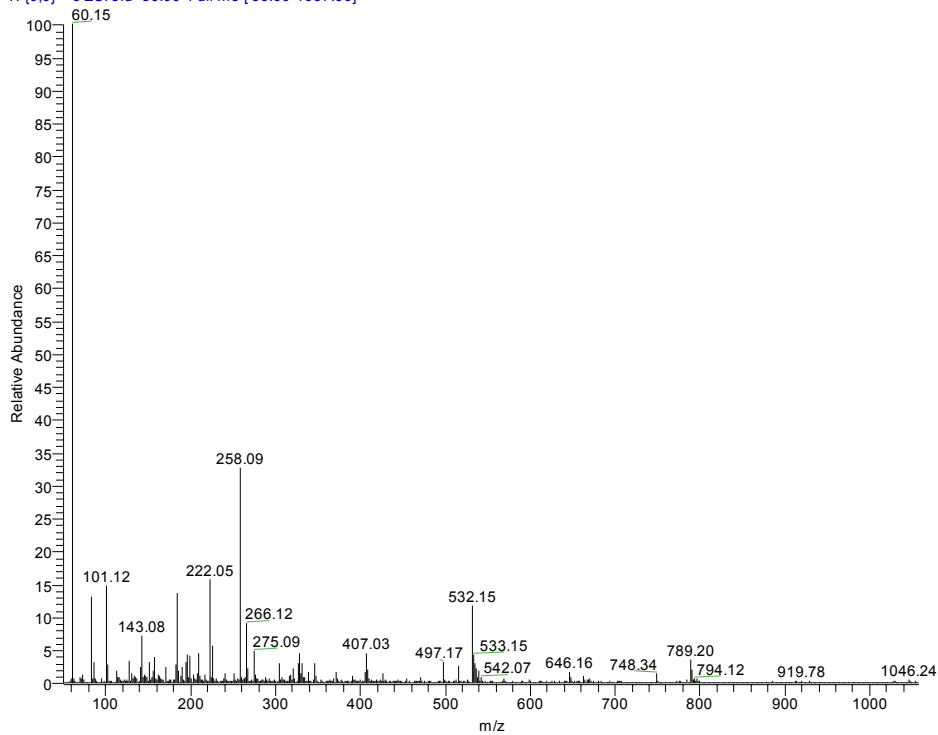
Σχήμα ΙΣΤ.6.3. Σήμα παρακολούθησης πρόσμιξης Β με τη μέθοδο ΧΜ5.

imp C#3-611 RT: 0.07-9.29 AV: 609 NL: 9.40E5
T: {0,0} + c ESI sid=30.00 Full ms [50.00-1057.00]



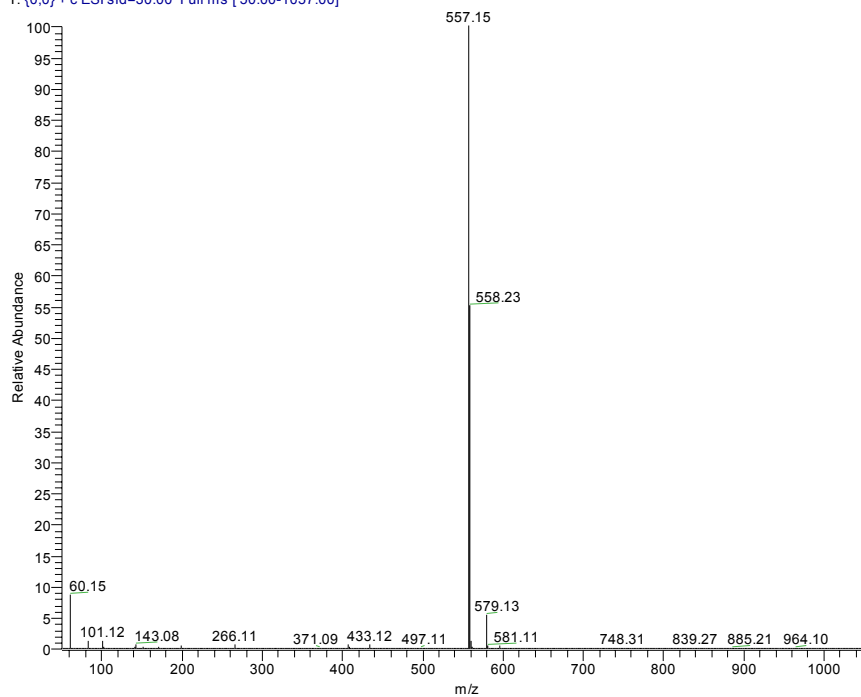
Σχήμα ΙΣΤ.6.4. Σήμα παρακολούθησης πρόσμιξης C με τη μέθοδο ΧΜ5.

imp E #2-616 RT: 0.06-9.37 AV: 615 NL: 7.23E4
T: {0,0} + c ESI sid=30.00 Full ms [50.00-1057.00]



Σχήμα ΙΣΤ.6.5. Σήμα παρακολούθησης πρόσμιξης E με τη μέθοδο ΧΜ5.

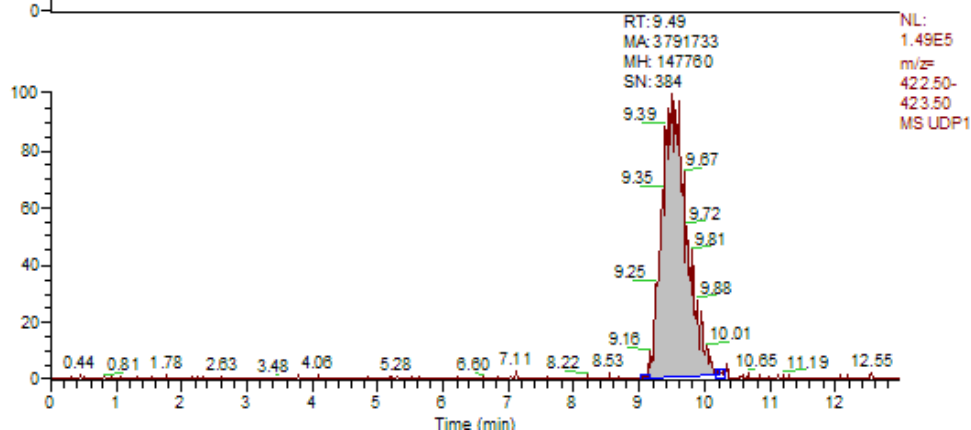
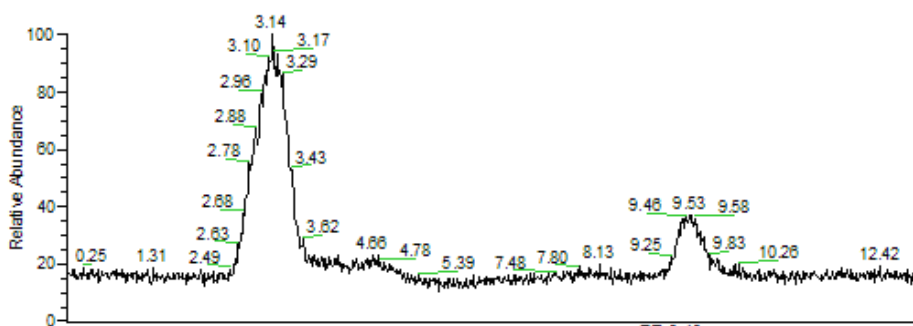
imp F #15-551 RT: 0.25-8.38 AV: 537 NL: 8.32E5
T: {0,0} + c ESI sid=30.00 Full ms [50.00-1057.00]



Σχήμα ΙΣΤ.6.6. Σήμα παρακολούθησης πρόσμιξης F με τη μέθοδο ΧΜ5.

RT: 0.00 - 12.99

NL:
1.38E8
TIC MS
UDP1



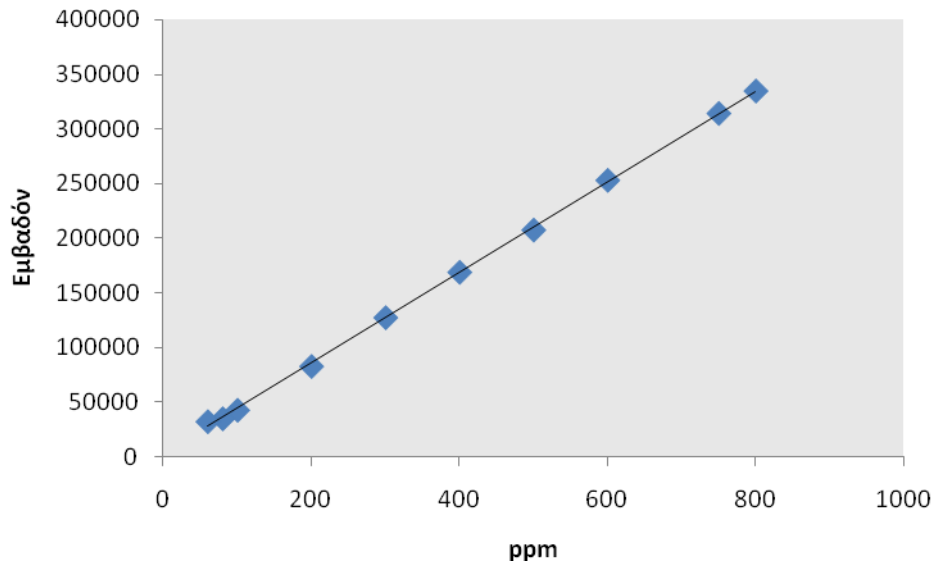
Σχήμα ΙΣΤ.6.7. Παρακολούθησης αγνώστου προϊόντος με τη μέθοδο ΧΜ5.

ΙΣΤ.6.4. Γραμμικότητα

Η γραμμικότητα της μεθόδου για την καρβεδιλόλη ελέγχθηκε στην περιοχή των 60 έως 1000 ppb, διότι η χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση του αγνώστου προϊόντος στην LC-MS χρωματογραφία δεν πρόκειται να ξεπεράσει τις τιμές αυτές. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα ΙΣΤ.6.3.

Πίνακας ΙΣΤ.6.3. Δεδομένα γραμμικότητα της καρβεδιλόλης στη μέθοδο ΧΜ5

ppb	Εμβαδόν κορυφής
1000	441716
800	334869
750	314316
600	253138
500	207551
400	168978
300	127458
200	82846
100	42783
80	34960
60	32279



Σχήμα ΙΣΤ.6.8. Γραμμικότητα της μεθόδου ΧΜ5 για την καρβεδιλόλη

Η γραμμικότητα των τιμών του πίνακα ΙΣΤ.6.3 που αποδίδεται στο διάγραμμα ΙΣΤ.6.8 είναι

$$[\text{εμβαδόν}] = 427,90[\text{ppb}] - 840,16$$

$$\text{με } R^2 = 0,9979.$$

Η τυπική απόκλιση της κλίσης είναι $s_a = 6,499$

Η τυπική απόκλιση σταθερού παράγοντα είναι $s_b = 3463,36$

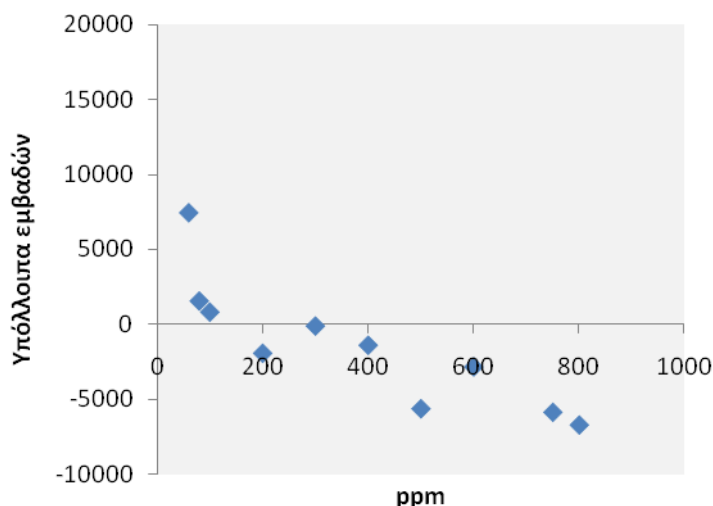
Για $P=95\%$ και για $n-2=9$ βαθμούς ελευθερίας, $t_9=2,262$, τα όρια εμπιστοσύνης για την κλίση είναι

$$a \pm t \cdot s_a \Rightarrow 413,20 < a < 442,64$$

ενώ τα αντίστοιχα όρια για τον σταθερό παράγοντα είναι

$$b \pm t \cdot s_b \Rightarrow -8674,28 < b < 6993,96$$

Το διάγραμμα των υπολοίπων που αντιστοιχεί στην γραμμικότητα του διαγράμματος ΙΣΤ.6.8 είναι αυτό του σχήματος ΙΣΤ.6.9.



