



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΣΧΟΛΗ
ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ
ΧΗΜΕΙΑΣ



ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΔΙΑΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ - ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΗΡΛC ΓΙΑ ΠΟΣΟΤΙΚΟ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ ΤΟΥ
ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΒΕΝΖΟΪΛΙΟΥ ΣΕ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ
ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ**

ΜΠΟΥΜΠΑΛΟΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ

ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ Τ.Ε.

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΑΘΗΝΑ

ΑΠΡΙΛΙΟΣ 2013

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΗΡΛC ΓΙΑ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΚΑΙ
ΕΛΕΓΧΟ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ ΤΟΥ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΒΕΝΖΟΪΛΙΟΥ ΣΕ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ
ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ**

ΜΠΟΥΜΠΑΛΟΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ

A.M.: 101306

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΚΟΥΠΠΑΡΗΣ ΜΙΧΑΗΛ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΙΧΑΗΛ ΚΟΥΠΠΑΡΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΕΚΠΑ

ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ ΓΚΙΚΑΣ, ΛΕΚΤΟΡΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΚΠΑ

ΙΩΑΝΝΗΣ ΝΤΟΤΣΙΚΑΣ, ΛΕΚΤΟΡΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ ΑΠΡΙΛΙΟΣ 2013

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο προσδιορισμός (assay) του υπεροξειδίου του βενζοϋλίου (BPO) ως δραστική ουσία σε κρέμα, καθώς και των προσμίξεων (impurities) με μία επικυρωμένη μέθοδο υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης σε αντικατάσταση της υπάρχουσας μεθόδου λεπτής στοιβάδας που περιγράφεται στην Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία.

Για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε παραγοντικός πειραματικός σχεδιασμός βελτιστοποίησης των συνθηκών της κατεργασίας του φαρμακευτικού σκευάσματος

Χρησιμοποιήθηκε: υγροχρωματογραφικό σύστημα της εταιρείας Shimadzu με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων, αναλυτική στήλη MZ-Analysentechnik GmbH, Spherisorb ODS-1 250 × 4,6 mm, 10 μm, κινητή φάση αποτελούμενη από οξικό οξύ, ακετονιτρίλιο και νερό (1:500:500 V/V/V), ροή κινητής φάσης 1,0 mL/min και μήκος κύματος ανιχνευτή στα 235 nm.

Οι αναπτυχθείσες μέθοδοι επικυρώθηκαν ως προς τα κριτήρια πιστότητας, ακρίβειας, ανιχνευσιμότητας, ανθεκτικότητας και κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς για τη δραστική ουσία και τις προσμίξεις.

Αντικείμενο της εργασίας αυτής αποτέλεσε επίσης η μελέτη διάσπασης του BPO έπειτα από την εφαρμογή ισχυρών οξειδωτικών, όξινων, αλκαλικών, θερμικών συνθηκών, καθώς και έπειτα από την επίδραση φωτός. Η εκλεκτικότητα της μεθόδου που αναπτύχθηκε αξιολογήθηκε έπειτα από μια σειρά πειραμάτων επιταχυνόμενης διάσπασης (forced degradation studies)

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Φαρμακευτική ανάλυση, Υγροχρωματογραφία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: υπεροξειδίο βενζοϋλίου, προσμίξεις, επικύρωση, υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης, εξαναγκασμένες μελέτες αποικοδόμησης

SUMMARY

Aim of this project is the assay of Benzoyl peroxide (BPO) and the determination of its related substances in a cream used against acne using a new validated HPLC method in the place of the existing for related substances thin layer chromatographic method as it is described in Eu. Ph.

The chromatographic conditions are as follows: HPLC system with photodiode array detector; column Spherisorb ODS-1 250 × 4.6 mm, 10 µm; mobile phase: a mixture of glacial acetic acid, ACN and water (1:500:500 V/V/V); Injection volume: 20 µL ; flow rate: 1.0 mL min⁻¹; autosampler temperature: ambient; run time: 30 min; quantification wavelength: 235 nm

A factorial experimental design for the optimization of the sample treatment of the cream was used.

The newly developed HPLC method was validated in terms of analytical characteristics according to ICH, such as linearity, precision, accuracy, specificity, robustness and quantification, and detection limits.

SUBJECT AREA: Pharmaceutical analysis, Liquid chromatography.

KEYWORDS: Benzoyl peroxide, impurities, HPLC, validation ,forced degradation studies.

..... στην Εύη και την μικρή μου Όλγα – Αναστασία.....
.....για την αγάπη και την υπομονή τους!

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την εκπόνηση της παρούσας ερευνητικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω: τον επιβλέποντα καθηγητή Κουτπάρη Μιχαήλ για την συνεργασία και την συμβολή του στην ολοκλήρωσή της,

Την υποψήφια Διδάκτορα Γκρεμηλογιάννη Αικατερίνη της οποίας η αμέριστη βοήθεια και η επιστημονικά εμπνευσμένη καθοδήγηση υπήρξε ακούραστη και πολύτιμη στην προσπάθεια αυτή,

Την υποψήφια Διδάκτορα Παπακονδύλη Θεοδώρα για την θετική συμβολή της.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο ΔΙΑΣΦΑΛΙΣΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	18
1.2 ΔΙΑΣΦΑΛΙΣΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ.....	18
1.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΑΎΛΩΝ.....	23
1.4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΕΛΙΚΟΥ ΠΡΟΙΟΝΤΟΣ.....	24
1.5 ΕΛΕΓΧΟΙ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ.....	25

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	26
2.2 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ – ΓΕΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ.....	26
2.3 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΥΧΥΑ.....	29
2.4 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ.....	32
2.4.1 ΣΤΑΤΙΚΗ ΦΑΣΗ.....	32
2.4.2 ΚΙΝΗΤΗ ΦΑΣΗ.....	33
2.4.3 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑ.....	33
2.4.4 ΙΣΟΡΡΟΠΙΑ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ.....	34
2.4.5 ΧΡΟΝΟΣ ΑΝΑΣΧΕΣΗΣ	34
2.4.6 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ.....	35
2.4.7 ΑΡΙΘΜΟΣ ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΝ ΠΛΑΚΩΝ.....	36
2.4.8 ΔΙΑΧΩΡΙΣΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ.....	37
2.4.9 ΘΕΩΡΙΑ ΤΗΣ ΤΑΧΥΤΗΤΑΣ.....	38
2.5 ΥΧΥΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΤΑΣΕΙΣ	39

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΒΕΝΖΟΥΪΛΙΟΥ

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	41
3.2 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ.....	41

3.3 ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΕΣ – ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ.....	42
3.4 ΑΛΛΕΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΧΡΗΣΕΙΣ.....	44
3.5 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ.....	44
3.6 ΑΛΛΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	47

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο ΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ-ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ

4.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ 2 ^η	48
4.2 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ.....	48
4.2.1 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ - ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ.....	49
4.2.2 ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ.....	50
4.2.3 ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ.....	50
4.2.4 ΕΥΡΟΣ Η ΠΕΡΙΟΧΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ – ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ.....	51
4.2.5 ΑΚΡΙΒΕΙΑ.....	52
4.2.6 ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ.....	53
4.2.7 ΕΝΔΙΑΜΕΣΗ ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ.....	54
4.2.8 ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ.....	54
4.2.9 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ.....	54
4.2.10 ΑΝΤΟΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	55
4.2.11 ΔΟΚΙΜΕΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ.....	55

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο ΟΡΓΑΝΑ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

5.1 ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΣΥΣΤΟΙΧΙΑΣ ΦΩΤΟΔΙΟΔΩΝ.....	56
5.2 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ.....	57
5.3 ΔΙΑΛΥΤΕΣ, ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΥΠΑ.....	58

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο ΑΝΑΠΤΥΞΗ-ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΗΡΛC/PDA ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΒΕΝΖΟΪΛΟΪΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ - ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΟΣ

6.1 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ.....	59
6.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ.....	59
6.3 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ.....	61
6.3.1 ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ.....	63
6.3.2 ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ.....	63
6.3.2.1 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟ ΤΗΣ ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΗΣ (ASSAY).....	64
6.3.2.2 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟ ΤΗΣ ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ (IMPURITIES).....	64
6.3.3 ΑΚΡΙΒΕΙΑ.....	66
6.3.3.1 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟ ΤΗΣ ΑΚΡΙΒΕΙΑΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΗΣ (ASSAY).....	66
6.3.3.2 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟ ΤΗΣ ΑΚΡΙΒΕΙΑΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ (IMPURITIES).....	67
6.3.4 ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ.....	68
6.3.5 ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ.....	68
6.3.6 ΟΡΙΟ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	69
6.4 ΔΟΚΙΜΕΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ.....	69

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΒΕΝΖΟΪΛΟΪΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ

7.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΤΗΣ ΚΡΕΜΑΣ.....	70
7.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ (ASSAY).....	73
7.2.1 ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ.....	73

7.2.2 ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ ΕΥΡΟΣ.....	75
7.2.3 ΑΚΡΙΒΕΙΑ.....	77
7.2.4 ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ.....	77
7.2.5 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ.....	78
7.2.6 ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΜΙΑ ΗΜΕΡΑ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ 25°C.....	79
7.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ (IMPURITIES).....	80
7.3.1 ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ.....	80
7.3.2 ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ.....	81
7.3.3 ΑΚΡΙΒΕΙΑ.....	90
7.3.4 ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ.....	92
7.3.5 ΟΡΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ.....	94
7.3.6 ΟΡΙΑ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	95
7.3.7 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ.....	95
7.3.8 ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΜΙΑ ΗΜΕΡΑ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ 25°C.....	98
7.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ.....	99
7.4.1 ΘΕΡΜΙΚΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ.....	99
7.4.2 ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΦΩΤΟΣ.....	99
7.4.3 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ.....	100
7.4.4 ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΙΣΧΥΡΟΥ ΟΞΕΟΣ.....	101
7.4.5 ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΙΣΧΥΡΗΣ ΒΑΣΗΣ.....	102
7.4.6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΠΟΡΕΙΩΝ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ.....	103

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1 Αυθεντικά σχέδια των πειραμάτων Tswett	27
Σχήμα 2 Η στήλη της ΥΧΥΑ	29
Σχήμα 3 Οργανολογία HPLC	30
Σχήμα 4 Πορεία διαχωρισμού σε μία στήλη.....	32
Σχήμα 5 Τυπικό χρωματογράφημα	36
Σχήμα 6 Χρωματογράφημα για τον υπολογισμό των θεωρητικων πλακών ..	37
Σχήμα 7 Διάγραμμα Van Deemter	39
Σχήμα 8 Δομή Βενζοϋλουπεροξειδίου	41
Σχήμα 9 Χάρτης “Pareto” για την Απόκριση.....	72
Σχήμα 10 Επίδραση Παραγόντων στην Απόκριση	72
Σχήμα 11 Επίδραση Παραγόντων στην Απόκριση - Διάγραμμα επιφανείας.	73
Σχήμα 12 Χρωματογράφημα Λευκού διαλύματος	74
Σχήμα 13 Τυπικό χρωματογράφημα BPO	74
Σχήμα 14 Καμπύλη βαθμονόμησης προτύπων διαλυμάτων BPO.....	76
Σχήμα 15 Διάγραμμα υπολοίπων προτύπων διαλυμάτων BPO	76
Σχήμα 16 Τυπικό χρωματογράφημα μίγματος Προσμίξεων.....	81
Σχήμα 17 Καμπύλη βαθμονόμησης προτύπων διαλυμάτων Πρόσμιξης Α	83
Σχήμα 18 Διάγραμμα υπολοίπων προτύπων διαλυμάτων Πρόσμιξης Α	83
Σχήμα 19 Καμπύλη βαθμονόμησης προτύπων διαλυμάτων Πρόσμιξης Β	85
Σχήμα 20 Διάγραμμα υπολοίπων προτύπων διαλυμάτων Πρόσμιξης Β	85
Σχήμα 21 Καμπύλη βαθμονόμησης προτύπων διαλυμάτων Πρόσμιξης Γ	87
Σχήμα 22 Διάγραμμα υπολοίπων προτύπων διαλυμάτων Πρόσμιξης Γ	87
Σχήμα 23 Καμπύλη βαθμονόμησης προτύπων διαλυμάτων BPO μεθόδου προσμίξεων	89
Σχήμα 24 Διάγραμμα υπολοίπων προτύπων διαλυμάτων BPO μεθόδου προσμίξεων	89

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1 Φυσικοχημικές ιδιότητες Βενζοϋλουπεροξειδίου (BPO)[25]	42
Πίνακας 2 Μέθοδοι HPLC για τον προσδιορισμό BPO	44
Πίνακας 3 Αξιολόγηση Αναλυτικών μεθόδων για επικύρωση.....	50
Πίνακας 4 Πειράματα πειραματικού σχεδιασμού.....	60
Πίνακας 5 Παράγοντες πειραματικού σχεδιασμού και Απόκριση	61
Πίνακας 6 Βασικός Πειραματικός Σχεδιασμός.....	70
Πίνακας 7 Ανάλυση Διακύμανσης για τη Απόκριση	70
Πίνακας 8 Πίνακας βέλτιστης απόκρισης	71
Πίνακας 9 Αποτελέσματα για τη μελέτη της γραμμικότητας	75
Πίνακας 10 Αποτελέσματα για τη μελέτη της Ακρίβειας	77
Πίνακας 11 Αποτελέσματα για τον έλεγχο της Πιστότητας.....	78
Πίνακας 12 Παράγοντες μελέτης της Ανθεκτικότητας.....	78
Πίνακας 13 Πειράματα για τον έλεγχο της ανθεκτικότητας.....	79
Πίνακας 14 Πειράματα Σταθερότητας	80
Πίνακας 15 Αποτελέσματα γραμμικότητας Πρόσμιξης Α.....	82
Πίνακας 16 Αποτελέσματα Γραμμικότητας Πρόσμιξης Β	84
Πίνακας 17 Αποτελέσματα Γραμμικότητας Πρόσμιξης Γ.....	86
Πίνακας 18 Αποτελέσματα Γραμμικότητας BPO (χρησιμοποιείται ως πρότυπο για τις προσμίξεις).....	88
Πίνακας 19 Αποτελέσματα Ακρίβειας Πρόσμιξης Α	90
Πίνακας 20 Αποτελέσματα Ακρίβειας Πρόσμιξης Β	90
Πίνακας 21 Αποτελέσματα Ακρίβειας Πρόσμιξης Γ	91
Πίνακας 22 Αποτελέσματα Πιστότητας Πρόσμιξη Α.....	92
Πίνακας 23 Αποτελέσματα Πιστότητας Πρόσμιξης Β	93
Πίνακας 24 Αποτελέσματα Πιστότητας Πρόσμιξης Γ	93
Πίνακας 25 Αποτελέσματα Ανθεκτικότητας Πρόσμιξης Α.....	96
Πίνακας 26 Αποτελέσματα Ανθεκτικότητας Πρόσμιξης Β.....	96
Πίνακας 27 Αποτελέσματα Ανθεκτικότητας Πρόσμιξης Γ	97
Πίνακας 28 Αποτελέσματα Σταθερότητας Πρόσμιξης Α.....	98
Πίνακας 29 Αποτελέσματα Σταθερότητας Πρόσμιξης Β.....	98
Πίνακας 30 Αποτελέσματα Σταθερότητας Πρόσμιξης Γ	98
Πίνακας 31 Μελέτη θερμικής διάσπασης	99

Πίνακας 32 Μελέτη επίδρασης τεχνητού φωτός.....	100
Πίνακας 33 Μελέτη οξειδωτικής αποικοδόμησης	101
Πίνακας 34 Μελέτη επίδρασης με υδροχλωρικό οξύ.....	102
Πίνακας 35 Μελέτη διάσπασης με καυστικό νάτριο	102

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΔΙΑΣΦΑΛΙΣΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ [1]

Ως φάρμακο νοείται κάθε ουσία ή συνδυασμός ουσιών που χαρακτηρίζεται ως έχουσα θεραπευτικές ή προληπτικές ιδιότητες έναντι ασθενειών ανθρώπων ή ζώων. Θεωρείται, ομοίως, ως φάρμακο, κάθε ουσία ή συνδυασμός ουσιών που δύναται να χορηγηθεί σε άνθρωπο ή ζώο, για να γίνει ιατρική διάγνωση ή να αποκατασταθούν, να βελτιωθούν ή να τροποποιηθούν οργανικές λειτουργίες στον άνθρωπο ή στα ζώα.

1.2 ΔΙΑΣΦΑΛΙΣΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ [1-3]

Οι βασικές έννοιες της Διασφάλισης Ποιότητας, των Κανόνων Ορθής Παραγωγής (Good Manufacture Practices), του Ελέγχου της Ποιότητας και της Διαχείρισης κινδύνου στην ποιότητα (Quality Risk Management) αλληλοσυνδέονται. Η Διασφάλιση Ποιότητας είναι μια αρχή ευρείας έκτασης που καλύπτει όλα τα θέματα, τα οποία το καθένα ή όλα μαζί επηρεάζουν την ποιότητα του προϊόντος. Αποτελεί το σύνολο των οργανωμένων ρυθμίσεων, που γίνονται με σκοπό να εξασφαλίζεται, ότι τα φαρμακευτικά προϊόντα έχουν την ποιότητα, που απαιτείται για τη χρήση για την οποία προορίζονται. Ειδικότερα, ο κάτοχος Άδειας Παραγωγής πρέπει να παρασκευάζει φαρμακευτικά προϊόντα με τρόπο τέτοιο, ώστε να εξασφαλίζεται, ότι είναι κατάλληλα για τη χρήση, για την οποία προορίζονται, ότι είναι σύμφωνα με τις απαιτήσεις της Άδειας Κυκλοφορίας τους και ότι δεν εκθέτουν τους ασθενείς σε κίνδυνο εξαιτίας μη επαρκούς ασφάλειας, ποιότητας ή αποτελεσματικότητας. Η επίτευξη αυτού του σκοπού ποιότητας είναι ευθύνη της ανώτερης διοίκησης και απαιτεί την συμμετοχή και την ανάληψη ευθύνης εκ μέρους του προσωπικού σε πολλά διαφορετικά τμήματα και σε όλα τα επίπεδα μέσα στην επιχείρηση, εκ μέρους των προμηθευτών της επιχείρησης και εκ μέρους των διανομέων. Συνεπώς, η Διασφάλιση της Ποιότητας ενσωματώνει τους Κανόνες Ορθής Παραγωγής μαζί με άλλους παράγοντες

της παραγωγικής διαδικασίας, τεκμηριώνεται πλήρως και παρακολουθείται η αποτελεσματικότητά της σε όλα τα στάδια.

Το σύστημα Διασφάλισης Ποιότητας που είναι κατάλληλο για την παραγωγή φαρμακευτικών προϊόντων πρέπει να εξασφαλίζει ότι:

1. τα φαρμακευτικά προϊόντα σχεδιάζονται και αναπτύσσονται κατά τρόπο που λαμβάνει υπόψη τις απαιτήσεις των Κανόνων Ορθής Παραγωγής,
2. οι εργασίες παραγωγής και ελέγχου καθορίζονται με σαφήνεια από τη διοίκηση,
3. γίνονται ρυθμίσεις για την παραγωγή, την προμήθεια και τη χρήση των σωστών α' υλών και υλικών συσκευασίας,
4. διεξάγονται όλοι οι αναγκαίοι έλεγχοι στα ενδιάμεσα προϊόντα και κατά τη διάρκεια της παραγωγής και γίνονται αξιολογήσεις της αξιοπιστίας,
5. το τελικό προϊόν έχει παρασκευασθεί και ελεγχθεί σωστά, σύμφωνα με καθορισμένες διαδικασίες,
6. τα φαρμακευτικά προϊόντα δεν πωλούνται ή τίθενται σε κυκλοφορία πριν το Ειδικευμένο Πρόσωπο να πιστοποιήσει ότι κάθε παρτίδα παραγωγής έχει παραχθεί και ελεγχθεί σύμφωνα με τις απαιτήσεις της Άδειας Κυκλοφορίας και οποιουσδήποτε άλλους κανονισμούς σχετικούς με την παραγωγή, τον έλεγχο και την αποδέσμευση των φαρμακευτικών προϊόντων,
7. υφίστανται ικανοποιητικές ρυθμίσεις για να εξασφαλίζουν, όσο αυτό είναι δυνατόν, ότι τα φαρμακευτικά προϊόντα αποθηκεύονται, διανέμονται και ακολούθως χειρίζονται με τρόπο, ώστε η ποιότητα να διατηρείται σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους,
8. υπάρχει διαδικασία για Αυτο-Επιθεώρηση και/ ή εξέταση ποιότητας, με την οποία τακτικά αξιολογείται η αποτελεσματικότητα και η δυνατότητα εφαρμογής του συστήματος Διασφάλισης Ποιότητας.

Οι Κανόνες Ορθής Παραγωγής είναι το μέρος εκείνο της Διασφάλισης Ποιότητας, με το οποίο διασφαλίζεται, ότι τα προϊόντα συστηματικά παράγονται ομοιόμορφα και ελέγχονται σύμφωνα με τα πρότυπα ποιότητας, που είναι κατάλληλα για τη χρήση, για την οποία προορίζονται και όπως απαιτείται από την Άδεια Κυκλοφορίας ή τις προδιαγραφές του προϊόντος. Οι

Κανόνες Ορθής Παραγωγής αναφέρονται τόσο στην παραγωγή, όσο και στον έλεγχο ποιότητας. Οι βασικές απαιτήσεις των GMP είναι ότι:

α) Όλες οι διαδικασίες παραγωγής καθορίζονται με σαφήνεια, επανεξετάζονται συστηματικά υπό το φως της εμπειρίας και καταδεικνύεται ότι είναι ικανές να παράγουν συστηματικά φαρμακευτικά προϊόντα με την απαιτούμενη ποιότητα και ότι συμφωνούν με τις προδιαγραφές τους.

β) Τα κρίσιμα στάδια των διαδικασιών παραγωγής και οι σημαντικές αλλαγές στη διαδικασία υπόκεινται σε έλεγχο της αξιοπιστίας,

γ) Παρέχονται όλα τα αναγκαία μέσα για την τήρηση των GMP, συμπεριλαμβανομένων: του κατάλληλα ειδικευμένου και εκπαιδευμένου προσωπικού, των επαρκών εγκαταστάσεων και χώρων, του κατάλληλου εξοπλισμού και υπηρεσιών, των σωστών υλικών, περιεκτών και ετικετών, των εγκεκριμένων διαδικασιών και οδηγιών, της κατάλληλης αποθήκευσης και μεταφοράς.

δ) Οι οδηγίες και οι διαδικασίες έχουν γραφεί με καθοδηγητικό τρόπο σε γλώσσα σαφή και χωρίς διφορούμενες έννοιες, εφαρμόσιμη ειδικά στο συγκεκριμένο πλαίσιο εργασίας.

ε) Οι χειριστές εκπαιδεύονται να διεξάγουν σωστά τις διαδικασίες.

στ) Δημιουργούνται αρχεία, χειρόγραφα και/ ή με όργανα καταγραφής, κατά την παραγωγή, τα οποία δείχνουν ότι πραγματικά έγιναν όλα τα στάδια που απαιτούνται από τις συγκεκριμένες διαδικασίες και οδηγίες και ότι η ποσότητα και η ποιότητα του προϊόντος ήταν η αναμενόμενη. Οποιοσδήποτε σημαντικές αποκλίσεις έχουν πλήρως καταγραφεί και διερευνηθεί.

ζ) Τηρούνται με μορφή κατάλληλη και προσβάσιμη στα αρχεία για την παραγωγή, συμπεριλαμβανομένης της διανομής, τα οποία δίνουν τη δυνατότητα για αναδρομική ανίχνευση του πλήρους ιστορικού της παρτίδας.

η) Η διανομή (χονδρική πώληση) των προϊόντων ελαχιστοποιεί κάθε κίνδυνο για την ποιότητα τους.

θ) Είναι διαθέσιμο ένα σύστημα για ανάκληση κάθε παρτίδας προϊόντος, από την πώληση ή τον εφοδιασμό.

ι) Εξετάζονται τα παράπονα σχετικά με τα προϊόντα, που διατίθενται στο εμπόριο, τα αίτια για ελαττώματα ποιότητας διερευνώνται και λαμβάνονται κατάλληλα μέτρα σχετικά με τα ελαττωματικά προϊόντα και προκειμένου να αποφευχθεί η εκ νέου εμφάνισή τους.

Ο Έλεγχος Ποιότητας είναι το μέρος των Κανόνων Ορθής Παραγωγής το οποίο περιλαμβάνει τη δειγματοληψία, τις προδιαγραφές και τον έλεγχο και το οποίο μαζί με τις διαδικασίες οργάνωσης, τεκμηρίωσης και αποδέσμευσης εξασφαλίζει ότι πραγματικά διεξάγονται οι αναγκαίοι και σχετικοί έλεγχοι και ότι τα υλικά δεν αποδεσμεύονται προς χρήση, ούτε τα προϊόντα αποδεσμεύονται προς πώληση ή προμήθεια μέχρι να έχει κριθεί ότι είναι ικανοποιητική η ποιότητά τους. Οι βασικές απαιτήσεις του Ελέγχου Ποιότητας εξασφαλίζουν ότι:

α) Διατίθενται επαρκείς παροχές (διευκολύνσεις), εκπαιδευμένο προσωπικό και εγκεκριμένες διαδικασίες για τη δειγματοληψία, την επιθεώρηση και τον έλεγχο των πρώτων υλών, των υλικών συσκευασίας, των ενδιάμεσων προϊόντων, των χύμα και των τελικών προϊόντων και όπου είναι κατάλληλο για την παρακολούθηση των περιβαλλοντικών συνθηκών για τους σκοπούς της GMP.

β) Από τις πρώτες ύλες, τα υλικά συσκευασίας, τα ενδιάμεσα προϊόντα, τα χύμα προϊόντα και τα τελικά προϊόντα λαμβάνονται δείγματα από προσωπικό και με μεθόδους που έχουν εγκριθεί από τον Έλεγχο ποιότητας.

γ) Αξιολογείται η αξιοπιστία των μεθόδων ελέγχου.

δ) Τηρούνται αρχεία, χειρόγραφα και/ ή με όργανα καταγραφής, τα οποία δείχνουν ότι διεξάγονται πραγματικά όλες οι απαιτούμενες διαδικασίες δειγματοληψίας, επιθεώρησης και ελέγχου. Οποιοσδήποτε αποκλίσεις καταγράφονται και διερευνώνται πλήρως.

ε) Τα τελικά προϊόντα περιέχουν δραστικά συστατικά, που συμφωνούν με την ποιοτική και την ποσοτική σύνθεση της Άδειας Κυκλοφορίας, έχουν την απαιτούμενη καθαρότητα και περιέχονται μέσα στους δικούς τους περιέκτες και φέρουν την ορθή επισήμανση.