Σχήμα ΙΣΤ.6.9 : Γράφημα υπολοίπων των δεδομένων γραμμικότητας της μεθόδου ΧΜ5.

Το άθροισμα των υπολοίπων είναι της τάξης του 10^{-14} και θεωρείται προσεγγιστικά μηδέν.

ΙΣΤ.6.5. Πιστότητα

Για την πιστότητα της μεθόδου παρασκευάζονται δείγματα καθαρής καρβεδιλόλης και συγκρίνεται η πειραματικά υπολογιζόμενη συγκέντρωση με την θεωρητική.

Η πιστότητα της μεθόδου ελέγχεται σε όλο το εύρος εργασίας και τα αποτελέσματα δίνονται στον πίνακα ΙΣΤ.6.4.

Πίνακας ΙΣΤ.6.4. Λεδομένα πιστότητας καρβεδιλόλης στην περιοχή εργασίας της μεθόδου ΧΜ5.

a/a	Υπολογιζόμενη περιεκτικότητα (ppb)	Θεωρητική περιεκτικότητα (ppb)	% ανάκτηση	$(x_i - x_{\text{μέσο}})^2$
1	294,3	296,4	99,30	0,6871
2	302,0	295,2	102,29	4,6608
3	320,1	314,4	101,81	2,8274
4	592,1	592,8	99,88	0,0638
5	595,0	590,4	100,78	0,4290
6	672,6	667,2	100,81	0,4598
7	939,6	963,3	97,54	6,7274
8	957,0	959,4	99,75	0,1425
9	1030,5	1021,8	100,85	0,5209
10	1065,6	1084,2	98,29	3,3949

Η στατιστική εκτίμηση της δεύτερης ομάδας αποτελεσμάτων δίνει τα ακόλουθα νούμερα:

Μέσος όρος: 100,13 %

$$\text{Διακύμανση: } s_a^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1} = 2,213\%$$

Τυπική απόκλιση: $s_a = 1,487\%$

$$\text{Σχετική τυπική απόκλιση: } rsd = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 = 1,486\%$$

Όρια εμπιστοσύνης για κάθε τιμή. για 9 βαθμούς ελευθερίας και πιθανότητα 95 % ($t_9 = 2,262$)

$$\bar{x} - t \cdot s < \mu < \bar{x} + t \cdot s \Rightarrow \mu = \pm 3,363$$

ενώ τα όρια εμπιστοσύνης για την μέση τιμή είναι

$$\bar{x} - \frac{t \cdot s}{\sqrt{n}} < \mu < \bar{x} + \frac{t \cdot s}{\sqrt{n}} \Rightarrow \mu = \pm 1,064\%$$

ΙΣΤ.7. Καρβεδιλόλη -Ημιπαρασκευαστική μέθοδος

Η μετατροπή μιας αναλυτικής μεθόδου σε ημιπαρασκευαστική υπόκειται σε κάποιους γενικούς και απλούς κανόνες¹⁵⁵. Αρχικά, θεωρείται δεδομένο πως το υλικό πλήρωσης της στήλης παραμένει το ίδιο, όπως άλλωστε και η σύσταση της κινητής φάσης, ώστε ο διαχωρισμός να συνεχίσει να πραγματοποιείται με της ίδιας έντασης φυσικά και χημικά φαινόμενα. Αλλάζουν οι διαστάσεις τις στήλης ώστε να αυξηθεί η χωρητικότητά της και η αλλαγή αυτή εξαρτάται από το μήκος της στήλης και το τετράγωνο της διαμέτρου της. Κατά το «βήμα» αυτό της μετατροπής, υπολογίζεται η ροή της νέας μεθόδου, ώστε οι χρόνοι έκλουσης να μην αλλάζουν, και η μέγιστη συγκέντρωση δείγματος που μπορεί να «φορτωθεί» στη στήλη δίχως να αλλάξει η χρωματογραφία. Δίδεται προσοχή πάντα στη διαχωριστότητα της ημιπαρασκευαστικής μεθόδου και ελέγχεται εάν αυτή είναι αποδεκτή.

Για την απομόνωση του αγνώστου προϊόντος η μέθοδος XM4 μετατρέπεται σε ημιπαρασκευαστική και εφαρμόζονται τα παραπάνω. Χρησιμοποιώντας στήλη με μεγαλύτερη διάμετρο (4,6 mm → 7,6 mm) και διατηρώντας το ίδιο υλικό πλήρωσης C18 H ροή της κινητής φάσης και η εισαγόμενη ποσότητα δείγματος συνδέονται με την αρχική μέθοδο με τις σχέσεις:

$$\rho\acute{o}\eta_{\eta\mu\iota\pi\alpha\rho.} = \rho\acute{o}\eta_{\alpha\nu\alpha\lambda} \left(\frac{\text{δίαμετρος}_{\eta\mu\iota\pi\alpha\rho}}{\text{δίαμετρος}_{\alpha\nu\alpha\lambda}} \right)^2 \quad \text{Εξίσωση ΙΣΤ.4}$$

$$\text{Συντελεστής μετατροπής} = \frac{(\text{δίαμετρος}_{\eta\mu\iota\pi\alpha\rho})^2}{(\text{δίαμετρος}_{\alpha\nu\alpha\lambda})^2} \times \frac{\mu\acute{\eta}\kappa\omicron\varsigma_{\eta\mu\iota\pi\alpha\rho}}{\mu\acute{\eta}\kappa\omicron\varsigma_{\alpha\nu\alpha\lambda}} \quad \text{Εξίσωση ΙΣΤ.5}$$

όπου η δεύτερη δείχνει πόσο αυξάνεται η χωρητικότητα της στήλης στην ημιπαρασκευαστική τεχνική σε σχέση με την αναλυτική.

Εφαρμόζοντας τις παραμέτρους της μεθόδου XM4, που επιτυγχάνει καλό διαχωρισμό, έχουμε για την ημιπαρασκευαστική μέθοδο εφαρμοζόμενη ροή

$$\rho\acute{o}\eta_{\eta\mu\iota\pi\alpha\rho.} = 0,8\text{ml} / \text{min} \frac{7,8\text{mm}}{4,6\text{mm}} = 2,30\text{mL} / \text{min}$$

και «βήμα» της μετατροπής

$$\frac{(7,8)^2}{(4,6)^2} \times \frac{100}{250} = 1,15$$

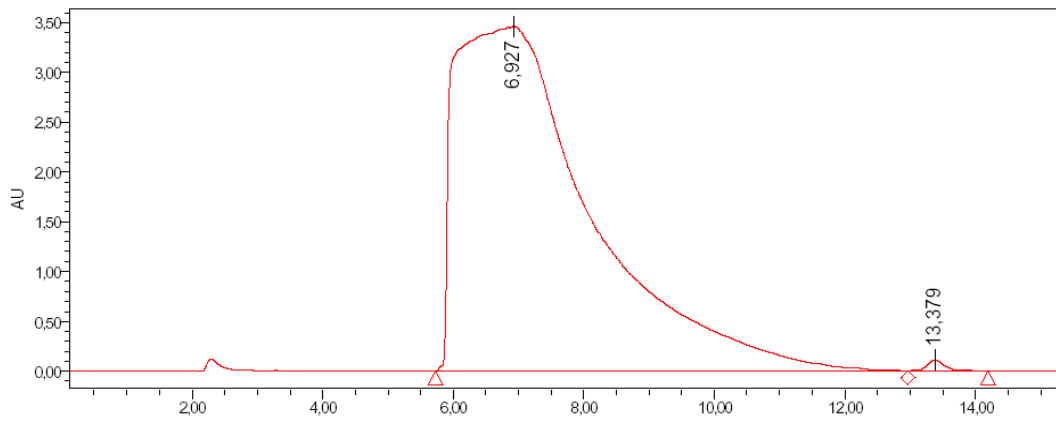
Από το αποτέλεσμα, φαίνεται πως αν και σχεδόν διπλασιάστηκε η διάμετρος της στήλης, το μήκος της, για λόγους κόστους, ήταν πιο μικρό από την αρχική. Έτσι το κέρδος στην χωρητικότητα της στήλης μοιάζει να είναι ανύπαρκτο. Το γεγονός όμως πως το άγνωστο προϊόν, του οποίου η απομόνωση αποτελεί και το αντικείμενο της μεθόδου, δεν επηρεάζεται από τον κορεσμό της στήλης σε καρβεδιλόλη, επιτρέπει στην ημιπαρασκευαστική μέθοδο να χρησιμοποιηθεί μεγαλύτερη συγκέντρωση δείγματος, στη συγκεκριμένη περίπτωση μίγμα PVP με καρβεδιλόλη, που φυλάσσονται για την παρασκευή αγνώστου προϊόντος.

Πίνακας ΙΣΤ.7.1. Συνθήκες μεθόδου ΧΜ4 που τροποποιούνται και προσαρμόζονται σε ημιπαρασκευαστική χρωματογραφία

Κωδικός	Συνθήκες	Παρατηρήσεις
M6	(1) Symmetry C18 100 mm x7,8 mm, 5 μm (2) ρυθμιστικό φωσφορικών pH 3,8 53 %, ακετονιτρίλιο 47 % (4) 2,3 mL/min (5) UV 240 nm	Η συγκέντρωση του δείγματος που εισάγεται δεν υπόκειται σε κάποιον άλλο περιορισμό παρά να εκλούει καθαρό άγνωστο προϊόν.

Χρησιμοποιώντας δείγμα μίγματος καρβεδιλόλης και PVP (1:1) ~160 mg σε 50 mL κινητής φάσης, εισάγοντας στη στήλη 250 μL, και παρατηρώντας το σήμα του ανιχνευτή για 10 λεπτά, διαπιστώνεται πως η έκλυση του αγνώστου προϊόντος δεν επηρεάζεται από τη διάρκεια έκλυσης της μεγάλης συγκέντρωσης της καρβεδιλόλης. Στο χρωματογραφικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε για την ημιπαρασκευαστική διαδικασία είχε απενεργοποιηθεί ο καταγραφέας, για το λόγο αυτό δεν υπάρχουν σχετικά χρωματογραφήματα.

Το έκλυσμα που αντιστοιχεί στο άγνωστο προϊόν συλλέγεται μετά από κάθε εισαγωγή και διατηρείται σε διαρκώς ανανεωμένο παγόλουτρο, διότι είναι γνωστή η ευπάθειά του στη θερμοκρασία. Τα κλάσματα από την κάθε εισαγωγή στο σύστημα, στο τέλος της διαδικασίας αναμιγνύονται και το μίγμα ελέγχεται με HPLC για την καθαρότητά του.