στ) Τηρούνται αρχεία με τα αποτελέσματα της επιθεώρησης και ότι ο έλεγχος των πρώτων υλών, των ενδιάμεσων, των χύμα και των τελικών προϊόντων αξιολογείται τυπικά έναντι των προδιαγραφών. Η αξιολόγηση του προϊόντος περιλαμβάνει εξέταση και αξιολόγηση της σχετικής τεκμηρίωσης παραγωγής και αξιολόγηση των αποκλίσεων από τις καθορισμένες διαδικασίες.

ζ) Δεν αποδεσμεύεται καμία παρτίδα προϊόντος προς πώληση ή εφοδιασμό πριν από την πιστοποίηση από Ειδικευμένο Πρόσωπο ότι αυτή συμφωνεί με τις απαιτήσεις της Άδειας Κυκλοφορίας.

η) Διατηρούνται επαρκή δείγματα αναφοράς των πρώτων υλών και των προϊόντων προκειμένου να επιτρέπεται η μελλοντική εξέταση του προϊόντος, αν είναι αναγκαίο, και ότι το προϊόν διατηρείται στην τελική του συσκευασία εκτός αν παραχθούν κατ' εξαίρεση μεγάλες συσκευασίες.

Η διαχείριση του Κινδύνου στην Ποιότητα (Quality Risk Management) είναι μία συστηματική διεργασία για την αξιολόγηση, τον έλεγχο, την επικοινωνία και την ανασκόπηση των κινδύνων στην ποιότητα των φαρμακευτικών προϊόντων. Μπορεί να εφαρμοστεί είτε εκ των προτέρων, είτε αναδρομικά. Το σύστημα διαχείρισης κινδύνου στην Ποιότητα πρέπει να διασφαλίζει ότι:

α) Η αξιολόγηση του κινδύνου στην Ποιότητα βασίζεται στην επιστημονική γνώση, την εμπειρία σχετικά με τη διεργασία και τελικά συνδέεται με την προστασία του ασθενούς.

β) Το επίπεδο της προσπάθειας, της τυπικότητας και της τεκμηρίωσης στη διεργασία της διαχείρισης του κινδύνου στην Ποιότητα, είναι ανάλογο του επιπέδου του κινδύνου.

1.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ Α΄ ΥΛΩΝ [1]

Ως πρώτες ύλες θεωρούνται όλα τα συστατικά του φαρμακευτικού προϊόντος και αν είναι ανάγκη και ο περιέκτης.

Σε περίπτωση που ένα δραστικό συστατικό δεν παράγεται από τον αιτούντα παρασκευής και:

α) δεν περιγράφεται στην Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία ή τη Φαρμακοποιία κράτους μέλους ή

β) περιγράφεται στην Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία ή Φαρμακοποιία κράτους μέλους, αλλά η μέθοδος παρασκευής ενδέχεται να καταλείπει προσμίξεις που δεν περιγράφονται στη μονογραφία της Φαρμακοποιίας, χωρίς η μονογραφία να εξασφαλίζει ικανοποιητικό έλεγχο για αυτές τις προσμίξεις, ο αιτών μπορεί να φροντίσει ώστε η λεπτομερής περιγραφή της μεθόδου βιομηχανικής παραγωγής, τα στοιχεία του ποιοτικού ελέγχου κατά τη διάρκεια παραγωγής και της διαδικασίας για την αξιολόγηση της καταλληλότητας της μεθόδου να παρέχονται απ΄ευθείας στις αρμόδιες αρχές από τον παραγωγό του δραστικού συστατικού. Στην περίπτωση αυτή όμως, ο παραγωγός παρέχει στον αιτούντα όλα τα αναγκαία στοιχεία που θα του επιτρέψουν να αναλάβει τις ευθύνες του για το φάρμακο. Ο παραγωγός δεσμεύεται γραπτώς προς τον αιτούντα να εξασφαλίζει ομοιογένεια μεταξύ των διαφόρων παρτίδων και να μην τροποποιήσει τη διαδικασία παραγωγής ή τις προδιαγραφές χωρίς να ενημερώσει σχετικά τον αιτούντα. Τα έγγραφα και τα πληροφοριακά στοιχεία που στηρίζουν την αίτηση για την εν λόγω τροποποίηση υποβάλλονται στις αρμόδιες αρχές.

Τα πληροφοριακά στοιχεία και τα έγγραφα, που πρέπει να συνοδεύουν την αίτηση άδειας, περιλαμβάνουν τα αποτελέσματα των δοκιμασιών που

αφορούν τον έλεγχο ποιότητας όλων των συστατικών που έχουν χρησιμοποιηθεί και υποβάλλονται σύμφωνα με συγκεκριμένους κανόνες.

1.4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΕΛΙΚΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

Για τον έλεγχο του τελικού προϊόντος, ως παρτίδα τελικού προϊόντος νοείται το σύνολο των μονάδων μιας φαρμακοτεχνικής μορφής που προέρχονται από την ίδια αρχική ποσότητα υλικού και έχουν παρασκευασθεί ή/και αποστειρωθεί μαζί, ή, στην περίπτωση συνεχούς παραγωγικής διαδικασίας, το σύνολο των μονάδων που παρασκευάστηκαν μέσα σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Η αίτηση για την χορήγηση άδειας κυκλοφορίας συνοδεύεται από τις δοκιμασίες που εφαρμόζονται συνήθως σε κάθε παρτίδα τελικού προϊόντος, ενώ για τις δοκιμασίες που διεξάγονται πάντοτε αναφέρεται η συχνότητά τους.

Τα πληροφοριακά στοιχεία και έγγραφα, που πρέπει να επισυνάπτονται στην αίτηση άδειας κυκλοφορίας περιλαμβάνουν ιδιαίτερα τα σχετιζόμενα με τους ελέγχους που διεξάγονται στο τελικό προϊόν κατά την απελευθέρωσή του. Αυτά υποβάλλονται σύμφωνα με συγκεκριμένους κανόνες.

Οι έλεγχοι και οι προδιαγραφές της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας, ή της Φαρμακοποιίας κράτους μέλους για τις φαρμακοτεχνικές μορφές, τους ανοσοορούς, τα εμβόλια και τα ραδιοφαρμακευτικά παρασκευάσματα εφαρμόζονται σε όλα τα προϊόντα που καθορίζονται σε αυτές. Για όλους τους ελέγχους των βιολογικών φαρμάκων, που δεν καθορίζονται στην Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία ή Φαρμακοποιία κράτους μέλους, οι διαδικασίες και τα κριτήρια αποδοχής που έχουν δημοσιευθεί ως συστάσεις στις απαιτήσεις για τις βιολογικές ουσίες, χρησιμεύουν ως κατευθυντήριες γραμμές.

Εάν χρησιμοποιούνται διαδικασίες δοκιμασιών ή όρια εκτός εκείνων που αναφέρονται στις μονογραφίες της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας ή Φαρμακοποιίας κράτους μέλους, πρέπει να αποδεικνύεται ότι το τελικό προϊόν, αν υποβληθεί στις δοκιμασίες των μονογραφιών αυτών θα ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις ποιότητας που προβλέπονται από τη Φαρμακοποιία για την εξεταζόμενη φαρμακοτεχνική μορφή.

1.5 ΕΛΕΓΧΟΙ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ [1]

Αποτελούν τους ελέγχους που διενεργούνται και που αποσκοπούν στο να διαπιστωθεί η καθαρότητα του υπό εξέταση φαρμάκου σε σχέση με την παρουσία ουσιών που συνυπάρχουν στην πρώτη ύλη, δηλαδή των προσμίξεων. Αυτές προβλέπεται να συνυπάρχουν στην πρώτη ύλη, είτε ως υπολείμματα αντιδραστηρίων παρασκευής, είτε ως παραπροϊόντα και ιδιαίτερος ελέγχονται εκείνες οι οποίες είναι εν δυνάμει επιβλαβείς. Περαιτέρω διακρίνονται σε εκείνες που επιτρέπονται σε ανεκτά όρια (ακίνδυνες έως 0,5%, 1%, 3%), και σε εκείνες των οποίων η παρουσία είναι ανεπίτρεπτη. Συνοπτικά οι έλεγχοι καθαρότητας αφορούν στον έλεγχο:

pH, εμφάνιση διαλύματος, απορρόφησης, ειδική στροφής, οξύτητας, συγγενών ουσιών, ελέγχου ισομερών, Αριθμών: οξέων (σαπωνοποίησης, εστέρων, υδροξυλίων, ιωδίου, υπεροξειδίων, ασαπωνοποίητα, τέφρα ολική, θειική, αδιάλυτη στο HCl, υδατοδιαλυτή) απώλειας κατά την ξήρανση, προσδιορισμού νερού, βαρέων μετάλλων, ορίων ανοργάνων ιόντων (σίδηρος, φωσφορικά, αμμώνιο, αρσενικό, ασβέστιο, χλωριούχα, φθοριούχα, μαγνήσιο, κάλιο, θειικά, αργίλιο), και ορίων υπολειμμάτων διαλυτών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ [4]

Η HPLC αποτελεί την περισσότερο χρησιμοποιούμενη τεχνική διαχωρισμού με εφαρμογή σε πολλούς κλάδους των επιστημών, όπως η Βιολογία, η Ιατρική, η Φαρμακευτική, η Επιστήμη Τροφίμων και έχει χρησιμοποιηθεί για διαχωρισμούς ουσιών με μοριακά βάρη από 54 – 450.000 Da.

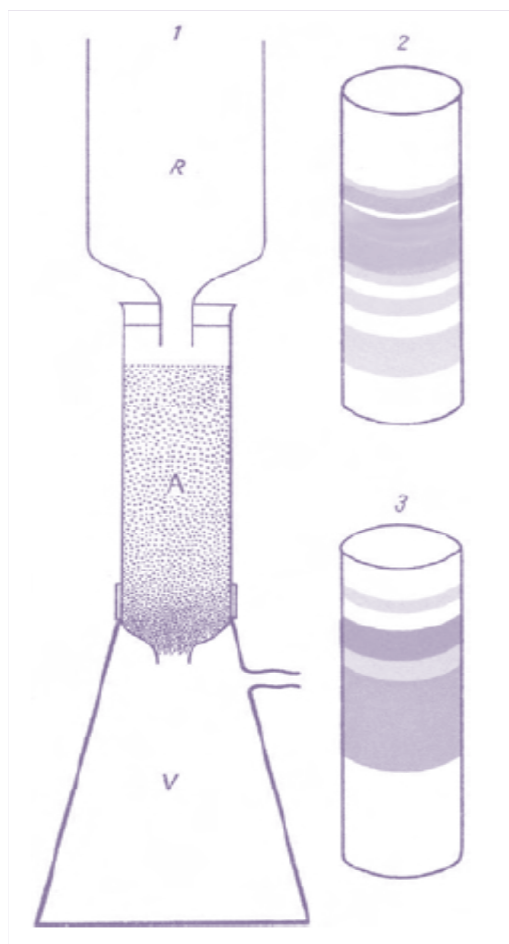
Ο κατά IUPAC ορισμός της χρωματογραφίας το 1993 δίνεται ως μία φυσική μέθοδος διαχωρισμού κατά την οποία τα προς διαχωρισμό συστατικά ενός μίγματος κατανέμονται μεταξύ δύο φάσεων, η μεν πρώτη αποτελεί τη στατική φάση, ενώ η άλλη κινείται προς μία ορισμένη κατεύθυνση.

Μία μέθοδος HPLC προσφέρει συνδυασμό ταχύτητας, επαναληψιμότητας και ευαισθησίας. Σχεδόν οποιοδήποτε συστατικό μπορεί να συγκρατηθεί και να διαχωριστεί σε μία χρωματογραφική στήλη. Οι διαχωρισμοί με την HPLC έχουν επιτευχθεί βασιζόμενοι στις διαφορές στην πολικότητα, σχήμα, μέγεθος, φορτίο ειδική συγγένεια, στερεο- και οπτική ισομέρεια. Διαφορετικές στήλες έχουν αναπτυχθεί για να διαχωρίσουν από μίγματα μικρών οργανικών ενώσεων (πχ που λαμβάνουν μέρος στον κύκλο του Krebs) μέχρι μίγματα μακρομοριακών ενώσεων (πχ πρωτεΐνες αντιγόνα και τμήματα DNA). Λιπαρά οξέα μπορούν επίσης να διαχωριστούν με βάση των αριθμό ατόμων στις ανθρακικές αλυσίδες .

Οι λόγοι αυτής της αποδοχής της τεχνικής είναι η ευαισθησία της, η εύκολη προσαρμογή της σε ακριβείς ποσοτικούς προσδιορισμούς, η καταλληλότητά της για διαχωρισμούς μη πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων συστατικών και κυρίως, η εφαρμοσιμότητά της σε προσδιορισμούς ουσιών πρωτίστου ενδιαφέροντος για τη βιομηχανία, το δημόσιο και πολλά επιστημονικά πεδία.

2.2 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ – ΓΕΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ [5-7]

Το 1906 ο Michael Tswett Ρώσος χημικός βοτανολόγος χρησιμοποιεί τον όρο μελετώντας το διαχωρισμό της χλωροφύλλης και άλλων χρωστικών χρησιμοποιώντας ειδική διάταξη που φαίνεται στο σχήμα 1.



1930 αναγνωρίζεται η σημασία της εργασίας του Tswett και αναπτύσσεται η χρωματογραφία χάρτου και λεπτής στοιβάδας.

1940 αναπτύσσεται η χρωματογραφία ιονανταλλαγής και στήλης.

1950 γίνονται οι αρχικές μελέτες για την αέρια χρωματογραφία με την ανάπτυξη της αέριας χρωματογραφίας προσρόφησης.

1960 έως σήμερα: Δόθηκαν 12 βραβεία Nobel για τη χρωματογραφία ως μέθοδο ρουτίνας στη Χημεία- Βιολογία- Έλεγχος ποιότητας (παρασκευαστική τεχνική – αναλύσεις ιχνοποσοτήτων).

Σχήμα 1 Αυθεντικά σχέδια των πειραμάτων Tswett [7]

Ανάλογα με το είδος των στατικών και κινητών φάσεων που βρίσκονται σε επαφή οι χρωματογραφικές τεχνικές μπορούν να ταξινομηθούν με δύο τρόπους. Την χρωματογραφία στήλης, όπου η στατική φάση συγκρατείται σε μία στενή στήλη μέσα από την οποία εξαναγκάζεται να διέλθει η κινητή φάση μετά από εφαρμογή πίεσης. Επίσης υπάρχει η επίπεδη χρωματογραφία κατά την οποία η στατική φάση στηρίζεται σε μία επίπεδη πλάκα ή στους πόρους ενός χαρτιού. Η κινητή φάση στη συγκεκριμένη περίπτωση κινείται μέσω της στατικής φάσης με τριχοειδή φαινόμενα ή λόγω επίδρασης της βαρύτητας.

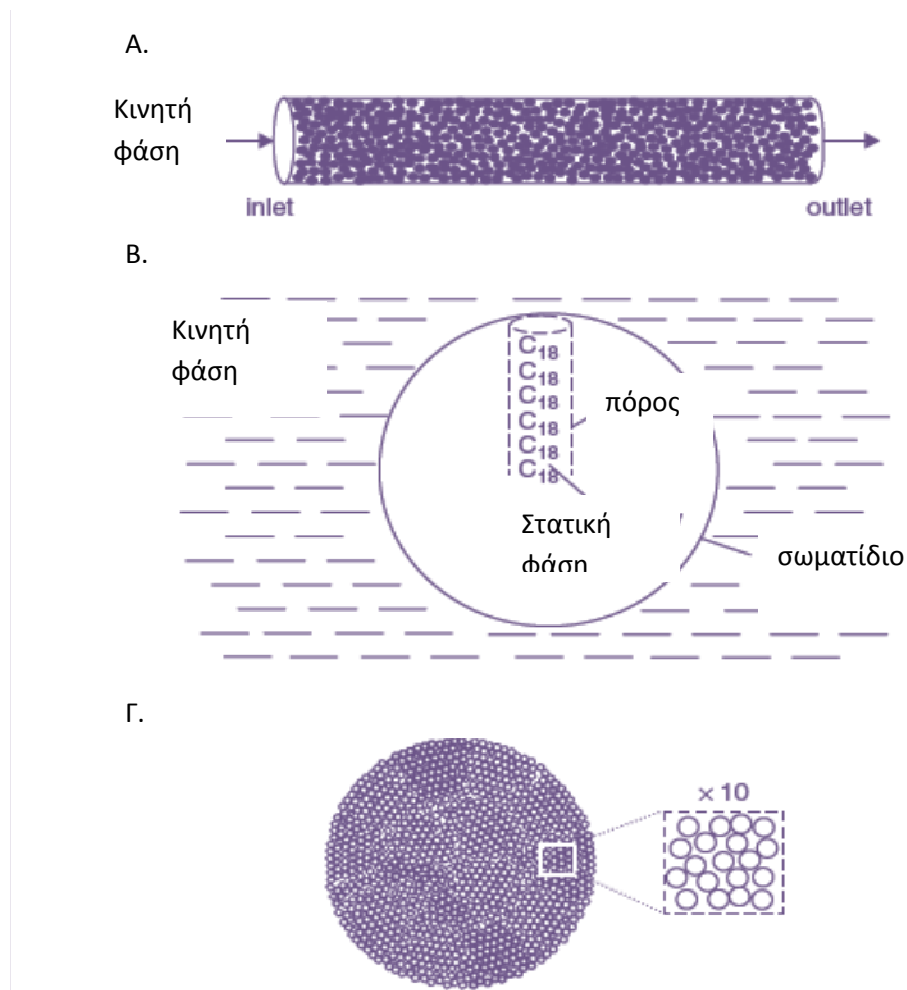
Μία άλλη ταξινόμηση των χρωματογραφικών μεθόδων βασίζεται στον τύπο των κινητών και στατικών φάσεων, καθώς και στο μηχανισμό διαχωρισμού. Έτσι έχουμε την υγροχρωματογραφία, αεριοχρωματογραφία και χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού, όπου οι κινητές φάσεις αυτών των τεχνικών είναι υγρά, αέρια και υπερκρίσιμα ρευστά αντίστοιχα.

Σε όλους τους χρωματογραφικούς προσδιορισμούς το δείγμα διαλύεται και κινείται σε μία κινητική φάση (mobile phase), η οποία μπορεί να είναι ένα αέριο, ένα υγρό ή ένα υπερκρίσιμο ρευστό. Στη συνέχεια η κινητική φάση εξαναγκάζεται να διέλθει μέσω μίας στατικής φάσης (stationary phase) η οποία βρίσκεται καθηλωμένη σε μία στήλη ή σε μία στερεή επιφάνεια.

Η επιλογή των δύο φάσεων γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε τα συστατικά του δείγματος που είναι διαλυμένο να κατανέμονται μεταξύ της κινητής και στατικής φάσης σε διαφορετικό βαθμό. Ο βαθμός αυτός που είναι τελικά αυτός που θα καθορίσει και την ποιότητα του διαχωρισμού οφείλεται σε διαφορές που υπάρχουν σε ορισμένες ιδιότητες μεταξύ των συστατικών του δείγματος (σημείο ζέσεως, πολικότητα, μέγεθος μορίων).

Οι διαφορές αυτές διαφοροποιούν τη σχετική φυσικοχημική συγγένεια κάθε συστατικού ως προς τις δύο φάσεις με αποτέλεσμα τα συστατικά που κατακρατούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση να κινούνται αργά κατά την ροή της κινητής φάσης. Αντιθέτως αυτά τα συστατικά που κατακρατούνται ασθενέστερα από τη στατική φάση κινούνται ταχύτερα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα (λόγω της διαφοράς στην ευκινησία) τα συστατικά του δείγματος να διαχωρίζονται καταλαμβάνοντας το καθένα ξεχωριστές ζώνες από τις οποίες τα παραπάνω συστατικά μπορούν να προσδιοριστούν ποιοτικά ή και ποσοτικά.

Στο σχήμα 2 απεικονίζεται μια στήλη υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.



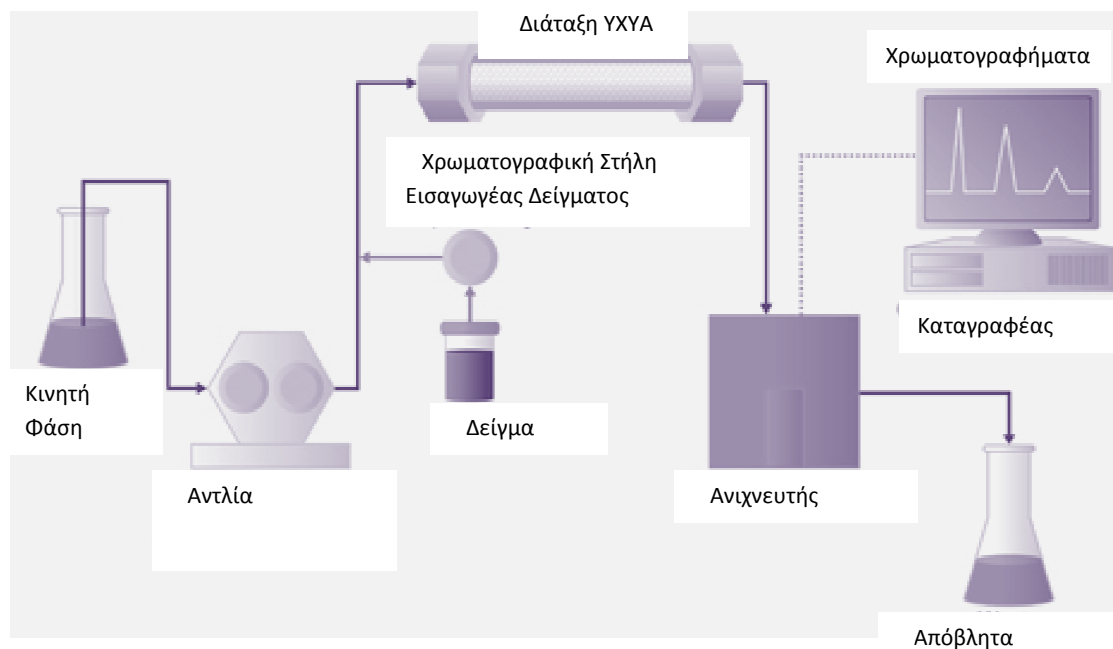
Σχήμα 2 Η στήλη της ΥΧΥΑ Α. με σφαιρικά σωματίδια Β. εξιδανικευμένος πόρος σωματιδίου με ομάδες C18 Γ. ρεαλιστική εικόνα σφαιρικού πορώδους σωματιδίου [8]

2.3 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ HPLC [8-11]

Μία τυπική διάταξη μιας HPLC αποτελείται από τα εξής μέρη (Σχήμα 3):

- Το δοχείο φύλαξης του διαλύτη, περιέχει ικανή ποσότητα κινητής φάσης ώστε να εξασφαλίζεται η συνεχής τροφοδοσία και άρα λειτουργία του συστήματος και μπορεί να διαθέτει διάταξη απαέρωσης του διαλύτη.
- Την αντλία υψηλής πίεσης (2000–6000 psi) , εξασφαλίζει σταθερή ταχύτητα στην ροή της κινητής φάσης
- Τον εισαγωγέα δείγματος, οι πλέον σύγχρονοι επιτρέπουν την αυτόματα προγραμματισμένη εισαγωγή δείγματος (μίγματος αναλυτών) διαφορετικού όγκου από διαφορετικά φιαλίδια στο ρεύμα της κινητής φάσης και πριν από την χρωματογραφική στήλη.

- Την στήλη που είναι η καρδιά του χρωματογραφικού συστήματος, και αποτελεί το τμήμα όπου η κινητή φάση έρχεται σε επαφή με την στατική φάση δημιουργώντας μία μεσεπιφάνεια μεγάλου εμβαδού, ο ρόλος της οποίας θα αναλυθεί παρακάτω.
- Τον ανιχνευτή, όπου η παρουσία αναλύτη στην κυψελίδα προκαλεί την αλλαγή του σήματος (π.χ. της απορρόφησης). Εάν ο αναλύτης απορροφά περισσότερο σε σχέση με το υπόβαθρο (την κινητή φάση), τότε δημιουργείται θετικό σήμα. Οι περισσότεροι χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές είναι ο διαφορικός ανιχνευτής δείκτη διάθλασης, ο ανιχνευτής ορατού υπεριώδους (UV-VIS) με πιο σύγχρονο αυτόν της σειράς φωτοδιοδίων (PDA) για λήψη του φάσματος της εκλουόμενης ουσίας, ο ανιχνευτής φθορισμού, υπερύθρου, οι ανιχνευτές φασματομετρίας μαζών (MS) και οι ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές.
- Τον καταγραφέα-ολοκληρωτή-επεξεργαστή των δεδομένων.

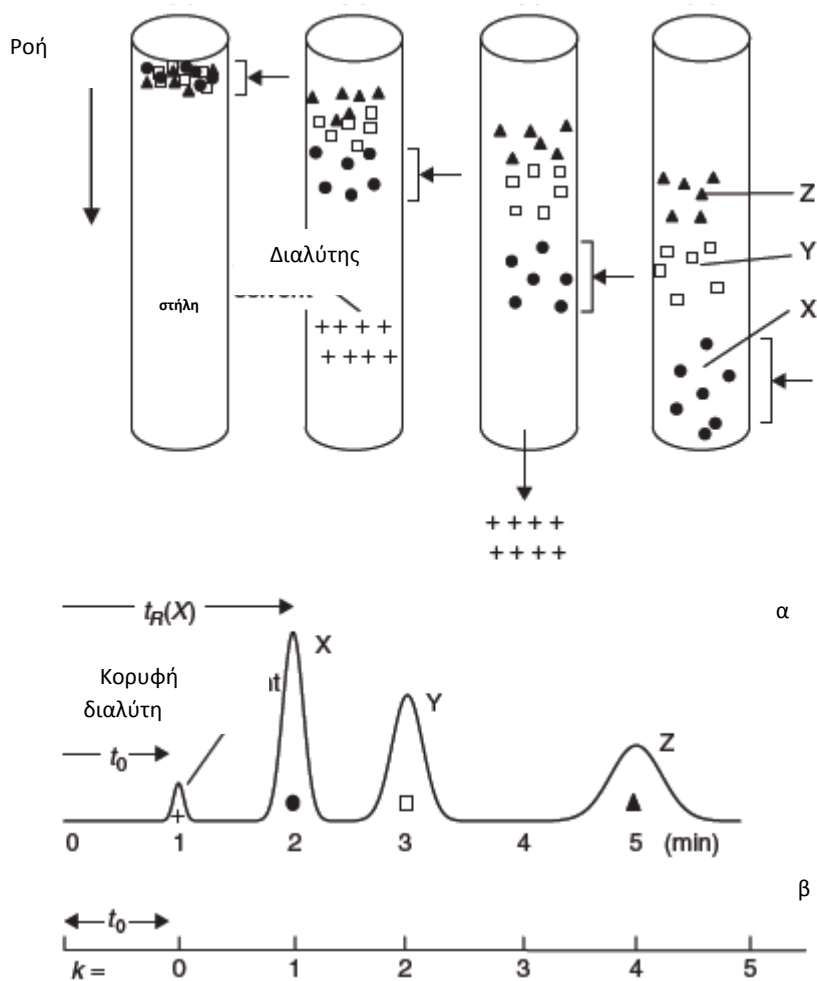


Σχήμα 3 Οργανολογία HPLC [9]

Κατά τη διάρκεια ενός χρωματογραφικού διαχωρισμού τα διαλυμένα μόρια κινούνται συνεχώς μεταξύ της κινητής και στατικής φάσης. Ενώ βρίσκονται στην κινητή φάση παρασύρονται κατά την φορά της κίνησης ενώ η παραμονή τους στην στατική φάση επιβραδύνει την κίνηση. Ο ρυθμός μετανάστευσης του κάθε μορίου καθορίζεται επομένως από τον χρόνο παραμονής του στις δύο φάσεις ή με άλλα λόγια το ποσοστό κατανομής τους σε αυτές. Η διαδικασία της εναλλαγής αυτής ονομάζεται διαμερισμός. Οι χρωματογραφικές τεχνικές είναι βασισμένες στους εξής μηχανισμούς:

- Προσροφήσεως: ο διαχωρισμός βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό προσρόφησης στη στερεά στατική φάση
- Κατανομής: ο διαχωρισμός βασίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών μεταξύ της κινητής και της υγρής στατικής φάσης (κανονικής φάσης όταν η στατική φάση είναι η σχετικά πιο πολική από την κινητή και αντιστρόφου φάσεως όταν ισχύει το αντίθετο).
- Συγγένειας: ο διαχωρισμός βασίζεται σε εξειδικευμένες βιοχημικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ μορίων στατικής φάσης και μορίων αναλύτη.
- Ιονανταλλαγής: ο διαχωρισμός βασίζεται στην ύπαρξη ιοντικών ομάδων στην στατική φάση που αλληλεπιδρούν με τα ιοντικά μόρια του αναλύτη.
- Αποκλεισμού μεγέθους: ο διαχωρισμός βασίζεται στον αποκλεισμό των μορίων με βάση το μέγεθός τους στο δίκτυο μιας πορώδους πηκτής.