Σχήμα ΙΣΤ.7.1. Ενδεικτικό χρωματογράφημα ημιπαρασκευαστικής μεθόδου, που παρουσιάζει την διαχωριστικότητα του αγνώστου προϊόντος (έκλυση στα 13,3 min) από την καρβεδιλόλη (έκλυση στα 6,9 min). Συνθήκες μεθόδου XM4 που τροποποιούνται και προσαρμόζονται σε ημιπαρασκευαστική χρωματογραφία

ΙΣΤ.8. Μετρονιδαζόλη –Αξιολόγηση μεθόδου ελέγχου φωτοσταθερότητας

Η ανάλυση της μετρονιδαζόλης, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία και διάφορες δημοσιεύσεις^{156,157,158,159,160,161,162,163} πραγματοποιείται κυρίως χρωματογραφικά.^{164,165,166,167,168}

Για την παρακολούθηση της φωτοχημικής αποικοδόμησής της επιλέγεται η μέθοδος που δίνεται στη μονογραφία της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας για τον έλεγχο και την ανάλυση της δραστικής. Είναι αρκετά απλή και εφόσον εξασφαλίζει τον διαχωρισμό της μετρονιδαζόλης ως προς τα προϊόντα φωτοχημικής διάσπασής της, ικανοποιεί τις ανάγκες της μελέτης. Η μέθοδος διαφοροποιείται ως προς τον όγκο εισαγωγής των δειγμάτων, ο οποίος αυξάνεται από 10 µL σε 100 µL προκειμένου να επιτραπεί η καλύτερη παρακολούθηση αραιών δειγμάτων.

Χρωματογραφικές Συνθήκες

Στήλη: Inertsil ODS2 της MZ, διαστάσεων 250 mm×4,6 mm, και μέγεθος σωματιδίων 5 µm.).

Κινητή Φάση: Μίγμα 30/70 μεθανόλης /διαλύματος δισόξινου φωσφορικού καλίου 1,36 g/L

Ροή κινητής φάσης: 1 mL/min.

Ανιχνευτής UV: παρακολούθηση στα 317 nm.

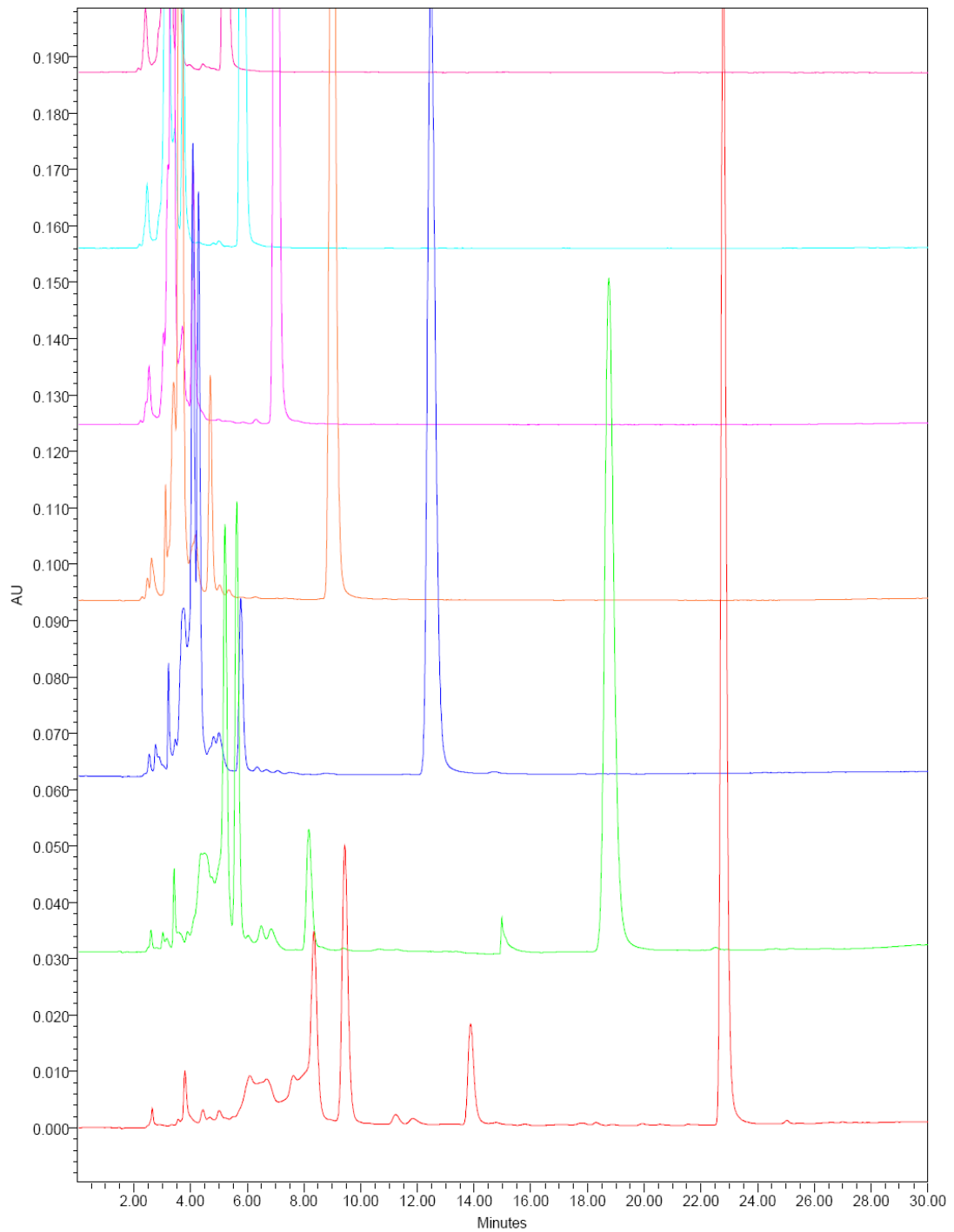
Όγκος εισαγωγής: 100 µL

ΙΣΤ.8.1. Εκλεκτικότητα

Υδατικό διάλυμα μετρονιδαζόλης υφίσταται ακτινοβολία από λυχνία τόξου αερίου Ξένου μέχρι πλήρους αποικοδόμησης του φαρμάκου. Το χρωματογράφημα του τελικού διαλύματος δε δείχνει κάποια κορυφή που να συνεκλούεται ή να παρεμποδίζει την ανάλυση του φαρμάκου.

Για να επιβεβαιωθεί η καθαρότητα της κορυφής, μερικώς φωτολυμένο διάλυμα μετρονιδαζόλης εισάγεται επανειλημμένα στον υγρό χρωματογράφο και κάθε φορά αλλάζει λίγο η σύσταση της κινητής φάσης. Συγκεκριμένα μειώνεται περίπου 5 % κάθε φορά η σύσταση της μεθανόλης στην κινητή φάση

προκειμένου να καθυστερήσει η έκλυση της μετρονιδαζόλης και να διαχωριστεί από όποιο άγνωστο προϊόν διάσπασης μπορεί να συνεκλούεται μαζί της..



Σχήμα ΙΣΤ.8.4 : Διαδοχικά χρωματογραφήματα μερικώς αποικοδομημένης μετρονιδαζόλης με διαφορετική σύσταση κινητής φάσης. Από πάνω προς τα κάτω η σύσταση της κινητής φάσης σε μεθανόλη είναι 28, 25, 20, 15, 5 και 0 %.

Παρατηρείται πως ακόμα και όταν πενταπλασιάζεται ο χρόνος έκλυσης της μετρονιδαζόλης, δεν εμφανίζεται κάποια κορυφή που να συνεκλούεται μαζί της και να προκαλεί σφάλμα στην ανάλυση.

ΙΣΤ.8.2. Γραμμικότητα

Η γραμμικότητα της μεθόδου ελέγχεται με 11 διαλύματα στην περιοχή $1,57 \times 10^{-6}$ έως $2,63 \times 10^{-4}$ Μ.

Πίνακας ΙΣΤ.8.1. Δεδομένα γραμμικότητας της χρωματογραφικής μεθόδου παρακολούθησης της φωτοχημικής αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης.

Συγκέντρωση (Μ)	Εμβαδό
$2,63 \times 10^{-4}$	14406510
$1,05 \times 10^{-4}$	5852351
$8,41 \times 10^{-5}$	4670057
$6,31 \times 10^{-5}$	3515100
$3,94 \times 10^{-5}$	2207290
$1,42 \times 10^{-5}$	784129
$9,47 \times 10^{-6}$	528166
$6,31 \times 10^{-6}$	350816
$4,73 \times 10^{-6}$	262153
$3,16 \times 10^{-6}$	172926
$2,37 \times 10^{-6}$	130970
$1,58 \times 10^{-6}$	87373

Η εξίσωση της γραμμικότητας που υπολογίζεται από τα παραπάνω δεδομένα είναι:

Εμβαδόν = $(5,4892 \times 10^{10} \pm 2,781 \times 10^8)$ Συγκέντρωση + $(1,838 \times 10^4 \pm 2,451 \times 10^4)$
και το άθροισμα των υπολοίπων είναι $2,43 \times 10^{-9}$.

ΙΣΤ.8.3. Πιστότητα

Η πιστότητα της μεθόδου ελέγχεται στην περιοχή της γραμμικότητας 2 διαφορετικές ημέρες και στο τέλος τα αποτελέσματα ελέγχονται και για την αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου.

Μέρα 1^η

Παρασκευάζονται 17 δείγματα και ελέγχονται χρωματογραφικά. Οι θεωρητικές και οι πειραματικές τιμές που υπολογίζονται παρουσιάζονται στον πίνακα:

Πίνακας ΙΣΤ.8.2. Δεδομένα 1^{ης} μέρας ελέγχου της πιστότητας της χρωματογραφικής μεθόδου παρακολούθησης της φωτοχημικής αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης

Θεωρητική Συγκέντρωση (M)	Πειραματική Συγκέντρωση (M)	%
$4,98 \times 10^{-6}$	$4,97 \times 10^{-6}$	99,7
$4,98 \times 10^{-6}$	$4,97 \times 10^{-6}$	99,9
$4,98 \times 10^{-6}$	$4,99 \times 10^{-6}$	100,2
$8,01 \times 10^{-6}$	$8,09 \times 10^{-6}$	101,0
$8,33 \times 10^{-6}$	$8,36 \times 10^{-6}$	100,5
$8,33 \times 10^{-6}$	$8,39 \times 10^{-6}$	100,7
$1,00 \times 10^{-5}$	$1,01 \times 10^{-5}$	101,0
$1,34 \times 10^{-5}$	$1,35 \times 10^{-5}$	101,4
$2,17 \times 10^{-5}$	$2,19 \times 10^{-5}$	100,9
$4,96 \times 10^{-5}$	$5,02 \times 10^{-5}$	101,1
$7,94 \times 10^{-5}$	$7,98 \times 10^{-5}$	100,5
$1,09 \times 10^{-4}$	$1,10 \times 10^{-4}$	101,2
$1,62 \times 10^{-4}$	$1,64 \times 10^{-4}$	101,3
$1,93 \times 10^{-4}$	$1,93 \times 10^{-4}$	99,9
$2,25 \times 10^{-4}$	$2,27 \times 10^{-4}$	101,1
$2,56 \times 10^{-4}$	$2,58 \times 10^{-4}$	100,8
$2,88 \times 10^{-4}$	$2,88 \times 10^{-4}$	100,1

Οι στατιστικές τιμές της πιστότητας είναι :

Μέση τιμή : 100,7 %

Τυπική απόκλιση $s=0,532$ και επί τοις εκατό διακύμανση: 0,53 %.

Τα όρια εμπιστοσύνης για 16 βαθμούς ελευθερίας και επίπεδα πιθανότητας 95 % ($t=2,1199$) είναι $\mu \pm 1,128$ για κάθε μεμονωμένη τιμή και $\mu \pm 0,274$ για τη μέση τιμή.