Στο επόμενο σχήμα (Σχήμα 4) παρουσιάζεται η πορεία διαχωρισμού σε μία πληρωμένη χρωματογραφική στήλη.



Σχήμα 4 Πορεία διαχωρισμού σε μία στήλη, (α): τελικό χρωματογράφημα, (β): εκτιμώμενες τιμές K , (α): Μόρια X, Y, και Z αναπαριστώνται ως ●, □ και ▲, μόρια διαλύτη+. [10]

2.4 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ [5-8]

2.4.1 ΣΤΑΤΙΚΗ ΦΑΣΗ

Σχεδόν οποιοδήποτε πολικό στερεό υλικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως στατική φάση με τις πιο συχνές επιλογές να αποτελούν η πηκτική διοξειδίου του πυριτίου (τα ενεργά σημεία προσρόφησης είναι τα άτομα οξυγόνου και οι σιλανολικές ομάδες, $-\text{Si}-\text{OH}$) και το οξείδιο του αργιλίου. Αυτά αποτελούν πολύ πολικά υλικά και κατακρατούν ισχυρά τα μόρια. Τα πρώτα πληρωτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στην HPLC ήταν σφαιρίδια από πηκτική οργανικών ουσιών για διαχωρισμούς με βάση το μέγεθος. Σε αυτό το στάδιο

δεν είχαν γίνει μελέτες για την βελτιστοποίηση σε χρήση υψηλών πιέσεων. Αργότερα χρησιμοποιήθηκαν πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου με διάμετρο 35-60 μm και με τη μορφή πολτού γεγονός που οδήγησε σε μικρότερο χρόνο διαχωρισμού. Γρήγορα έγινε αντιληπτό ότι με υλικά πλήρωσης, όπως η πηκτή του διοξειδίου του πυριτίου (SiO_2) διαμέτρου 35 μm έδινε καλύτερους διαχωρισμούς λόγω μείωσης της διεύρυνσης των χρωματογραφικών κορυφών (χρησιμοποιείται ακόμη και σήμερα στην παρασκευαστική HPLC). Το επόμενο βήμα προόδου ήταν η χρήση λεπτής επίστρωσης πορώδους SiO_2 που κάλυπτε την εξωτερική επιφάνεια ενός συμπαγούς υαλώδους πυρήνα δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο ένα νέο πληρωτικό υλικό λόγω ομοιομορφίας της ακολουθούμενης διαδρομής των προσδιοριζόμενων ουσιών μέσω των σωματιδίων του πληρωτικού υλικού. Το επόμενο βήμα ήταν τα μικροπορώδη αναλυτικά πληρωτικά υλικά με διάμετρο σωματιδίων 10 μm . Εξαιτίας της μικρής τους διαμέτρου παρουσίαζαν μεγάλη αντίσταση στη ροή της κινητής φάσης γεγονός που λειτούργησε στην ανάπτυξη αντλιών ικανών να αντέξουν πίεση 6000-10000 psi. Στη συνέχεια η βελτίωση του σχήματος των σωματιδίων πλήρωσης οδήγησε στην ανάπτυξη των σφαιρικών μικροπορωδών υλικών μεγέθους διαμέτρου 3 ή 5 μm . Αυτά δημιουργούν καλύτερη πλήρωση της στήλης και έχουν μικρή τάση να σχηματίζουν κενά στη στήλη αποτελώντας υλικά που προτιμώνται στην ανάπτυξη κάθε νέας μεθόδου.

2.4.2 ΚΙΝΗΤΗ ΦΑΣΗ

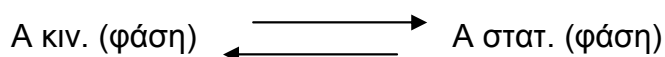
Αποτελεί το μείγμα των διαλυτών που διέρχεται μέσα ή επάνω από την επιφάνεια της στατικής φάσης και προκαλεί τη μετατόπιση των συστατικών του μείγματος σε διαφορετικές θέσεις στην στήλη.

2.4.3 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑ

Η γραφική παράσταση της καταγραφής της αποκρίσεως του ανιχνευτή συναρτήσει του χρόνου που απαιτείται για να εκλουσθούν τα συστατικά ενός δείγματος μέσα από τη χρωματογραφική στήλη καλείται χρωματογράφημα

2.4.4 ΙΣΟΡΡΟΠΙΑ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ

Η κατανομή του αναλύτη μεταξύ των δύο φάσεων περιγράφεται από την ακόλουθη εξίσωση:



Η σταθερά της παραπάνω ισορροπίας ονομάζεται σταθερά κατανομής και συμβολίζεται με K .

Η ισορροπία και εδώ είναι δυναμική, δηλαδή τα μόρια της ουσίας θα κινούνται γρήγορα από τη μια φάση στην άλλη και αντίστροφα.

Η συγκεκριμένη σταθερά ορίζεται:

$$K = C_s / C_M \quad \text{Εξίσωση 1}$$

Όπου C_s = η συγκέντρωση της ουσίας στη στατική φάση

C_M = η συγκέντρωση της ουσίας στην κινητή φάση

Αν η τιμή της K είναι μεγάλη, ο πληθυσμός των μορίων στη στατική φάση είναι μεγαλύτερος από εκείνον στην κινητή και τα μόρια τους συστατικού αυτού θα βρίσκονται περισσότερο χρόνο στη στατική φάση.

2.4.5 ΧΡΟΝΟΣ ΑΝΑΣΧΕΣΗΣ

Ο χρόνος που χρειάζεται ένα συστατικό για να εκλουσθεί ονομάζεται χρόνος ανασχεσης ή χρόνος κατακράτησης και συμβολίζεται ως t_R . Μερικές φορές χρησιμοποιείται ο ανηγμένος χρόνος t'_R , ο οποίος είναι ανεξάρτητος από τους παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν το χρόνο ανασχεσης και ορίζεται ως

$$t'_R = t_R - t_M \quad \text{Εξίσωση 2}$$

όπου t_M : ο νεκρός χρόνος, ο χρόνος που χρειάζεται δηλαδή μία μη κατακρατούμενη ουσία να φτάσει στον ανιχνευτή. Ο χρόνος ανασχεσης εξαρτάται από την ταχύτητα ροής της κινητής φάσης (όσο ταχύτερη είναι αυτή τόσο μικρότερος είναι).

Μια άλλη σχέση η οποία περιγράφει τον παράγοντα χωρητικότητας είναι η:

$$k' = K \times \frac{V_s}{V_M} \quad \text{Εξίσωση 3}$$

όπου V_s , V_M : οι όγκοι της στατικής και κινητικής φάσης αντίστοιχα και K : η σταθερά κατανομής.

Μπορούμε ακόμα να συσχετίσουμε τον παράγοντα χωρητικότητας (K') με τον χρόνο ανάσχεσης (t_R) και τον νεκρό χρόνο (t_M) με την ακόλουθη σχέση:

$$K' = (t_R - t_M) / t_M \quad \text{Εξίσωση 4}$$

2.4.6 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

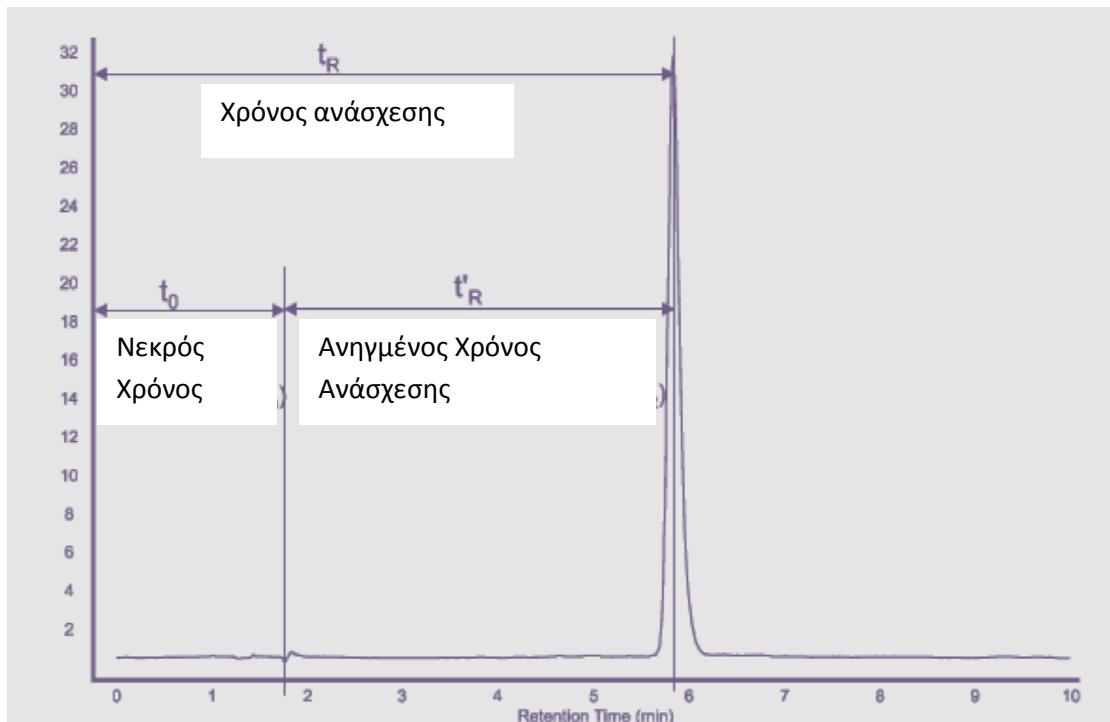
Εκφράζει την ικανότητα ενός συστήματος να διαχωρίσει τις ενώσεις Α και Β και αποδίδεται από τη σχέση:

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} \quad \text{Εξίσωση 5}$$

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{t_{R,B} - t_M}{t_{R,A} - t_M} \quad \text{Εξίσωση 6}$$

Όπου K'_B ο παράγοντας χωρητικότητας της ισχυρότερα κατακρατούμενης ουσίας. Ο παράγοντας εκλεκτικότητας εξαρτάται από τη φύση της κινητής και στατικής φάσης και από τη θερμοκρασία της στήλης. Η τιμή του θα πρέπει να βρίσκεται μεταξύ 1,05 και 2,0.

Στο επόμενο σχήμα 5 παρουσιάζεται ένα τυπικό χρωματογράφημα.



Σχήμα 5 Τυπικό χρωματογράφημα [9]

2.4.7 ΑΡΙΘΜΟΣ ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΝ ΠΛΑΚΩΝ

Ο αναλύτης εισάγεται στην στήλη με την μορφή μιας πολύ μικρής ζώνης με ίδια κατανομή του αναλύτη σε αυτήν την ζώνη. Καθώς αυτή διέρχεται από τη στήλη διευρύνεται. Σύμφωνα με τους Martin and Synge οι οποίοι εισήγαγαν την θεωρία των θεωρητικών πλακών για την αξιολόγηση της ικανότητας διαχωρισμού της στήλης ο αναλύτης βρίσκεται σε συνεχή δυναμική ισορροπία με τη στατική φάση και θεωρείται ότι διαιρείται σε έναν αριθμό υποθετικών πλακών. Κάθε πλάκα έχει ορισμένο ύψος H (height of effective theoretical plate, HETP), και ο αναλύτης παραμένει για ορισμένο χρονικό διάστημα σε αυτήν την πλάκα που είναι ικανό ώστε να αποκατασταθεί πλήρως η δυναμική ισορροπία. Όσο λοιπόν μικρότερο είναι το ύψος της πλάκας ή ο αριθμός των πλακών μεγαλύτερος τόσο περισσότερο αποτελεσματική είναι η ανταλλαγή του αναλύτη μεταξύ των δύο φάσεων και τόσο καλύτερος καθίσταται ο διαχωρισμός. Για τον λόγο αυτόν η απόδοση της στήλης εκφράζεται σε αριθμό θεωρητικών πλακών (μέτρο της διεύρυνσης των χρωματογραφικών ζωνών) (σχήμα 6).