Μέρα 2^η

Παρασκευάζονται 12 δείγματα και ελέγχονται χρωματογραφικά. Οι θεωρητικές και οι πειραματικές τιμές που υπολογίζονται παρουσιάζονται στον πίνακα:

Πίνακας ΙΣΤ.8.3. Δεδομένα 2^{ης} μέρας ελέγχου της πιστότητας της χρωματογραφικής μεθόδου παρακολούθησης της φωτοχημικής αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης

Θεωρητική Συγκέντρωση (M)	Πειραματική Συγκέντρωση (M)	%
$4,10 \times 10^{-6}$	$4,06 \times 10^{-6}$	99,1
$4,10 \times 10^{-6}$	$4,07 \times 10^{-6}$	99,4
$4,10 \times 10^{-6}$	$4,08 \times 10^{-6}$	99,6
$6,37 \times 10^{-6}$	$6,34 \times 10^{-6}$	99,5
$6,37 \times 10^{-6}$	$6,39 \times 10^{-6}$	100,3
$9,79 \times 10^{-6}$	$9,80 \times 10^{-6}$	100,2
$1,55 \times 10^{-5}$	$1,55 \times 10^{-5}$	100,3
$3,82 \times 10^{-5}$	$3,83 \times 10^{-5}$	100,1
$6,10 \times 10^{-5}$	$6,10 \times 10^{-5}$	100,0
$8,38 \times 10^{-5}$	$8,37 \times 10^{-5}$	99,9
$1,18 \times 10^{-4}$	$1,18 \times 10^{-4}$	100,3
$2,70 \times 10^{-4}$	$2,67 \times 10^{-4}$	99,0

Οι στατιστικές τιμές της πιστότητας είναι :

Μέση τιμή : 99,8 %

Τυπική απόκλιση $s=0,476$ και επί τοις εκατό διακύμανση: 0,55 %.

Τα όρια εμπιστοσύνης για 11 βαθμούς ελευθερίας και επίπεδα πιθανότητας 95 % ($t=2.201$) είναι $\mu \pm 1,048$ για κάθε μεμονωμένη τιμή και $\mu \pm 0,303$ για τη μέση τιμή.

ΙΣΤ.8.4. Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (intermediate precision)

Ελέγχεται η αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων μεταξύ των 2 σειρών πειραμάτων (1^η και 2^η μέρα).

Το σύνολο των αποτελεσμάτων υφίσταται την ίδια στατιστική επεξεργασία με τις επιμέρους ομάδες, οπότε έχουμε τα ακόλουθα αποτελέσματα:

Μέσος όρος: 100,3 %

$$\text{Διακύμανση: } s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} = 0,598\%$$

Τυπική απόκλιση: $s=0,773$ %

$$\text{Σχετική τυπική απόκλιση: } rsd = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 = 0,77\%$$

Όρια εμπιστοσύνης για κάθε τιμή για 28 βαθμούς ελευθερίας και πιθανότητα 95 % ($t_{28}=2,0484$)

$$\bar{x} - t \cdot s < \mu < \bar{x} + t \cdot s \Rightarrow \mu = \pm 1,584\%$$

ενώ τα όρια εμπιστοσύνης για την μέση τιμή είναι

$$\bar{x} - \frac{t \cdot s}{\sqrt{n}} < \mu < \bar{x} + \frac{t \cdot s}{\sqrt{n}} \Rightarrow \mu = \pm 0,294\%$$

Σύγκριση των 2 μέσων τιμών

Αυτή γίνεται υπολογίζοντας τη συνδυασμένη τυπική απόκλιση

$$s_{1-2} = \sqrt{\frac{\sum_i^{n_1} (x_i - \bar{x}_1)^2 + \sum_j^{n_2} (x_j - \bar{x}_2)^2}{n_1 + n_2 - 2}} \Rightarrow s_{1-2} = 0,464\%$$

και στη συνέχεια υπολογίζοντας και το t_{exp} με την παρακάτω σχέση

$$t_{\text{exp}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s_{1-2}} \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}} = \frac{|100,19 - 99,87|}{1,64} \cdot \sqrt{\frac{17 \cdot 12}{17 + 12}} = 0,517$$

Για 18 βαθμούς ελευθερίας ($10+10-2=18$) και για στάθμη εμπιστοσύνης 95 % η θεωρητική τιμή του t είναι $t=2,101$ και είναι κατά πολύ μεγαλύτερη της πειραματικής τιμής. Δεν υπάρχει δηλαδή στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 μέσων όρων.

ΙΣΤ.8.5. Ακρίβεια

Ο έλεγχος της ακρίβειας της μεθόδου πραγματοποιείται με τη μέθοδο προσθήκης γνωστής ποσότητας σε διάλυμα μετρονιδαζόλης που έχει υποστεί μερική φωτοχημική αποικοδόμηση. Τα πειραματικά δεδομένα, η ποσότητα της μετρονιδαζόλης που προστέθηκε θεωρητικά και η τιμή που υπολογίστηκε πειραματικά παρουσιάζονται στον πίνακα 4 που ακολουθεί.

Πίνακας ΙΣΤ.8.4. Δεδομένα ελέγχου της ακρίβειας της χρωματογραφικής μεθόδου παρακολούθησης της φωτοχημικής αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης

Προστιθέμενη συγκέντρωση (M)	Ανακτώμενη συγκέντρωση (M)	Σφάλμα(%)
$3,03 \times 10^{-6}$	$3,10 \times 10^{-6}$	2,31
$3,35 \times 10^{-6}$	$3,38 \times 10^{-6}$	0,82
$3,35 \times 10^{-6}$	$3,40 \times 10^{-6}$	1,60
$5,03 \times 10^{-6}$	$5,11 \times 10^{-6}$	1,71
$8,37 \times 10^{-6}$	$8,55 \times 10^{-6}$	2,10
$1,68 \times 10^{-5}$	$1,69 \times 10^{-5}$	1,13
$4,47 \times 10^{-5}$	$4,52 \times 10^{-5}$	1,17
$7,44 \times 10^{-5}$	$7,48 \times 10^{-5}$	0,53
$1,04 \times 10^{-4}$	$1,06 \times 10^{-4}$	1,19
$1,57 \times 10^{-4}$	$1,59 \times 10^{-4}$	1,30
$1,89 \times 10^{-4}$	$1,88 \times 10^{-4}$	-0,08
$2,20 \times 10^{-4}$	$2,22 \times 10^{-4}$	1,10
$2,51 \times 10^{-4}$	$2,53 \times 10^{-4}$	0,80
$2,83 \times 10^{-4}$	$2,83 \times 10^{-4}$	0,05

Το μέσο σφάλμα είναι 1,13%.

ΙΣΤ.8.6. Σταθερότητα διαλυμάτων

Η μέθοδος πρέπει να είναι κατάλληλη για την παρακολούθηση της φωτοχημικής αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης. Σημαντική παράμετρος είναι η σταθερότητα των υδατικών διαλυμάτων ως προς την μετρονιδαζόλη τόσο πριν όσο και μετά την έκθεση σε ακτινοβολία.

Παρασκευάζονται διαλύματα μετρονιδαζόλης $2,74 \times 10^{-3}$ και $4,78 \times 10^{-5}$ M και μέρος τους υφίσταται ακτινοβολία για 1h. Τόσο το αρχικό διάλυμα όσο και το μέρος του που έχουν υποστεί ακτινοβολία ελέγχονται για τη σταθερότητά τους για οκτώ ώρες, ο μέγιστος αριθμός ωρών που αναμένεται να παραμένουν τα δείγματα προστατευμένα από το φως πριν την ανάλυσή τους. Τα αποτελέσματα συγκεντρώνονται στους πίνακες ΙΣΤ.8.5 και ΙΣΤ.8.6 και παρατηρείται πως τα αρχικά διαλύματα μπορούν να θεωρηθούν σταθερά για τουλάχιστον δεκαέξι ώρες ενώ για τα διαλύματα που έχουν υποστεί ακτινοβολία, η παραμονή τους για

ένδεκα ώρες στο σκοτάδι δεν επηρεάζει την ανακτώμενη συγκέντρωση της μετρονιδαζόλης.

Πίνακας ΙΣΤ.8.5. Δεδομένα παρακολούθησης της σταθερότητας διαλύματος μετρονιδαζόλης συγκέντρωσης $4,8 \times 10^{-5}$ M πριν και μετά την έκθεσή του σε ακτινοβολία λυχνίας τόξου αερίου Ξένου.

Αρχικό δείγμα		Δείγμα μετά από 1h έκθεση	
Χρόνος (h)	Μετρονιδαζόλη ($\times 10^{-5}$ M)	Χρόνος (h)	Μετρονιδαζόλη ($\times 10^{-5}$ M)
0	4,78	0	2,96
10	4,80	1,75	2,90
41	4,80	2,75	2,84
52,5	4,80	11	2,94

Πίνακας ΙΣΤ.8.6. Δεδομένα παρακολούθησης της σταθερότητας διαλύματος μετρονιδαζόλης συγκέντρωσης $2,7 \times 10^{-3}$ M πριν και μετά την έκθεσή του σε ακτινοβολία λυχνίας τόξου αερίου Ξένου.

Αρχικό δείγμα		Δείγμα μετά από 1h έκθεση	
Χρόνος (h)	Μετρονιδαζόλη ($\times 10^{-3}$ M)	Χρόνος (h)	Μετρονιδαζόλη ($\times 10^{-3}$ M)
0	2,74	0	2,58
3,9	2,68	1,0	2,55
4,9	2,68	3,0	2,55
15,5	2,69	7,2	2,55
16,5	2,70	11,1	2,56

Περίληψη -Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η επίδραση των εκδόχων και άλλων παραγόντων στη σταθερότητα και ασφάλεια του τελικού σκευάσματος. Τα έκδοχα στα φαρμακευτικά σκευάσματα, όπως είναι γνωστό, μπορούν να διευκολύνουν την παραγωγή του σκευάσματος, να βελτιώσουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά καθώς και να ενισχύσουν το φαρμακευτικό αποτέλεσμα του δραστικού συστατικού.

Στα πλαίσια της παρακολούθησης της σταθερότητας δισκίων καρβεδιλόλης χρωματογραφικά και της προσπάθειας να αντιμετωπιστεί η εμφάνιση αγνώστου προϊόντος αποικοδόμησης, διαπιστώθηκε και διερευνήθηκε η αλληλεπίδραση του δραστικού συστατικού με την πολυβινυλοπυρολιδόνη. Η έκταση της αλληλεπίδρασης αποδείχθηκε πως εξαρτάται από την αναλογία των δυο συστατικών, καρβεδιλόλη και πολυβινυλοπυρολιδόνη, κυρίως όμως από την υγρασία που διαθέτει ή μπορεί να προσροφήσει στο πλέγμα του το πολυμερές. Η βιομηχανική διαδικασία παραγωγής του σκευάσματος και συγκεκριμένα η αλλαγή του πρωτογενούς περιέκτη, εξασφάλισαν συνθήκες μειωμένης υγρασίας και βελτίωσαν τη σταθερότητά του.

Η αλληλεπίδραση αυτή που οδηγεί στον σχηματισμό αγνώστου προϊόντος συνδέεται με την εμφάνιση στη συνέχεια δυο ακόμα αγνώστων προϊόντων και όλα απομονώθηκαν με ημιπαρασκευαστική χρωματογραφία. Η χρωματογραφική συμπεριφορά των αγνώστων προϊόντων μελετήθηκαν σε κινητές φάσεις με διαφορετικά pH όπου διαπιστώθηκε διαφοροποίηση του χρόνου ανάσχεσης και αποδόθηκε στη διαφορετική βασικότητα του αλειφατικού αζώτου. Μελετήθηκαν με φασματοσκοπία NMR όπου διαπιστώθηκαν οι ομοιότητες και διαφορές από το μόριο της καρβεδιλόλης. Το βασικό άγνωστο προϊόν χαρακτηρίστηκε ως οξίμη της καρβεδιλόλης και επιβεβαιώθηκε με φασματομετρία μάζας.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η φωτοαποικοδόμηση της καρβεδιλόλης σε μεθανολικά και όχι υδατικά διαλύματα λόγω δυσδιαλυτότητας. Καθώς το αποτέλεσμα της επίδρασης της φωτεινής ακτινοβολίας σε κάποιο σώμα εξαρτάται από πολλές συνθήκες, στη συγκεκριμένη μελέτη έγινε προσπάθεια να διατηρηθούν σταθερές όλες οι παράμετροι έτσι ώστε να μπορέσει να αναδειχθεί

η συσχέτιση της αρχικής συγκέντρωσης των διαλυμάτων με την ταχύτητα της φωτοχημικής αποικοδόμησης της καρβεδιλόλης.