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \text{Εξίσωση 7}$$

Όπου:

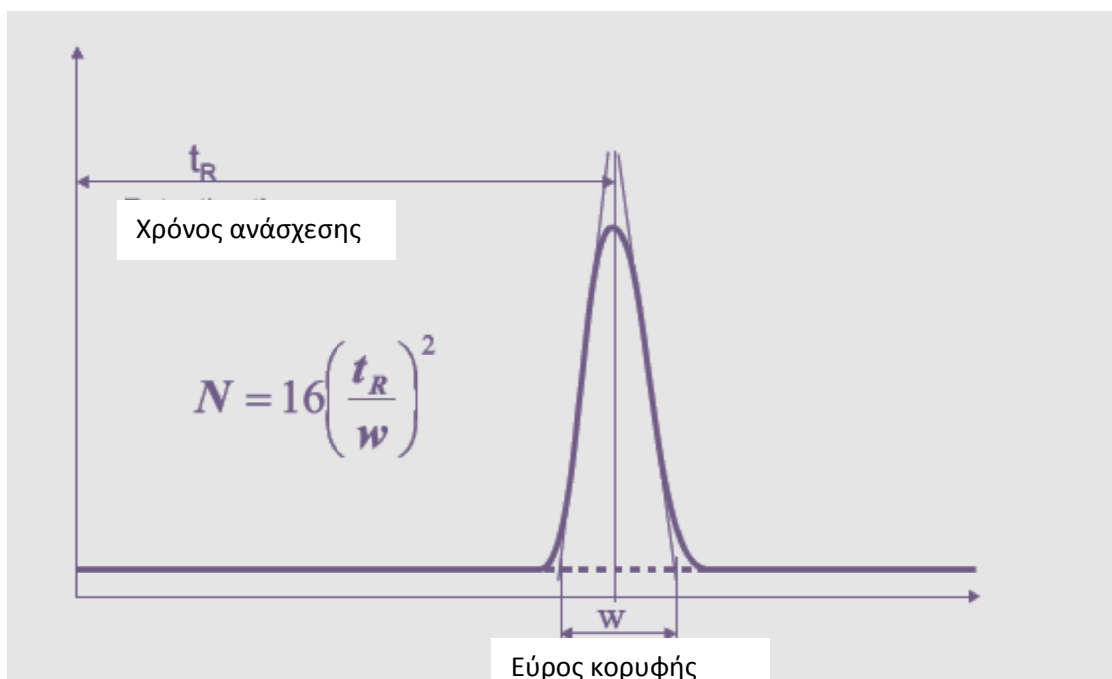
t_R : ο χρόνος ανάσχεσης του αναλύτη

W : το εύρος της κορυφής στη γραμμή βάσης.

Ισχύει επίσης: $H=L/N$ Εξίσωση 8

Όπου:

L : το μήκος της στήλης



Σχήμα 6 Χρωματογράφημα για τον υπολογισμό των θεωρητικών πλακών [9]

2.4.8 ΔΙΑΧΩΡΙΣΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ R_s

Αποτελεί το σπουδαιότερο χαρακτηριστικό του χρωματογραφικού διαχωρισμού και δίνεται από τις παρακάτω σχέσεις για δύο κορυφές με χρόνους ανάσχεσης t_{R1} , t_{R2} και εύρη W_1 , W_2 εκφράζοντας την ικανότητα διαχωρισμού δύο συστατικών:

$$R = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_2 + W_1} \text{Εξίσωση 9}$$

$$R = \frac{a-1}{a} \frac{k_2}{1+k_2} \frac{\sqrt{N}}{4} \text{ Εξίσωση 10}$$

Ο ιδανικός διαχωρισμός επιτυγχάνεται για $R_s > 1,5$ ενώ για $R_s = 1$ ο διαχωρισμός μπορεί να θεωρηθεί ως επαρκής για κάποιες μεθόδους.

2.4.9 ΘΕΩΡΙΑ ΤΗΣ ΤΑΧΥΤΗΤΑΣ

Η θεωρία της ταχύτητας αναπτύχθηκε με σκοπό να γίνει κατανοητή η επίδραση της γραμμικής ταχύτητας της κινητής φάσης u ως συνάρτηση του ύψους θεωρητικών πλακών των στηλών χρωματογραφίας H . Η μαθηματική προσέγγιση της συμπεριφοράς των χρωματογραφικών στηλών οδήγησε στην εξίσωση *van Deemter* η οποία συνοπτικά αποδίδεται αποδίδεται:

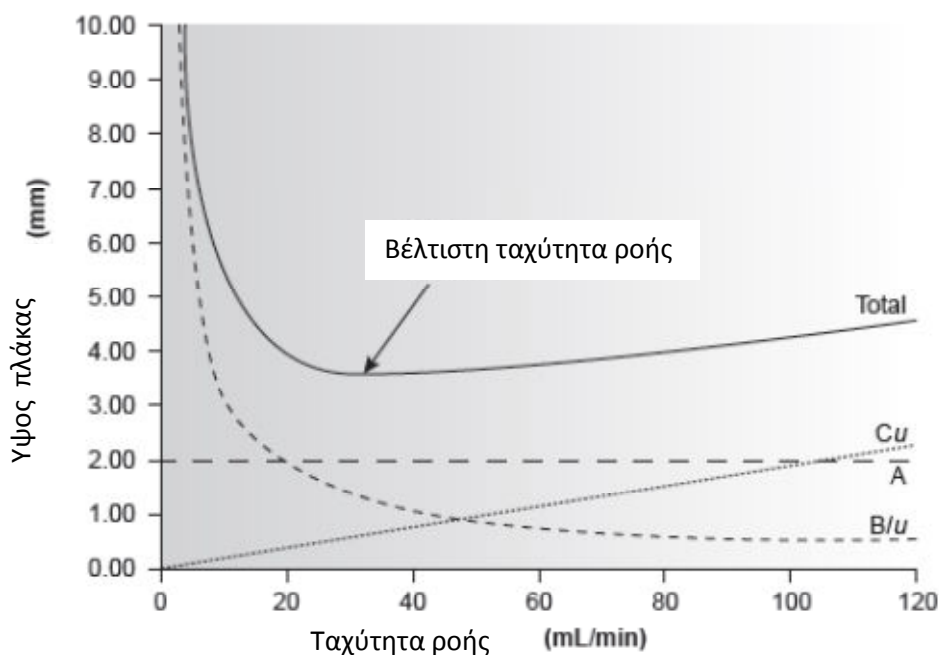
$$H = A + \frac{B}{u} + Cu = A + \frac{B}{u} + (C_S + C_M)u \text{ Εξίσωση 11}$$

Ο όρος A αντιπροσωπεύει το φαινόμενο της διάχυσης περιδίνησης (eddy diffusion) η οποία εξαρτάται από τη διάμετρο των σωματιδίων του υλικού που χρησιμοποιείται για την πλήρωση της στήλης και αποτελεί μέτρο διεύρυνσης της χρωματογραφικής κορυφής.

Ο όρος $\frac{B}{u}$ αντιπροσωπεύει την διαμήκη διάχυση (longitudinal diffusion) ως παράγοντα διεύρυνσης των κορυφών λόγω της διάχυσης της ουσίας από το πυκνότερο κέντρο της ζώνης προς το αραιότερο πρόσθιο ή οπίσθιο τμήμα της.

Ο όρος $(C_S + C_M)u$ (συντελεστές μεταφοράς μάζας) αντιπροσωπεύει τη διεύρυνση των κορυφών από την κατάσταση μη ισορροπίας μεταξύ κινητής και στατικής φάσης που λειτουργεί μια χρωματογραφική στήλη, αν ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι η αποκατάστασή της είναι πολύ αργή διαδικασία.

Στο σχήμα 7 αποδίδεται γραφικά ένα διάγραμμα της εξίσωσης *van Deemter*.



Σχήμα 7 Διάγραμμα Van Deemter [11]

2.5 ΗPLC ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΤΑΣΕΙΣ ΣΤΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ [3]

Το πρώτο βήμα για να υπάρξει κοινός τόπος μεταξύ, των ολοένα αυξανόμενων απαιτήσεων σε ό,τι αφορά την ασφάλεια και ποιότητα των φαρμακευτικών σκευασμάτων (με ευνόητο σκοπό τη διασφάλιση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας της θεραπευτικής αγωγής) και των αναλυτικών στρατηγικών, ήταν η δημιουργία της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποίας στις αρχές του 1969 με την πρώτη δημοσίευση της Ευρ. Φαρμ. Τόμος 1. Αυτή αποτελεί τη βάση στην οποία στηρίζονται σήμερα και οι υπόλοιπες φαρμακοποιίες των κρατών μελών της ΕΕ. Το επόμενο βήμα ήταν η σύσταση του Συνεδρίου για τη Διεθνή Εναρμόνιση ICH (International Conference on Harmonization) το 1990 με στόχο την εναρμόνιση σε μία κοινή γραμμή των κυρίαρχων Φαρμακοποιών (Αμερικανικής, Ευρωπαϊκής, και Ιαπωνικής) και των παραγωγών φαρμάκων. Το ICH στοχεύει στην ασφάλεια, τη βελτιστοποίηση της ποιότητας των φαρμάκων και την προαγωγή ολοένα και πιο αποτελεσματικών πρακτικών φαρμακευτικής αγωγής. Οι κανονισμοί του ICH είναι δεσμευτικοί σε παγκόσμιο επίπεδο σε ό,τι αφορά την ποιότητα φαρμάκων.

Η τεχνική HPLC αποτελεί το πλέον χρησιμοποιούμενο εργαλείο για την ανάπτυξη μεθόδων ελέγχου φαρμάκων στις διάφορες φαρμακοποιίες.

Η HPLC εμφανίστηκε για πρώτη φορά στην 20^η έκδοση της USP, όπου μόνο το 5% των ποσοτικών προσδιορισμών για φαρμακευτικά σκευάσματα και λίγες εφαρμογές σε κάποιους ελέγχους καθαρότητας, σε μερικές μονογραφίες, πραγματοποιούνταν με αυτήν [12]. Ενώ το 1983 η HPLC με ανιχνευτή UV ήταν σχεδόν αποκλειστικά σε χρήση, το 2005 το ένα τρίτο των βιβλιογραφικών αναφορών για την HPLC αναφέρει την χρήση της με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών. Η τάση [13,14] για ανάπτυξη μεθόδων στην φαρμακευτική ανάλυση περιλαμβάνει την ολοένα αυξανόμενη χρήση πιο εκλεκτικών ανιχνευτών, όπως για παράδειγμα τη χρήση φασματομετρίας μαζών (MS) η οποία ελαχιστοποιεί την ανάγκη για από πριν διαχωρισμό των εναντιομερών που ενδιαφέρουν τον τομέα έρευνας από ενδογενείς ουσίες και μεταβολίτες. Ειδικότερα η υγροχρωματογραφία συζευγμένη με την φασματομετρία μαζών (LC-MS) τα τελευταία 10 χρόνια [15,16] έχει εξελιχθεί σε πολύ ισχυρό αναλυτικό εργαλείο για υψηλής ταχύτητας σάρωση (high-throughput screening - HTS) για την οργανική σύνθεση και την μελέτη ανάπτυξης νέων φαρμακευτικών ενώσεων [17]. Η νέα αναλυτική αυτή τάση (HTS) με τη χρήση ειδικών λογισμικών ρομποτικών διατάξεων διευκολύνει τη διεξαγωγή μεγάλου αριθμού αναλύσεων χημικών ενώσεων σε μικρό χρόνο, την αξιολόγηση 50000 ενώσεων ανά ημέρα και την δημιουργία βιβλιοθηκών με ουσίες πιθανά αξιοποιήσιμες ως μελλοντικά φάρμακα [18, 19].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

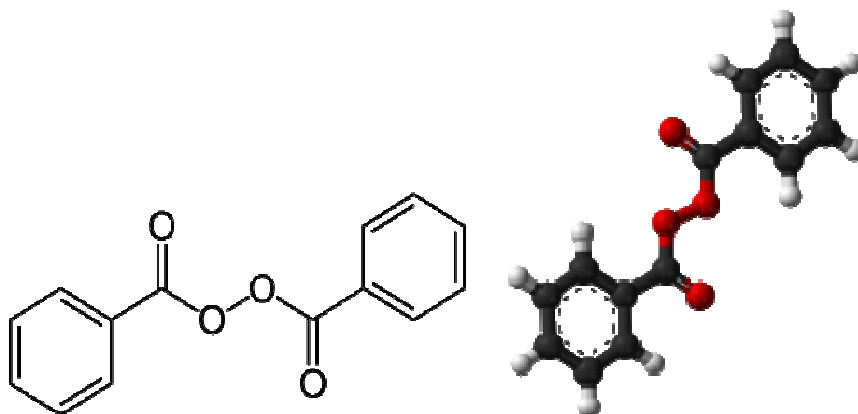
ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΒΕΝΖΟΥΪΛΙΟΥ (BENZOYL PEROXIDE - BPO)

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ [20]

Το βενζοϋλοϋπεροξειδίο, (διβενζοϋλουπεροξειδίο), (Benzoyl peroxide), (BPO) αποτελεί ένα σταθερό υπεροξειδίο κύριο δραστικό συστατικό φαρμακευτικών σκευασμάτων που απευθύνονται στην αντιμετώπιση της ακμής. Έχει συμπεριληφθεί στον κατάλογο του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization WHO) των επουσιωδών φαρμάκων κατά της ακμής σε παιδιά [21,22]. Συχνά χρησιμοποιείται και ως εκκινητής πολυμερισμού, ενώ έχει χρησιμοποιηθεί για πάνω από 50 χρόνια ως λευκαντικός παράγοντας (bleaching agent) στο αλεύρι, την επεξεργασία τυρογάλακτος και τυριού σε συγκεντρώσεις από 20 έως 40 mg / kg [23],

3.2 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ[24,25]

Η χημική δομή του BPO απεικονίζεται στο σχήμα 8. Ο μοριακός τύπος της ένωσης είναι $C_{14}H_{10}O_4$ ενώ η σχετική μοριακή μάζα 242.23. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του (BPO) συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα 1:



Σχήμα 8 Δομή Βενζοϋλουπεροξειδίου

Πίνακας 1 Φυσικοχημικές ιδιότητες Βενζουλοϋπεροξειδίου (BPO)[25]

Ονοματολογία IUPAC	BENZOYL PEROXIDE CASRN: 94-36-0
Χημικός τύπος	C ₁₄ H ₁₀ O ₄
Σχετική μοριακή μάζα	242,23
Χρώμα/Μορφή	Άχρωμοι /λευκού χρώματος κρύσταλλοι-κρυσταλλική κόνις. Στην Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία αναφέρεται ως ένυδρος μορφή με περιεκτικότητα σε BPO 70-77% και νερό > 20%. Σε θερμοκρασίες >60 °C και αν η περιεκτικότητα σε νερό μειωθεί σημαντικά, μπορεί να εκραγεί.
Οσμή	Ελαφρά βενζαλδεύδης
Γεύση	Χωρίς γεύση
Σημείο τήξης	103-106 °C
Ειδικό βάρος	1,334 στους 25 °C
Διαλυτότητες	Μέτρια διαλυτό (1 g/30-100 ml) στο νερό και τις αλκοόλες Διαλυτό στο χλωροφόρμιο, αιθέρα, βενζόλιο 1 g διαλύεται σε 40 ml διθειάνθρακα και περίπου σε 50 ml ελαιολάδου
Τάση ατμών	< 0,1 torr στους 20 °C
Άλλες φυσικοχημικές ιδιότητες	Ποσοστό ενεργού οξυγόνου 6,5%

3.3 ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΕΣ-ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Το BPO είναι εμπορικά διαθέσιμο με τη μορφή λοσιόν, κρέμας και γέλης, υπό αυτήν τη μορφή όμως μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό του δέρματος, ειδικότερα κατά την αρχή της θεραπείας, προκαλώντας δερματική ξηρότητα ή ακόμη και οίδημα [26]. Για τους λόγους αυτούς έχει προταθεί η δημιουργία μιας φαρμακοτεχνικής μορφής εγκλωβισμού σε μικροσωματίδια αιθυλικής κυτταρίνης με στόχο την ελεγχόμενη αποδέσμευση του BPO στην επιδερμίδα [27].

Ο συνδυασμός του με ερυθρομυκίνη ενδείκνυται για την τοπική εφαρμογή για την θεραπεία της ακμής (acne Vulgaris). Πιστεύεται [28] ότι ο συνδυασμός αυτός εμφανίζει λιγότερες παρενέργειες (έξαψη, ερυθρότητα, απολέπιση, εξάνθημα και ερεθισμό) σε σύγκριση με την αποκλειστική χρήση του βενζουλοϋπεροξειδίου για την κοινή ακμή, ειδικά όταν υπερτερούν οι

φαγέσωρες, οι βλατίδες και τα φλυκταινίδια σύμφωνα με το συνταγολόγιο του ΕΟΦ [29]. Εμφανίζει δε συνεργιστική δράση και μειώνει σημαντικά την πιθανότητα αντίστασης του Προπριονιβακτηρίου (*Propionibacterium acnes*), ενός αναερόβιου βακτηρίου υπευθύνου παράγοντα παθογένεσης της κοινής ακμής.

Πρόσφατες έρευνες [30] ωστόσο έδειξαν ότι η συνδυασμένη δόση BPO 2,5% και αδαπαλενίου (adapalene) 0,1% για την αντιμετώπιση της ακμής συνδυάζει δύο παράγοντες με διαφορετικούς τρόπους δράσης οι οποίοι απευθύνονται στους πολλαπλούς φυσιοπαθολογικούς παράγοντες από τους οποίους προκαλείται η ακμή. Η έρευνα αυτή ακόμη αποδεικνύει ότι ο στοχευμένος αυτός συνδυασμός είναι σημαντικότερα πιο αποτελεσματικός ως προς τη συνεργιστική δράση κατά της ακμής από την θεραπεία με έναν μόνο παράγοντα.

Το (BPO) είναι ένα οργανικό υπεροξειδίο του οποίου η δράση κατά της ακμής συνδέεται με διάφορες ιδιότητες, όπως βακτηριοστατική και βακτηριοκτόνο δράση. Η επίδραση του μειώνει τα επίπεδα των ελεύθερων λιπαρών οξέων με ταυτόχρονη αύξηση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων στην λιπιδική στιβάδα (cutaneous lipidic film). Οι μελέτες [31] στη φαρμακοκινητική και μεταβολισμό της δραστηκής έδειξαν ότι διαπερνά ανέπαφο την κεράτινη στιβάδα της επιδερμίδας (stratum corneum). Το BPO σχηματίζει ενεργές ρίζες λόγω της χημικής του δομής. Ο δεσμός O–O με ενέργεια δεσμού 30 kcal/mol είναι πιο ασταθής σε σχέση με τα 83 kcal/mol για έναν C–C δεσμό. Κατά το στάδιο της θερμικής διάσπασης ακόμη και σε θερμοκρασίες < 40°C, το BPO σχηματίζει ελεύθερες ρίζες, οι οποίες με τη σειρά τους μπορεί να αντιδράσουν με πολλαπλούς στόχους. Καθώς διαπερνά την επιδερμίδα και το δέρμα μετατρέπεται εξολοκλήρου σε βενζοϊκό οξύ (σε διάστημα μόλις 30 λεπτών για να φτάσει στο μέγιστο ποσό μέσα σε 3 ώρες) [26] και εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος ως βενζοϊκό οξύ για να απεκκριθεί αμέσως από τα νεφρά. Η γρήγορη διάσπαση του BPO στο δέρμα καθώς και η γρήγορη απέκκριση του βενζοϊκού οξέος από τους νεφρούς υποδεικνύουν πως δεν υπάρχει κίνδυνος τοξικότητας χωρίς όμως να αποκλείεται η εμφάνιση αλλεργικών δερματολογικών αντιδράσεων [32].

3.4 ΑΛΛΕΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΧΡΗΣΕΙΣ

Στην τεχνολογία τροφίμων έχει μακρά ιστορία χρήσης ως λευκαντικό των αλεύρων (έως 40 mg/kg), καθώς και στο γάλα έως (20 mg/kg) και τον ορό γάλακτος για την παραγωγή τυριών. Η δράση του συνοψίζεται ως εξής: Το πρόσφατα αλεσμένο αλεύρι έχει υποκίτρινο χρώμα και δεν δίνει καλή ζύμη, έχει δηλαδή μειωμένες αρτοποιητικές δυνατότητες. Αν αφεθεί να ωριμάσει, γεγονός που είναι όμως χρονοβόρο για βιομηχανία τροφίμων, τότε αποκτά λευκό χρώμα που είναι επιθυμητό και βελτιώνεται η ποιότητα της γλουτένης του, δηλαδή η αρτοποιητική του ικανότητα. Η ωρίμανση μπορεί να επιταχυνθεί με την χρήση χημικών προσθέτων, που δρουν συνήθως οξειδωτικά στα καροτενοειδή του αλεύρου και επομένως ως λευκαντικά (bleachers) [33].

Άλλες κοινές χρήσεις του BPO περιλαμβάνουν την παρασκευή λευκαντικών ουσιών για το «άνοιγμα» του χρώματος των μαλλιών ως οξειδωτικός παράγοντας και ως ενεργό συστατικό για τη δημιουργία λευκαντικών για τα δόντια και ως εκκινητής αντιδράσεων πολυμερισμού στη παραγωγή πλαστικών και σιλικόνης.

3.5 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Στον πίνακα που ακολουθεί (πίνακας 2) παρατίθενται οι συνθήκες χρωματογραφικών μεθόδων της βιβλιογραφίας για τον προσδιορισμό του BPO.

Πίνακας 2 Μέθοδοι HPLC για τον προσδιορισμό BPO

ΕΦΑΡΜΟΓΗ	ΧΡΩΜΑΤ/ΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	ΣΤΗΛΗ	ΚΙΝΗΤΗ ΦΑΣΗ	ΡΟΗ	ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ
Προσδιορισμός BPO σε σκευάσματα [34]		50 cm x 2,6mm 37-50μm bonded octadecylsilane 30cm x 3,9 mm 10 μm bonded octadecylsilane	50% ακετονιτρίλιο σε νερό	1,0 ml/min.	254 nm
Προσδιορισμός BPO [35]	Waters	CIX, 30 cm x 3,9 mm.	Μεθανόλη-νερό (75:25, v/v)	1,0 ml/min.	238 nm
Προσδιορισμός	LC-10AT VP	RP C-18	Μεθανόλη-νερό	1,2	SPD

ΒΡΟ σε μικροσωματίδια [27]	Simadzu	(250 mm x 4,6 mm, 5μm;	(75:25, v/v)	ml/min	
Βιοδιαθεσιμότητα ΒΡΟ [26]	Waters M 600	Lichrosorb RP18 25 cm x 10 mm	0,1 M H ₂ PO ₄ :CH ₃ OH (60/40)	1,5 ml/min	254 nm
Σταθερότητα σκευάσματος ΒΡΟ και ερυθρομυκίνης [28]	Spectra Physics	125-4 (4-4) 100 RP-18	Ακετονιτρίλιο:νερό (60:40, v:v)	1,0 ml/min	254 nm
Προσδιορισμός ΒΡΟ και βενζοϊκού οξέος σε αλεύρι [36]	LC-10 series (Shimadzu)	Inertsil ODS- (250 mm x 4,6mm i.d.) Inertsil ODS-3 guard column (10 mm x 4mm i.d.)	Ακετονιτρίλιο:νερό (55:45)	1,0 ml/min	SPD-detector 235 nm
Ανάλυση σκευάσματος (ΒΡΟ) και ερυθρομυκίνης [37]		Hypersil C ₁₈ BDS (250mm x 4,4 mm id)	Ακετονιτρίλιο:νερό (58:42, v/v)	1,0 ml/min	254 nm
Έλεγχος διαλυτότητας και σταθερότητας ΒΡΟ [38]	Waters 510	25 x 0.5cm Particil 10 ODS-3	Ακετονιτρίλιο: νερό 85% phosphoric acid (700:300:2)	1,0 ml/min	254 nm
Προσδιορισμός ΒΡΟ σε αλεύρι [39]	LC 10 series Shimadzu	250 x 4,6 mm inertsil ODS-80A	Ammonium acetate 0,02M pH 4,5 / methanol 94:6	0.8 ml/min	SPD 225 nm
Προσδιορισμός ΒΡΟ ως βενζοϊκό οξύ σε άλευρα [40]	Waters 1525	C18 RP 5 μm; 250 x 4,6 mm	Methanol: 0,02M ammonium acetate (10:90, v/v)	1,0 mL/min	230 nm
Σταθερότητα ΒΡΟ σε διάλυμα μεθυλικής αλκοόλης [41]	Agilent 1100	C18 MGII RP 250 x 2mm id	AcCN: 10mM NaH ₂ PO ₄		DAD 238nm
Προσδιορισμός ΒΡΟ κατά τη λεύκανση αλεύρων [44] (μέθοδοςFAO για τρόφιμα)	Konikknk 500 G	C18 10 μm 250 x 4,6 mm	Μεθανόλη:νερό (80:20 v/v)	1,0 ml/min	UV-Vis 227 nm
Προσδιορισμός ΒΡΟ σε άλευρα [43]	Shimadzu LC-10	ODS-80A 250 x 4,6 mm id ODS-3 10 x 4mm id	Ακετονιτρίλιο:νερό (55:45)	1,0 ml/min	235 nm

Οι υπάρχουσες μέθοδοι προσδιορισμού σε φαρμακευτικά σκευάσματα περιλαμβάνουν την φασματοφωτομετρία, ιωδομετρία, πολαρογραφία και TLC [34].

Οι μέθοδοι για την ταυτοποίηση του ΒΡΟ σε πρώτες ύλες όπως προτείνονται από την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία [42] έχουν ως εξής:

Πρώτη ταυτοποίηση με φασματοφωτομετρία υπεριώθρου η οποία περιλαμβάνει σύγκριση του άγνωστου φάσματος με γνωστό φάσμα αναφοράς του ένυδρου ΒΡΟ.

Δευτερη ταυτοποίηση με τις εξής μεθόδους:

α) Φασματοφωτομετρία ορατού υπεριώδους. Λήψη φάσματος πυκνού διαλύματος Α και αραιού διαλύματος Β. Πρέπει:

$$A_{235(\text{διαλ/τοςB})}/A_{274(\text{διαλ/τος B})}=1.17 - 1.21$$

β) Παρασκευή διαλύματος με την υπο εξέταση ουσία σε ακετόνη R, προσθήκη διαλύματος θειικής διαιθυλοφαινυλενοδιαμίνης και παρατήρηση ανάπτυξης ερυθρού χρώματος που γρήγορα μετατρέπεται σε σκούρο ιώδες.