Από τις συνθήκες των πειραμάτων, διερευνήθηκε η επίδραση της μεταβολής του διαλύτη και διαπιστώθηκε πως η σύστασή του επηρεάζει σημαντικά την ταχύτητα της φωτοχημικής αποικοδόμησης. Παρατηρήθηκε αυξημένη αποικοδόμηση της καρβεδιλόλης σε υδατικό περιβάλλον, δεν διαπιστώθηκε όμως αναλογική σχέση με τη σύσταση του διαλύτη. Με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ διαπιστώθηκαν για τα μεθανολικά διαλύματα της καρβεδιλόλης διαμοριακές αλληλεπιδράσεις που εξαρτώνται από τη συγκέντρωση του δείγματος. Η παρουσία νερού στον διαλύτη επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις αυτές, με σημαντική διαφοροποίηση όταν το νερό υπερβαίνει σε αναλογία το ποσοστό της μεθανόλης.

Ο ρυθμός φωτοαποικοδόμησης μεθανολικών διαλυμάτων της καρβεδιλόλης μελετήθηκε στο εύρος συγκεντρώσεων από 10^{-6} έως 10^{-2}M και παρατηρήθηκε να αυξάνεται η αποικοδόμηση (σε M/h) με την αύξηση της συγκέντρωσης του δείγματος. Η προσπάθεια συσχέτισης του ρυθμού της φωτοαποικοδόμησης με την αρχική συγκέντρωση των διαλυμάτων αποκάλυψε τη γραμμική συσχέτιση των λογαρίθμων των δυο παραμέτρων. Η εξίσωση αυτή επιτρέπει την πρόβλεψη του ρυθμού της φωτοαποικοδόμησης για συγκεκριμένη αρχική συγκέντρωση της καρβεδιλόλης και χρησιμοποιήθηκε για να αξιολογηθεί η επίδραση της παρουσίας των εκδόχων.

Διαπιστώθηκε πως η παρουσία του PVP επιταχύνει την φωτοχημική αποικοδόμηση και παρατηρήθηκε να έχει συγκεκριμένη δυναμική στην επιτάχυνση η οποία μεγιστοποιείται όταν βρίσκεται σε περίσσεια, στις συνθήκες των πειραμάτων. Στην περίπτωση της HP- β -CD, αφού αποδείχθηκε η σύμπλεξη με την καρβεδιλόλη με την τεχνική διαλυτότητας φάσεων, παρατηρήθηκε η επιτάχυνση της φωτοχημικής αποικοδόμησης.

Η κινητική της φωτοχημικής αποικοδόμησης σε συνάρτηση με την αρχική συγκέντρωση, μελετήθηκε επίσης σε υδατικά διαλύματα μετρονιδαζόλης. Η επιλογή της συγκεκριμένης δραστικής ουσίας στηρίχθηκε στην αυξημένη διαλυτότητά της στο νερό και στην απουσία φαινομένων συσσωμάτωσης, όπως αποδείχθηκε με φασματοσκοπία NMR. Διαπιστώθηκε πως στις χαμηλές αρχικές συγκεντρώσεις ακολουθείται πρωτοταξική κινητική και στις υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις μηδενοταξική. Στην περίπτωση αυτή, η πρόβλεψη της ταχύτητας

της φωτοχημικής αποικοδόμησης μπορεί να επιτευχθεί σε δυο περιοχές, ανάλογα με την κινητική. Υπάρχει κάποια περιοχή που η παρατηρούμενη κινητική μεταβάλλεται και δεν μπορεί γραφικά να αποδοθεί με ευκολία σε κάποια από τις δυο κινητικές. Η αξιολόγηση των κινητικών μέσα από την εκτίμηση του μοντέλου που συσχετίζει την μεταβολή της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με το χρόνο είναι φαινομενική και χωρίζει τις κινητικές σε μηδενοταξικές και πρωτοταξικές.

Η παρουσία πολυβινυλοπυρολιδόνης σε δείγματα με χαμηλή αρχική συγκέντρωση μετρονιδαζόλης δείχνει να μειώνει ενώ η παρουσία HP-β-CD μπορεί να επιταχύνει τον ρυθμό φωτοχημικής αποικοδόμησης. Στα υπόλοιπα έκδοχα που μελετήθηκαν, δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική επίδραση.

Οι μελέτες φωτοχημικής αποικοδόμησης είναι μια ιδιαίτερη κατηγορία χημικών αντιδράσεων. Η εκτίμηση της επίδρασης κάποιας παραμέτρου απαιτεί απόλυτα επαναλήψιμες πειραματικές συνθήκες.

Διαπιστώνεται, με σωστό έλεγχο των συνθηκών, πως όταν δεν υπάρχουν άλλες επιδράσεις, όπως παρουσία εκδόχων ή προϊόντων διάσπαση που δουν καταλυτικά, η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης οδηγεί σε αύξηση της ταχύτητας της αποικοδόμησης.

Το % ποσοστό των moles που αποικοδομούνται συνεχώς ελαττώνεται με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης και αποδίδεται στο φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου. Σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις το ποσοστό αυτό σταθεροποιείται ως αποτέλεσμα του φαινομένου απείρου πάχους.

Στη συγκεκριμένη εργασία, τα αποτελέσματα της φωτοχημικής αποικοδόμησης μελετήθηκαν με δυο διαφορετικούς τρόπους. Ο κύριος αφορούσε στη συσχέτιση της ταχύτητας της φωτοχημικής αποικοδόμησης με την αρχική συγκέντρωση των διαλυμάτων που έδωσε τη δυνατότητα να εκτιμάται η φαινομενική τάξη της αντίδρασης, τόσο σε περιοχές όπου αξιολογείται ως μηδενοταξική όσο και σε περιοχές που χαρακτηρίζεται ως πρωτοταξική. Με τον τρόπο αυτό απεικονίστηκε και η περιοχή των ενδιάμεσων και μικτών κινητικών, όπου η τάξη της αντίδρασης μεταβάλλεται. Ο δεύτερος τρόπος εργασίας αφορούσε στην εκτίμηση και σύγκριση των $t_{95\%}$ ή $t_{80\%}$ και δίνει τη δυνατότητα να διακριθεί η περιοχή που ακολουθείται μηδενοταξική κινητική. Οι δυο τρόποι εργασίας δίνουν τα ίδια αποτελέσματα και επιβεβαιώνουν τη σταθερότητα του

πρωτοκόλλου εργασίας και τη δυνατότητα διερεύνησης, μεθοδικά, των παραμέτρων που αφορούν στην επίδραση του φωτός σε φαρμακευτικά μόρια και σκευάσματα.

Summary

The effect of excipients and other factors on the stability and photostability of active drug substances both in solutions and in solid drug formulation

The purpose of this study was to investigate the effect of excipients and of other parameters in both stability and safety of drug product. Excipients may be used to facilitate formulation process, to improve usage or even to improve the efficacy of the drug substance.

During stability monitoring of Carvedilol tablets, an unknown degradation product was reported as an unknown chromatographic peak. After a series of experiments, this peak was explained as the interaction between the active substance and polyvinylpyrrolidone (PVP). This interaction was proved to be related to the mass ratio of the two substances, Carvedilol and PVP, and to the water content of PVP. Alteration of blistering materials, as an improvement of formulation process, provided a low humidity micro-environment and improved stability performance of the drug product.

The interaction of Carvedilol and PVP is also related with the appearance of two more unknown products. All were isolated with semi preparative chromatography. The chromatographic behaviour of the unknown products was studied using mobile phases with different pH values and alterations of their retention times were attributed to the different alkalinity of aliphatic amine. The unknown products were studied with NMR spectroscopy and both the similarities and the differences from Carvedilol molecule were reported. The original unknown product was characterized as the oxime of Carvedilol and it was justified with Mass Spectroscopy measurements.

Photodegradation of Carvedilol was studied using methanol as solvent due to its low solubility. The effect of light irradiation is associated with many parameters and in this study it was attempted to control them so as to reveal the

connection between the initial concentration of solution and the rate of photodegradation of Carvedilol.

The impact of solvent was also studied and it was reported that solvent composition affects the photodegradation rate. Increasing the aqueous part of the solvent, increased the degradation rate, yet not proportional. $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy revealed molecular interactions in the solutions of Carvedilol depending to the sample concentration. The presence of water affected these interactions, mainly when its ratio is high.

The photodegradation rate of Carvedilol dissolved in methanol was studied in concentrations from 10^{-6} to 10^{-2} M and an increase in rate was observed by increasing concentration. The attempt to correlate the photodegradation rate to the sample's initial concentration revealed linear equation of the logarithmic values of the two parameters. This equation allows the prediction of the photodegradation rate for solutions with known initial concentration and it was used to evaluate the effect of excipients co-existence.

It was observed that the presence of PVP increased the rate of photodegradation process of Carvedilol and it reached its highest values at high ratio of PVP/Carvedilol. In case of HP- β -CD, the increase of photodegradation rate was also reported after complexation with Carvedilol (proved with phase solubility study).

The correlation between the rate of photodegradation process and the initial sample concentration was also attempted in aqueous solutions of Metronidazole. Metronidazole was selected as a model molecule due to its high water solubility and to the absence of molecular interactions according to NMR spectroscopy. First-order kinetics were found in solutions of low initial concentration, while in solutions of high initial concentrations zero-order kinetics were observed. In this case, the prediction of photodegradation rate may be applied in two different concentration areas, depending on the kinetics order. There is a small concentration area of intermediate values where the

characterization of the observed kinetic (zero- or first-order) is not easy and prediction is not feasible.

The presence of PVP in Metronidazole solutions of low initial concentration seems to decrease the rate of photodegradation while the presence of HP- β -CD seems to increase it. No other excipient studied had any significant effect.

Reproducible experimental process is prerequisite for photodegradation studies. Under these conditions (no excipients or any matter that affects the degradation rate) any increase of the initial sample concentration leads to an increase of the photodegradation rate.

The percentage of moles that photodegrade decreased with the increase of initial sample concentration and this may be attributed to the *inner filter theory*. In cases of very high initial sample concentrations, the percentage of moles undergoing decomposition tend to be stabilized imitating the photodegradation process of solid state (*infinite thickness low*).

Βιβλιογραφία

1. Patel H., Shah V., Upadhyay U. "New pharmaceutical excipients in solid dosage forms – A review", *International Journal of Pharmacy and Life Sciences*, Vol. 2, Issue 8: Aug.: 2011, 1006-1019
2. Snyder B., Polasek T., Doogue M., "Drug interactions: principles and practice", *Australian Prescriber*, VOLUME 35 : NUMBER 3 : june 2012
3. Chaudhari S.P., Patil P.S., "Pharmaceutical Excipients: A review", *International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry*, Vol. 1(1), Jan- Mar, 2012
4. Nishath Fathima, Tirunagari Mamatha, Husna Kanwal Qureshi, Nandagopal Anitha, Jangala Venkateswara Rao, "Drug-excipient interaction and its importance in dosage form development", *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 01 (06); 2011: 66-71
5. Tambe Vrushali Sachin, Deodhar M.N., Prakya V., "Advances in Analytical Techniques used in Predicting Drug-Excipient Interactions", *International Journal Of Pharmacy & Technology*, July-2014 | Vol. 6 | Issue No.1 | p.6388-6417
6. Pagati Kumar B., Ravi Kiran Sahu, Ramana Murthy K.V., Subba Rao, Ramu B., "A review on mechanism, importance and methods of compatibility testing in the formulation of dosage forms", *Journal of Chemical and Pharmaceutical sciences*, Volume 4, Iss4, p 141 – 151
7. Sonali S. Bharate, Sandip B. Bharateb, Amrita N. Bajajc, "Interactions and incompatibilities of pharmaceutical excipients with active pharmaceutical ingredients: a comprehensive review.", *Journal of Excipients and Food Chemistry*, 1 (3) 2010 p3-26
8. Crowley P., Martini L., "Drug-Excipient Interactions" *Pharmaceutical Technology Europe*, March 2001, p26-34
9. Swathi Sowhanya D., Rajsekhar D., Samyuktha Rani B., Laxman Rao B., Prasanthi M., Venkatesh A. "VARIOUS ASPECTS OF PHARMACEUTICAL PREFORMULATION: A REVIEW", *An International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences*, 2013, Volume 4, Iss2, p171-190
10. Panakanati R. Naragn A.S., "Impact of Excipient Interactions on Drug Bioavailability from Solid Dosage Forms" *Pharmaceutical Research*, May 2012, 29, p2639-2659
11. Handbook of Pharmaceutical Excipients, Rowe, Raymond C; Sheskey, Paul J; Cook, Walter G; Fenton, Marian E. Seventh edition, Pharmaceutical Press
12. Εφεντάκης Εμ. «Φαρμακευτική Τεχνολογία Των Στερεών Μορφών» *Φαρμακευτικό Τμήμα Πανεπιστήμιο Αθηνών*, Αθήνα 2001 σ.165-172
13. www.drugdel.com/polymer.htm, "POLYMERIC DRUG DELIVERY-A BRIEF OVERVIEW"
14. Tsunoda S. et al, "Molecular desine of polyvinylpyrrolidone-conjugated interleukin-6 for enhancement of in vivo thrombopoietic activity in mice" *Journal of controlled release*, September 2000, Vol. 68, Iss. 3, p335-341
15. Ameye D. et al, "Trypsin inhibition, calcium and zinc ion binding of starch-g-poly(acrylic acid) copolymers and starch/poly(acrylic acid) mixtures for perora peptide drug delivery" *Journal of Controlled Release*, August 2001, Vol 75, Iss 3, p357-364
16. Lecomte F. et al., "Polymer blends used for the aqueous coating of solid dosage forms: importance of the type of plasticizer" *Journal of Controlled Released*, September 2004, Vol 99, Iss 1, p1-13
17. Huh K.M. et al., "Hydrotropic polymer micelle system for delivery of paclitaxel" *Journal of Controlled Released*, January 2005, Vol 101, Iss 1-3, p59-68
18. Tansey W. et al, "Synthesis and characterization of branched poly(L-glutamic acid) as a biodegradable drug carrier" *Journal of Controlled Release*, January 2004, Vol 94, Iss 1, p39-51
19. Zuccari G. et al, "Modified polyvinylalcohol for encapsulation of all-trans-retinoic acid in polymeric miselles" *Journal of Controlled Release*, March 2005, Vol 103, Iss 2, p 369-380

20. Dailey L.A. et al, "The role of branched polyesters and their modifications in the development of modern drug delivery vehicles" *Journal of Controlled Release*, January 2005, Vol 101, Iss 1-3, p137-149
21. Witte P. et al, "Formation of porous membranes for drug delivery systems" *Journal of Controlled Release*, May 1993, Vol 24, Iss 1-3, p61-78
22. Gref R. et al, "The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres" *Advanced Drug Delivery Reviews*, September 1995, Vol 16, Iss 2-3, p215-233
23. Heller J. et al, "Poly(ortho esters): synthesis, characterization, properties and uses" *Advanced Drug Delivery Reviews*, October 2002, Vol 54, Iss 7, p 1015-1039
24. Kumar N., Langer R.S., Domb A.J., "Polyanhydrides: an overview" *Advanced Drug Delivery Reviews*, October 2002, Vol 54, Iss 7, p 889-910
25. Katti D.S. et al, "Toxicity, biodegradation and elimination of polyanhydrides" *Advanced Drug Delivery Reviews*, October 2002, Vol 54, Iss 7, p 933-961
26. Göpferich A., Tessmar J., "Polyanhydride degradation and erosion" *Advanced Drug Delivery Reviews*, October 2002, Vol 54, Iss 7, p 911-931
27. Zhao A., Wang J., Mao H-Q., Leong K.W., "Polyphosphoesters in drug and gene delivery" *Advanced Drug Delivery Reviews*, April 2003, Vol 55, Iss 4, p 483-499
28. Lakshmi S., Katti D.S., Laurencin C.T., "Biodegradable polyphosphazenes for drug delivery applications" *Advanced Drug Delivery Reviews*, April 2003, Vol 55, Iss 4, p 467-482
29. Sershen S., West J., "Implantable, polymeric systems for modulated drug delivery" *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54 (2002), p1225-1235
30. Okada H., "One- and three-month release injectable microspheres of the LH-RH superagonist leuprorelin acetate" *Advanced Drug Delivery Reviews*, October 1997, Vol 28, Iss 1, p42-70
31. Jeong B., "Thermosensitive sol-gel reversible-hydrogels" *Advanced Drug Delivery Reviews*, January 2002, Vol 54, Iss 1, p 37-51
32. Bulmus V. et al, "A new pH-responsive and glutathione-reactive, endosomal membrane-disruptive polymeric carrier for intracellular delivery of biomolecular drugs" *Journal of Controlled Release*, December 2003, Vol 93, Iss 2, p 105-120
33. Leong K.W., Langer R., "Polymeric Controlled Drug Delivery", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1(1987), p199-233
34. Al-Khalili M., Meidan V.M., Michniak B.B., "Iontophoretic transdermal delivery of buspirone hydrochloride in hairless mouse skin" *AAPS Pharm Sci* 2005; 5 (2) Article 14
35. Sugibayashi K., Morimoto Y., "Polymers for transdermal drug delivery systems", *Journal of Controlled Release*, 29 (1994), p177-185
36. Thanou M., Verhorf J.C., Junginger H.E., "Oral drug adsorption enhancement by chitosan and its derivatives", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 52 (2001) p117-126
37. Risbud M.V., Hardikar A.A., Bhat S.V., Bhonde R.R., "pH-sensitive freeze-dried chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogels as controlled release system for antibiotic delivery" *Journal of controlled release*, July 2000, Vol 68, Iss 1, p23-30
38. Lukyanov A.N., Torchilin V.P., "Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs" *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56 (2004), p1273-1289
39. Ruszczak Z., Friess W., "Collagen as a carrier for on-site delivery of antibacterial drugs" *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55 (2003), p1679-1698
40. Granero G., Longhi M., "Thermal Analysis and Spectroscopic Characterization of Interactions Between a Naphthoquinone Derivative with HP- β -CD or PVP", *Pharmaceutical Development and Technology*, 7(3), (2002) p381-390
41. Valero M., Esteban B., Pal ez R., Rodríguez L.J., "Naproxen: Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin:Polyvinylpyrrolidone Ternary Complex Formation", *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, Vol 48 (2004), p157-163

42. Ribeiro L., Ferreira D.C., Veiga F.G.B., "In vitro controlled release of vinpocetin-cyclodextrin-tartatic acid multicomponent complexes from HPMC swellable tablets" *Journal of Control Release*, March 2005, Vol 103, Iss 2, p325-339
43. Archontaki H.A., Vertizi M.V., Athanassioy-Malaki M.H., "Study on the inclusion complexes of bromazepam with β - and β -hydroxypropyl- cyclodextrins", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28 (2002), p 761-769
44. Chao J., Li J., Meng D., Huang S., "Preparation and study on the solid inclusion complex of sparfloxacin with HP- β -cyclodextrin", *Spectrochimica Acta Part A*, 59 (2003), p.705-711
45. Kazarian S.G., Martirosyan G.G., "Spectroscopy of polymer/drug formulations processed with supercritical fluids: in situ ATR-IR and Raman study of impregnation of ibuprofen into PVP", *International journal of Pharmaceutics*, Vol 232 (2002), p.81-90
46. Duncan Q.M. Craig, "The mechanisms of drug release from solid dispersions in water soluble polymers" *International Journal of Pharmaceutics* 2002, p.131-144
47. Pemawansa K.P., Khan I.M. "Non-Covalent Adducts of Sodium Poly(α ,L-glutamate) with Poly(*N*-vinyl pyrrolidone): Methods of preparation and characterization of structure" *Macromolecular Bioscience* 2002, 2, p.170-178
48. Kaczmarek H., Szalla A., Kamińska A., "Study of poly(acrylic-acid)-poly(vinylpyrrolidone) complexes and their photostability", *Polymer*, 42 (2001), p6057-6069
49. Zeng X.M., Martin G.P., Marriott C., "Effects of molecular weight of polyvinylpyrrolidone on the glass transition and crystallization of co-lyophilized sucrose", *International Journal of Pharmaceutics*, 218 (2001), p63-73
50. Pasch H., "Hyphenated techniques in liquid chromatography of polymers", *Advances in Polymer Science*, Vol 150
51. European Pharmacopoeia 8, 2014
52. Kreft K., Kozamernik B., Urleb U. "Qualitative determination of polyvinylpyrrolidone type by near-infrared spectrometry" *International Journal of Pharmaceutics*, 188 (1999) 1-6
53. Martino P.D., Joitis E., Gobetto R., Maseic A., Palmieri G.F., Martelli S. "Ketoprofen-poly(vinylpyrrolidone) physical interaction" *Journal of Crystal Growth* 265 (2004) 302-308
54. Feldstein M.M., Shandryuk G.A., Kuptsov S.A., Platé N.A., "Coherence of thermal transitions in poly(*N*-vinyl pyrrolidone)-poly(ethylene glycol) compatible blends 1. Interrelations among the temperatures of melting, maximum cold crystallization rate and glass transitions", *Polymer* 41 (2000), p5327-5338
55. Feldstein M.M., Kuptsov S.A., Shandryuk G.A., "Coherence of thermal transitions in poly(*N*-vinyl pyrrolidone)-poly(ethylene glycol) compatible blends 2. The temperature of maximum cold crystallization rate versus glass transition", *Polymer* 41 (2000), p5339-5348
56. Feldstein M.M., Shandryuk G.A., Platé N.A., "Relation of glass transition temperature to the hydrogen-bonding degree and energy in poly(*N*-vinyl pyrrolidone) blends with hydroxyl-containing plasticizers. Part 1. Effects of hydroxyl group number in plasticizer molecule", *Polymer* 42 (2001), p971-979
57. Feldstein M.M., Kuptsov S.A., Shandryuk G.A., Platé N.A., "Relation of glass transition temperature to the hydrogen-bonding degree and energy in poly(*N*-vinyl pyrrolidone) blends with hydroxyl-containing plasticizers. Part 2. Effects of poly(ethylene glycol) chain length", *Polymer* 42 (2001), p981-990
58. Trimpin S., Eichhorn P., Räder H.J., Müllen K., Knepper T.P. "Recalcitrance of poly(vinylpyrrolidone): evidence through matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry" *Journal of Chromatography A*, 938 (2001), p 67-77
59. Bianco G., Soldi M.S., Pinheiro E.A., Pires A.T.N., Gehlen M.H., Soldi V. "Thermal stability of poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone-co-methacrylic acid) copolymers in inert atmosphere" *Polymer Degradation and Stability* 80 (2003), p 567-574

60. Nair R., Nyamweya N., Gönen S., Martínez-Miranda L.J., Hoag S.W., "Influence of various drugs on the glass transition temperature of poly(vinylpyrrolidone): a thermodynamic and spectroscopic investigation", *International Journal of Pharmaceutics*, 225 (2001), p83-96
61. Zerrouk N., Mennini N., Maestrelli F., Chemtob C., Mura P., "Comparison of the effect of chitosan and polyvinylpyrrolidone on dissolution properties and analgesic effect of naproxen" *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57 (2004) 93-99
62. Albertini B., Cavallari C., Passerini N., González-Rodríguez M.L., Rodríguez L., "Evaluation of β -lactose, PVP K12 and PVP K90 as excipients to prepare piroxicam granules using two wet granulation techniques", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 54 (2003) p 479-487
63. Kanaya J., Kaji K., "Dynamics in the glassy state and near the glass transition of amorphous polymers as studied by neutron scattering", *Advances in Polymer Science*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2001, Vol 145
64. Zografi G., Oksanen C.A., "The relationship between the glass transition temperature and water vapor absorption by poly(vinylpyrrolidone)", *Pharmaceutical Research*, Vol 7, No.6 (1990), p654-657
65. Lai M.C., Hagenam J., Schowen R.L., Borchardt R.T., Topp E.M. "Chemical Stability of Peptides in Polymers. 1. Effect of water on Peptide Deamidation on Poly(vinyl alcohol) and Poly(vinyl pyrrolidone) Matrixes", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol 88, No 10, October 1999, p1073-1080
66. Sekizaki H., Danjo K., Eguchi H., Yonezawa Y., Sunada H., Otsuka A., "Solid state interaction of ibuprofen with polyvinylpyrrolidone", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, Vol 43, Iss 6 (1995), p988-993
67. Sethia S., Squillante E., "Solid dispersion of carbamazepine in PVP K30 by conventional solvent evaporation and supercritical methods", *International Journal of Pharmaceutics*, Vol 272 (2004), p1-10
68. Taylor L.S., Zografi G., "Spectroscopic characterization of interactions between PVP and indomethacin in amorphous molecular dispersions", *Pharmaceutical Research*, Vol 14, No 12 (1997) p1691-1698
69. Hilton J.E., Summers M.P. "The effect of wetting agents on the dissolution of indomethacin solid dispersion systems" *International Journal of Pharmaceutics* 31 (1986) 1-2 p157-164
70. Tantishaiyakul V., Kaewnopparat N., Ingkatawornwong S., "Properties of solid dispersions of piroxicam in polyvinylpyrrolidone", *International Journal of Pharmaceutics*, 181 (1999), p 143-151
71. Garekani H.A., Ford J.L., Rubenstein M.H., Rajabi-Siahboomi A.R., "Highly compressible paracetamol: I: crystallization and characterization", *International Journal of Pharmaceutics*, 208 (2000) 1-2 p87-99
72. Weuts I., Kempen D., Decorte A., Verreck G., Peeters J., Brewster M., Van den Mooter G., "Phase behaviour analysis of solid dispersions of loperamide and two structurally related compounds with the polymers PVP-K30 and PVP-VA64", *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 22 (2004) 5 p375-385
73. "UV Radiation" *Office of Air and Radiation (6205J); June 2010; EPA 430-F-10-025* (<http://www.epa.gov/sunwise/doc/uvradiation.html>)
74. Tolleson W.H., Cherng S.H., Xia Q., Boudreau M., Yin J.J., Wamer W.G., Howard P.C., Yu H., P. Fu P.P., "Photodecomposition and Phototoxicity of Natural Retinoids" *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2 (2005) 1 p147-155
75. Peat S., Bourne E. J., Whelan W. J., "Photochemical Degradation of Starch" *Nature* 161 (1948) p762-763 (<http://www.nature.com/nature/journal/v161/n4098/pdf/161762a0.pdf>)
76. Smith E.C., Metzler D.E., "The Photochemical Degradation of Riboflavin" *Journal of American Chemical Society* 85 (1963) 20 p3285-3288 (<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00903a051>)
77. Metzler D.E., Cairns W.L., "Photochemical degradation of flavines. VI. New photoproduct and its use in studying the photolytic mechanism", *Journal of American*

Chemical Society 93 (1971) 11 p2772–2777
(<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00740a031>)

78. Bolognese A., Liveratore R., Scherillo G., “Photochemistry of Ommochromes and related compounds”, *Journal of Heterocyclic Chemistry* 25 (1988) 4 p1251-1254
79. Lavtíz ar V., van Gestel C.A.M., Dolenc D., Trebše P., “Chemical and photochemical degradation of chlorantraniliprole and characterization of its transformation products”, *Chemosphere* 95 (2014) p408–414
80. Russev M.M., Hecht S., “Photoswitches: From Molecules to Materials” *Advanced Materials* 22 (2010) p3348–3360
81. Lendlein A., Shastri V.P., “Stimuli-Sensitive Polymers” *Advanced Materials* 22 (2010) p3344-3347
82. Zhaoa Y., Xiaa Q., Yinb J.J., Linc G., Fua P.P., “Photoirradiation of dehydropyrrolizidine alkaloids—Formation of reactive oxygen species and induction of lipid peroxidation” *Toxicology Letters* 205 (2011) 302– 309
83. Mateus C.D.A., da Silva A.M., Burrows H.D., “Kinetics of photodegradation of the fungicide denarimol in natural waters and in various salt solutions. Salinity effects and mechanistic considerations” *Water Research* 34 (2000) 4 p1119-1126, 2000
84. Derbalah A.S.H., Wakatsuki H., Yamazaki T., Sakugawa H. “Photodegradation kinetics of fenitrothion in various aqueous media and its effect on steroid hormones biosynthesis” *Geochemical Journal* 38 (2004) p201-213
85. Tønnesen H.H., Baertschi S.W., “Photoreactivity of Drugs in vitro and in vivo”, <http://www.photobiology.info/Tonnesen.html>
86. Tønnesen H.H. “Photoreactivity of drugs” *Solar Radiation and Human Health*, Oslo: The Norwegian Academy of Science and Letters, 2008.(http://www.dnva.no/geomed/solarpdf/Nr_8_Hjorth_Tonnesen.pdf)
87. Reed R.A., Harmon P., Manas D, “The Role of Excipients and Package Components in the Photostability of Liquid Formulations”, *PDA Journal of Pharmaceutical Sciences and Technology* 57 (2003) 5 p351-368
88. Αντωνιάδου-Βυζά Αικ., «Έλεγχος Χημικής Σταθερότητας Φαρμακευτικών Προϊόντων», 1994
89. Distler A., Kutka P., Sauermann T., Egelhaaf H.J., Guldi D.M., Di Nuzzo D., Meskers S.C.J., Janssen R.A.J., “Effect of PCBM on the photodegradation kinetics of polymers for organic photovoltaics” *Chemistry of Materials*. 24 (2012) p4397-4405
90. “Photostability testing of new active substances and medicinal products Q1B”, Quality Guidelines, www.ich.org
91. “Photosafety evaluation of pharmaceuticals” Safety Guidelines, www.ich.org
92. Volman D. H., Seed L.W., “The Photochemistry of Uranyl Oxalate” *Journal of American Chemical Society* 82 (1964) p5095-5098.
93. de Azevedo Filho C.A., de Filgueiras Gomes D., de Mélo Guedes J.P., Falcão Batista R.M., Santos B.S., “Considerations on the quinine actinometry calibration method used in photostability testing of pharmaceuticals” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 54 (2011) 4 p886–888
94. Christensena K.L., Christensena J.Ø., Frokjaerb S., Langballea P., Hansena L.L., “Influence of temperature and storage time after light exposure on the quinine monohydrochloride chemical actinometric system” *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 9 (2000) p317–321
95. Connolly C., Crowe G., Carr G., Law A. “Determination of Ultraviolet Radiation intensity in a ICH Photostability Chamber” <http://www.patheon.com/Portals/0/pdfs/Determination%20of%20UV%20-%202008.pdf>
96. Wisler J.W., DeWire S.M., Whalen E.J., Violin J.D., Drake M.T., Ahn S., Shenoy S.K., Lefkowitz R.J., “A unique mechanism of blocker action: Carvedilol stimulates arrestin signaling” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the US of America* 104 (2007) p16657–16662 (www.pnas.org_cgi_doi_10.1073_pnas.0707936104)

97. Stoschitzky K., Koshucharova G., Lercher P., Maier R., Sakotnik A., Klein W., Liebmann P.M., Lindner W., "Stereoselective effects of (R)- and (S)- carvedilol in humans" *Chirality* 13 (2001) 7 p342-346
98. Metra M., Nodari S., D'Aloia A., Bontempi L., Boldi E., Dei Cas L., "A rationale for the use of b-blockers as standard treatment for heart failure" *American Heart Journal* 139 (2000) 511-522
99. Ruffolo Jr R.R., Gellai M., Hieble J.P., Willete R.N., Nichols A.J., "The pharmacology of carvedilol" *European Journal of Clinical Pharmacology* 38 (1990) 2 p82-88
100. Almeida D.R.P., Gasparro D.M., Martinek T.A., Fülöp F., Csizmadia I.G., "Resolution of Carvedilol's Conformational Surface via Gas and Solvent Phase Density Functional Theory Optimizations and NMR Spectroscopy", *Journal of Physical Chemistry. A* 108 (2004) p7719-7729
101. Παπακωνσταντίνου-Γαρουφαλιά Σπ., «Μαθήματα Μεταβολισμού Φαρμάκων» Πανεπ. Αθηνών Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας Αθήνα 2002
102. Oldham H.G., Clarke S.E., "In vitro identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of R(+) and S(-) carvedilol" *Drug Metabolism and Disposition*, 25 (1997) 8 p970-977
103. Ohno A., Saito Y., Hanioka N., Jinno H., Saeki M., Ando M., Ozawa S., Sawada J., "Involvement of human Hepatic UGT1A1, UGT2B4 and UGT2B7 in the glucuronidation of carvedilol" *Drug metabolism and disposition* 32 (2004) 2 235-239
104. Neugebauer G., Neubert P., "Metabolism of carvedilol in man" *European Journal of Drug Metab. And Pharmacok.* 16 (1991) 4 p257-260
105. Gehr T.B., Tenero D.M., Boyle D.A., Qian Y., Sica D.A., Shusterman N.H., "The pharmacokinetics of carvedilol and its metabolites after single and multiple dose oral administration in patients with hypertension and renal insufficiency" *European Journal of Clinical Pharmacology* 55(1999) p269-277
106. Karle C.A., Kreye V.A.W., Thomas D., Röckl K., Kathöfer S., Zhang W., Kiehn J., "Antiarrhythmic drug carvedilol inhibits HERG potassium channels", *Cardiovascular Research* 49 (2001) p361-370
107. Franciosa J.A., Massie B.M., Lukas M.A., Nelson J.J., Lottes S., Abraham W.T., Fowler M., Gilbert E.M., Greenberg B., COHERE Participant Physicians, "β-Blocker therapy for heart failure outside the clinical trial setting: Findings of a community-based registry" *American Heart Journal*, 148 (2004) 4 p718-726
108. Freeman C.D., Klutman N.E., Lamp K.C., "Metronidazole A Therapeutic Review and Update" *Drugs* 54 (1997) 5 p679-708
109. Mura C., Valenti D., Floris C., Sanna R., De Luca M.A., Fadda A.M., Loy G., "Metronidazole prodrugs: Synthesis, physicochemical properties, stability, and ex vivo release studies" *European Journal of Medicinal Chemistry* 46 (2011) p4142-4150
110. Aleanizy F.S., Alqahtani F., Gohary O.A., Tahir E.E., Shalabi R.A., "Determination and characterization of metronidazole-kaolin interaction" *Saudi Pharmaceutical Journal*, In press ([doi:10.1016/j.jsps.2014.06.006](https://doi.org/10.1016/j.jsps.2014.06.006))
111. Szente V., Bask F., Zelkó R., Süvegh K., "Prediction of the drug release stability of different polymeric matrix tablets containing metronidazole" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 54 (2011) p730-734
112. Qin Y-J., Wang P-F., Makawana J.A., Wang Z-C., Wang Z-N., Yan-Gu, Jiang A-Q., Zhu H-L., "Design, Synthesis and Biological Evaluation of Metronidazole-Thiazole Derivatives as Antibacterial Inhibitors", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 24 (2014) 22 p5279-5283
113. Yang J., Wang X., Zhu M., Liu H., Ma J., "Investigation of PAA/PVDF-NZVI hybrids for metronidazole removal: Synthesis, characterization, and reactivity characteristics" *Journal of Hazardous Materials* 264 (2014) p269- 277
114. Obot I.B., Ebenso E.E., Kabanda M.M., "Metronidazole as environmentally safe corrosion inhibitor for mild steel in 0.5 M HCl: Experimental and theoretical investigation", *Journal of Environmental Chemical Engineering* 1 (2013) 3 p431-439

115. Cheng H-Y, Randall C.S., Holl W W., Constantinides P.P., Yue T-L., Feuerstein G.Z., “Carvedilol-liposome interaction: evidence for strong association with the hydrophobic region of the lipid bilayers” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1284 (1996) 1-2 p20-28
116. Marques M.P.M., Oliveira P.J., Moreno A.J.M., Batista de Carvalho L., “Study of carvedilol by combined Raman spectroscopy and ab initio MO calculations” *Journal of Raman Spectroscopy* 33(2002) 778-783
117. Behn F., Michels S., Læer S., Blaschke G., “Separation of carvedilol enantiomers in very small volumes of human plasma by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence” *Journal of Chromatography B* 755 (2001) 1-2 111-117
118. Clohs L., McErlane K. M., “Development of a capillary electrophoresis assay for the determination of carvedilol enantiomers in serum using cyclodextrins” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 24 (2001) 4 545-554
119. Clohs L., McErlane K.M., “Comparison between capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography for the stereoselective analysis of carvedilol in serum” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical. Analysis* 31 (2003) 3 407-412
120. Yang E., Wang S., Kratz J., Cyronak M.J., “Stereoselective analysis of carvedilol in human plasma using HPLC/MS/MS after chiral derivatization” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 36 (2004) 3 609-615
121. “Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A”, Quality Guidelines, www.ich.org
122. “Impurities in New Drug Products Q3B”, Quality Guidelines, www.ich.org
123. “Kollidon, polyvinylpyrrolidone for pharmaceutical industry”, BASF, §2.4.4.2 <http://www.ut.ee/ARFA/tehnol/kollidon.pdf>
124. Muta H., Miwa M., Satoh M., “Ion-specific swelling of hydrophilic polymer gels” *Polymer* 42 (2001) p6313-6316
125. Muta H., Ishida K., Tamaki E., Satoh M., “An IR study on ion-specific and solvent-specific swelling of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) gel”, *Polymer* 43 (2002) p103-110
126. Roscigno P., Asaro F., Pellizer G., Ortona O., Paduano L., “Complex Formation between PVP and SDS studied through NMR”, *Langmuir* 19(2003) 9638-9644
127. Rickli H., Steiner S., Müller K., Hess O.M., “Betablockers in heart failure: Carvedilol Safety Assessment (CASA 2-trial)” *The European Journal of Heart Failure* 6 (2004) p761-768
128. Almeida D.R.P., Pistrexi L.F., Chass G.A., Torday L.L., Varro A., Papp J.G., Csizmadia I.G., “Density Functional Molecular Study on the Full Conformational Space of S-4-(2-Hydroxypropoxy)carbazol Fragment of Carvedilol (1-(9H-Carbazol-4-yloxy)-3-[2-(2-methoxyphenoxy)ethylamino]-2-propanol) in Vacuum and in Different Solvent Media” *Journal of Physical Chemistry A* 106 (2002) p10423-10436
129. Fitzpatrick S., McCabe J.F., Petts S.R., Booth S.W., “Effect of moisture on polyvinylpyrrolidone in accelerated stability testing”, *International Journal of Pharmaceuticals* 246 (2002) 143-151
130. Wang M., Wang X., Ching C.B., Chen W.N., “Proteomic profiling of cellular responses to Carvedilol enantiomers in vascular smooth muscle cells by iTRAQ-coupled 2-D LC-MS/MS”, *Journal of Proteomics* 73 (2010) 8 p1601-1611
131. Wang S., Cyronak M., Yang E., “Does a stable isotopically labeled internal standard always correct analyte response?: A matrix effect study on a LC/MS/MS method for the determination of carvedilol enantiomers in human plasma” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43 (2007) 2 p701-707
132. Jiang J., Tian L., Huang Y., Yan Y., Li Y., “Enantioselective and sensitive determination of carvedilol in human plasma using chiral stationary-phase column and reverse-phase liquid chromatography with tandem mass spectrometry” *Journal of Chromatography B* 960 (2014) 92-97
133. Eisenberg E., Patterson W., Kahn G.C., “High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of the enantiomers of carvedilol and its O-

- desmethyl metabolite in human plasma after chiral derivatization" *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 493 (1989) p105-115
134. Saito M., Kawana J., Ohno T., Kaneko M., Mihara K., Hanada K., Sugita R., Okada N., Oosato S., Nagayama M., Sumiyoshi T., Ogata H., "Enantioselective and highly sensitive determination of carvedilol in human plasma and whole blood after administration of the racemate using normal-phase high-performance liquid chromatography" *Journal of Chromatography B* 843 (2006) 1 p73-77
 135. Furlong M., He B., Mylott W., Zhao S., Mariannino T., Shen J., Stouffer B., "A validated enantioselective LC-MS/MS assay for the simultaneous determination of carvedilol and its pharmacologically active 4'-hydroxyphenyl metabolite in human plasma: Application to a clinical pharmacokinetic study" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 70 (2012) p 574-579
 136. Li J., Wang L., Wang S., Chen M., Gu E., Hu G., Ge R., "Simultaneous quantification of carvedilol and its metabolites in rat plasma by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and pharmacokinetic application" *Journal of Chromatography B* 974 (2015) 1 p138-146
 137. Medvedovici A., Albu F., Georgita C., Sora D.J., Galaon T., Udrescu S., David V., "Achiral-chiral LC/LC-FLD coupling for determination of carvedilol in plasma samples for bioequivalence purposes" *Journal of Chromatography B* 850 (2007) p327-335
 138. Oravcova J., Sojkova D., Lindner W., "Comparison of the Hummel-Dreyer method in high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis conditions for study of the interaction of (RS)-, (R)- and (S)-carvedilol with isolated plasma proteins" *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 682 (1996) 2 p349-357
 139. Zarghi A., Foroutan S.M., Shafaati A., Khoddam A., "Quantification of carvedilol in human plasma by liquid chromatography using fluorescence detection: Application in pharmacokinetic studies" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 44 (2007), 9 p250-253
 140. Henderson L., Tenero D., Baidoo C., Campanile A., Harter A., Boyle D., Danoff T., "Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Comparison of Controlled-Release Carvedilol and Immediate-Release Carvedilol at Steady State in Patients with Hypertension" *The American Journal of Cardiology* 98 (2006) 7, Suppl 1, p17-26
 141. Morante-Zarcelero S., Sierra I., "Comparative HPLC methods for β -blockers separation using different types of chiral stationary phases in normal phase and polar organic phase elution modes. Analysis of propranolol enantiomers in natural waters" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 62 (2012) p 33-41
 142. Carmo Borges N.C., Gustavo Duarte Mendes, Diogo de Oliveira Silva, Vinicius Marcondes Rezende, Rafael Eliseo Barrientos-Astigarraga, Gilberto De Nucci, "Quantification of carvedilol in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry: Application to bioequivalence study" *Journal of Chromatography B*, 822 (2005) 1-2, p 253-262
 143. Zakrzewski-Jakubiak M., de Denus S., Leblanc M.H., White M., Turgeon J., "Enantioselective quantification of carvedilol in human plasma by HPLC in heavily medicated heart failure patients" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 52 (2010) 4, 636-641
 144. Galanopoulou O., Rozou S, Antoniadou-Vyza E., "HPLC analysis, isolation and identification of a new degradation product in carvedilol tablets" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 48 (2008) 1 70-77
 145. Wang H., Zhang H., Gao Y., "Photocatalytic degradation of metronidazole in aqueous solution by niobate K6Nb10.8O30" *Wuhan University Journal of Natural Sciences* 15 (2010), 4, 345-349
 146. Wang DP, Yeh MK, "Degradation kinetics of metronidazole in solution." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 82 (1993) 1, 95-8
 147. Tonnesen H.H. *Photostability of drugs and drug formulations, Chapter 15* Taylor & Francis 1996

148. Hokama N., Hobara N., Kameya H., Ohshiro S., Sakanashi M., "Rapid and simple micro-determination of carvedilol in rat plasma by high-performance liquid chromatography" *Journal of Chromatography B* 732 (1999) 1 233-238
149. Ptáek P., Macek J., Klíma J., "Liquid chromatographic determination of carvedilol in human plasma" *Journal of Chromatography B* 789 (2003) 2 405-410
150. Gangl E.T., Annan M., Spooner N., Vouros P., "Reduction of Signal Suppression Effects in ESI-MS Using a Nanosplitting Device" *Analytical Chemistry* 73 (2001) 23, 5635-5644
151. Maurer H., Tenberken O., Kranzsch C., Weber A., Peters F.T., "Screening for library-assisted identification and fully validated quantification of 22 beta-blockers in blood plasma by liquid chromatography–mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization" *Journal of Chromatography A* 1058 (2004) 1-2, 169-181
152. Li J., Wang L., Wang S., Chen M., Gu E., Hu G., Ge R., "Simultaneous quantification of carvedilol and its metabolites in rat plasma by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and pharmacokinetic application" *Journal of Chromatography B* 974 (2015) 138–146
153. Gergov M., Robson J.N., Duchoslav E., Ojanperä I., "Automated liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for screening beta-blocking drugs in urine" *Journal of Mass Spectrometry* 35 (2000) 7, 912-918
154. Machida M., Watanabe M., Takechi S., Kakinoki S., Nomura A., "Measurement of carvedilol in plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection" *Journal of Chromatography B* 798 (2003) 2, 187-191
155. Major R.E., "The Role of the column in Preparative HPLC", *LC-GC Europe* 17 (10) (2004) 512-520
156. Saffaj T., Charrouf M., Abourriche A., Abboud Y., Bennamara A., Berrada M., "Spectrophotometric determination of metronidazole and secnidazole in pharmaceutical preparations" *IL FARMACO* 59 (2004) 843–846
157. Peng J., Hou C., Hu X., "Determination of metronidazole in pharmaceutical dosage forms based on reduction at graphene and ionic liquid composite film modified electrode" *Sensors and Actuators B* 169 (2012) 81– 87
158. Zhao L., Dou Y., Mi H., Ren M., Ren Y., "Non-destructive determination of metronidazole powder by using artificial neural networks on short-wavelength NIR spectroscopy" *Spectrochimica Acta Part A* 66 (2007) 1327–1332
159. Mollamahale Y.B., Ghorbani M., Ghalkhani M., Vossoughi M., Dolati A., "Highly sensitive 3D gold nanotube ensembles: Application to electrochemical determination of metronidazole, *Electrochimica Acta* 106 (2013), 288-292
160. El-Ghobashy M., Abo-Talib N., "Spectrophotometric methods for the simultaneous determination of binary mixture of metronidazole and diloxanide furoate without prior separation" *Journal of Advanced Research* (2010) 1, 323–329
161. Salem A., Mossa H., Barsoum B., "Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy for quantitative analysis of miconazole, metronidazole and sulfamethoxazole in pharmaceutical and urine samples" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41 (2006) 654–661
162. Salem A., Mossa H., "Method validation and determinations of levofloxacin, metronidazole and sulfamethoxazole in an aqueous pharmaceutical, urine and blood plasma samples using quantitative nuclear magnetic resonance spectrometry" *Talanta* 88 (2012) 104– 114
163. Nolina T., Lambert D., Owens R. Jr, "Stability of cefepime and metronidazole prepared for simplified administration as a single product" *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 56 (2006) 179–184
164. Wu Y., Fassih R., "Stability of metronidazole, tetracycline HCl and famotidine alone and in combination" *International Journal of Pharmaceutics* 290 (2005) 1–13
165. Tavakoli N., Varshosaz J., Dorkoosh F., Zargarzadeh M., "Development and validation of a simple HPLC method for simultaneous in vitro determination of amoxicillin and metronidazole at single wavelength" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43 (2007) 325–329

166. Wanga Y., Zhang P., Jianga N., Gong X., Meng L., Wang D., Ou N., Zhang H., “Simultaneous quantification of metronidazole, tinidazole, ornidazole and morinidazole in human saliva” *Journal of Chromatography B* 899 (2012) 27– 30
167. Bempong D., Manning R., Mirza T., Bhattacharyya L., “A stability-indicating HPLC assay for metronidazole benzoate” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 38 (2005) 776–780
168. Mishal A., Sober D., “Stability indicating reversed-phase liquid chromatographic determination of metronidazole benzoate and diloxanide furoate as bulk drug and in suspension dosage form” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 39 (2005) 819–823