Η υγροχρωματογραφία στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των προσμίξεων του ΒΡΟ (προσμίξεις Α, Β και Γ). οι χρωματογραφικές συνθήκες για τον έλεγχο αυτών είναι οι ακόλουθες:

Χρωματογραφική στήλη:

Μέγεθος: $l=0.25 \text{ m } \varnothing 4.6 \text{ mm}$

Στατική φάση: Οκταδεκυλοσιλυωμένη σίλικα (Octadecylsilyl silica gel) για χρωματογραφία (10 μm)

Κινητή φάση: παγόμορφο οξικό οξύ, ακετονιτρίλιο, νερό, (1:500:500 V/V/V)

Ταχύτητα ροής: 1 mL/min

Ανίχνευση: φασματοφωτόμετρο στα 235 nm

Εισαγωγή δείγματος: 20 μL εγχυτής βρόχου

Χρόνος: δύο φορές ο χρόνος ανάσχεσης του διβενζοϋλοϋπεροξειδίου

Σχετικός χρόνος ανάσχεσης σε σχέση με αυτόν του διβενζοϋλοϋπεροξειδίου
 $R_t = 28.4$ min περίπου ($impA = 0.2$ min, $impB = 0.15$ min, $impC = 0.4$ min περίπου)

3.6 ΑΛΛΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στη βιβλιογραφία αναφέρονται αρκετές μέθοδοι εκτός από τις προαναφερθείσες χρωματογραφικές. Μία από αυτές είναι ο αμπερομετρικός προσδιορισμός σε φαρμακευτικά σκευάσματα με τη χρήση ειδικά διαμορφωμένων ηλεκτροδίων [44,45], καθώς επίσης και η χρήση αμπερομετρικών αισθητήρων με μεγάλη ευαισθησία [46]. Αλλά και στον τομέα των τροφίμων υπάρχουν καινοτομίες, όπως η δημιουργία ενός ευαίσθητου χημειοφωταυγούς chip για την μέτρηση του BPO σε άλευρα [47], που αποδεικνύουν την άποψη ότι ο προσδιορισμός του BPO παρουσιάζει αναλυτικό ενδιαφέρον. Ειδικά στην περίπτωση των αλεύρων υπάρχουν αρκετές δημοσιευμένες εργασίες, χρωματογραφικές [39,40,43] και μη [40,48,49], από επιστημονικούς φορείς στη Κίνα που δείχνουν ενδιαφέρον για το θέμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ – ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ

4.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ FACTORIAL DESIGN 2ⁿ [52-54]

Η ουσιώδης διαφορά μεταξύ της μονοπαραμετρικής μεθόδου με μία μεταβλητή να εξετάζεται κάθε φορά και αυτής του πειραματικού σχεδιασμού (experimental design) έγκειται στο ότι στον τελευταίο οι τιμές όλων των παραγόντων (factors) μεταβάλλονται σε κάθε πείραμα προγραμματισμένα και με βάση κάποιο λογικό σχεδιασμό. Τα πλεονεκτήματα σύμφωνα με αυτήν την θεώρηση είναι σημαντικά. Λιγότερες δοκιμές, μεγάλος αριθμός των μελετώμενων παραγόντων, εξεύρεση των αλληλοεπιδράσεων μεταξύ αυτών, ανίχνευση της βέλτιστης απόκρισης και ακρίβειας, βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων και διερεύνηση της κατασκευής ενός μοντέλου που εξηγεί τα αποτελέσματα, είναι μερικά από αυτά. Ο όρος 'Παράγοντας' χρησιμοποιείται αντί του όρου της μεταβλητής, ακριβώς επειδή συμπεριλαμβάνει συνεχείς και μη μεταβλητές. Η αναζήτηση για τους παράγοντες που έχουν σημαντική επίδραση στο αποτέλεσμα της κάθε μελέτης συνοψίζεται στη θέσπιση δύο τιμών για κάθε έναν, οι οποίες ονομάζονται επίπεδα (Levels). Είναι πιθανόν ότι πολλοί από τους εξεταζόμενους παράγοντες δεν θα έχουν κάποια στατιστικά σημαντική επίδραση στην απόκριση. Αυτό το γεγονός θα οδηγήσει στον εκ νέου ορισμό άλλων παραμέτρων της μελέτης ως νέων παραγόντων, οι οποίοι τελικά, μαζί με τους πρώτους θα δώσουν την ολοκληρωμένη εικόνα του πειράματος με τις δυνατών λιγότερες δοκιμές που απαιτούνται.

Στην παρούσα εργασία σχεδιάστηκε ένα πείραμα με πολυάριθμους παράγοντες οι οποίοι έχουν εξ ορισμού 2 επίπεδα. Αυτά αποδίδονται χάριν συντομίας ως 2ⁿ παραγοντικοί σχεδιασμοί, όπου το n δηλώνει τον αριθμό των παραγόντων και το 2ⁿ τον συνολικό αριθμό των συνδυασμών (level combinations or treatment combinations). Ο σχεδιασμός αυτός αποτελεί μία

ειδικότερη περίπτωση της γενικά αποδοθείσας p^n περίπτωσης, ωστόσο παρουσιάζει εκτεταμένο ενδιαφέρον λόγω του πλήθους των εφαρμογών του. Το γεγονός αυτό ενισχύεται και από το ότι ο στόχος στην περίπτωση αυτού του πειραματικού σχεδιασμού δεν αφορά μόνο στο να συγκριθούν οι αποκρίσεις αυτές καθαυτές τόσο, όσο στο ότι να καθοριστεί μεμονωμένα ή συνεργιστικά η επίδραση του κάθε παράγοντα.

Για παράδειγμα, πρωταρχικές μελέτες [32,33] σχετικά με την κατεργασία του δείγματος κρεμών σε πολικούς διαλύτες, όπως μεθανόλη και ακετονιτρίλιο, που είναι συμβατοί με τις στήλες αντίστροφης φάσης, πριν από την ανάλυση, παρουσιάζουν διαφορές σχετικά με το χρόνο παραμονής στους υπερήχους και την επιλογή μέσου εκχύλισης. Επιπροσθέτως η χημική αστάθεια του BPO σε πολικούς διαλύτες [39] και στα φαρμακευτικά σκευάσματα αυτά καθαυτά [36] οδήγησαν στην ανάγκη ενός πειραματικού σχεδιασμού που θα αναδείκνυε εάν οι παράγοντες αυτοί έχουν σημαντική επίδραση στο αποτέλεσμα της επικύρωσης της μεθόδου για το υπεροξειδίο του βενζολίου.

4.2 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ

4.2.1 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ - ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ [44,45]

Η επικύρωση της μεθόδου του ποσοτικού προσδιορισμού για το βενζοϋλουπεροξειδίο και των προσμίξεων αυτού, έγιναν έχοντας ως σημείο αναφοράς τις κατευθυντήριες οδηγίες του Διεθνούς Συνεδρίου Εναρμόνισης των τεχνικών προδιαγραφών για τα φαρμακευτικά σκευάσματα που αφορούν στην ανθρώπινη υγεία (International Conference of Harmonization).

Σύμφωνα με το ICH μια πορεία επικύρωσης θα πρέπει να περιλαμβάνει τα τυπικά χαρακτηριστικά ποιότητας που είναι τα παρακάτω (Πίνακας 3):

Πίνακας 3 Αξιολόγηση Αναλυτικών μεθόδων για επικύρωση

ΤΥΠΟΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ	ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ		ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ
		ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ	ΕΛΕΓΧΟΣ	
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΡΟΣ ΕΞΕΤΑΣΗ				
ΑΚΡΙΒΕΙΑ	-	+	-	+
ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ				
ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ	-	+	-	+
ΕΝΔΙΑΜΕΣΗ ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ	-	+(1)	-	+(1)
ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ (2)	+	+	+	+
ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ	-	-(3)	+	-
ΟΡΙΟ ΠΟΣΟΤ/ΣΗΣ	-	+	-	-
ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ	-	+	-	+
ΕΥΡΟΣ	-	+	-	+

(1) Δεν χρειάζεται εάν εκτελείται η αναπαραγωγιμότητα

(2) έλλειψη της μπορεί να αντικατασταθεί από άλλες αναλυτικές μεθόδους.

(3) Μπορεί να χρειάζεται σε κάποιες περιπτώσεις

4.2.2 ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Μία αναλυτική μέθοδος είναι ειδική όταν για μία συγκεκριμένη ουσία που πρόκειται να προσδιοριστεί – ταυτοποιηθεί, μπορεί να επιτυγχάνει πλήρη διάκριση. Ο έλεγχος της ειδικότητας συνίσταται στην αξιολόγηση της αναλυτικής μεθόδου να διακρίνει τον αναλύτη από γνωστές προσμίξεις, υπολείμματα πρώτων υλών της σύνθεσης, μεταβολίτες, προϊόντα διασπάσεως και συστατικά του μητρικού υλικού του δείγματος. Ο έλεγχος γίνεται για να τεκμηριωθεί ο έλεγχος αξιοπιστίας των δοκιμών ταυτοποίησης (identification tests), ο προσδιορισμός των προσμίξεων (determination of impurities), καθώς και ο ποσοτικός προσδιορισμός μίας δραστικής ουσίας σε σκεύασμα (assay).

4.2.3 ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ

Η γραμμικότητα θα πρέπει να αποδεικνύεται σε όλο το εύρος της περιοχής συγκεντρώσεων (range) της αναλυτικής μεθόδου. Αυτό αποδεικνύεται: α) απευθείας στην καθαρή προσδιοριζόμενη ουσία (με αραιώσεις ενός προτύπου διαλύματος παρακαταθήκης), β) με ξεχωριστές ζυγίσεις συνθετικού

μίγματος των συστατικών ενός δείγματος και γ) με διαδοχικές αυξανόμενες ενισχύσεις (spiking) λευκού δείγματος, και εφαρμογή της ελεγχόμενης αναλυτικής μεθόδου. Για την απόδειξη της γραμμικότητας συνίσταται η μέτρηση τουλάχιστον 5 συγκεντρώσεων ή ποσοτήτων και εκτελούνται 3 επαναλήψεις για το κάθε επίπεδο συγκέντρωσης. Η στατιστική απόδειξη της τεκμηρίωσης είναι επιβεβλημένη και περιλαμβάνει τον υπολογισμό του μέσου όρου, της τυπικής απόκλισης, της σχετικής τυπικής απόκλισης για κάθε συγκέντρωση. Στη συνέχεια γίνεται το διάγραμμα της μέσης απόκρισης ως προς τη συγκέντρωση και υπολογίζεται η εξίσωση της παλινδρόμησης, καθώς και ο συντελεστής προσδιορισμού. Το διάγραμμα απόκριση συγκέντρωση πρέπει να είναι ευθεία γραμμή με συντελεστή προσδιορισμού $r^2 \geq 0,98$ (προτιμάται 0,99 αλλά και το 0,98 μπορεί να γίνει αποδεκτό εξαρτώμενο από τις ανάγκες της μεθόδου και τις οδηγίες των διαφόρων φορέων).

4.2.4 ΕΥΡΟΣ Η ΠΕΡΙΟΧΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ – ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ

Η κάθε φορά καθοριζόμενη περιοχή συγκεντρώσεων – ποσοτήτων προκύπτει από τη μελέτη γραμμικότητας και εξαρτάται από τη σκοπούμενη εφαρμογή της μεθόδου. Αποδεικνύεται με την επιβεβαίωση ότι η αναλυτική μέθοδος παρέχει ένα αποδεκτό βαθμό γραμμικότητας, ακρίβειας και επαναληψιμότητας, όταν εφαρμόζεται σε δείγματα που περιέχουν ποσότητες - συγκεντρώσεις εντός ή στα άκρα της καθοριζόμενης περιοχής. Για διάφορες εφαρμογές αναλυτικών μεθόδων δίνονται τα ακόλουθα όρια:

- για τον ποσοτικό προσδιορισμό της δραστικής ή του τελικού προϊόντος η περιοχή αυτή κυμαίνεται συνήθως από το 80 έως το 120% της περιεκτικότητας του δείγματος.
- για τον προσδιορισμό μιας πρόσμιξης ή υπολείμματος, από το όριο ποσοτικοποίησης (Quantitation Limit QL) της μεθόδου ή το 50% του καθορισμένου από τις αρμόδιες αρχές ορίου κάθε πρόσμιξης υπολείμματος, όποιο είναι μεγαλύτερο, έως το 120% του ορίου.
- για προσμίξεις / υπολείμματα, που είναι γνωστό ότι είναι πολύ δραστικές ή προκαλούν τοξικές ή μη αναμενόμενες φαρμακολογικές επιδράσεις, το όριο ανιχνεύσεως / ποσοτικοποίησης πρέπει να είναι

ανάλογο με το ελεγχόμενο όριο αυτών των προσμίξεων / υπολειμμάτων.

4.2.5 ΑΚΡΙΒΕΙΑ

Η ακρίβεια αποτελεί την εγγύτητα της προς μέτρηση ποσότητας του αναλύτη σε σχέση με την πραγματική, αληθή τιμή ή την τιμή αναφοράς και θα πρέπει να αποδεικνύεται σε όλο το εύρος της περιοχής για τις συγκεντρώσεις των ποσοτήτων που προσδιορίζονται κάθε φορά. Μπορεί να γίνει συγχρόνως κατά τη συλλογή των δεδομένων που γίνονται για τον προσδιορισμό της επαναληψιμότητας, της γραμμικότητας και της ειδικότητας. Ο έλεγχος της ακρίβειας μπορεί να γίνει με την εφαρμογή μιας αναλυτικής μεθόδου σε δείγμα του αναλύτη με γνωστή καθαρότητα (υλικό αναφοράς, reference material) ή με σύγκριση των αποτελεσμάτων της προτεινόμενης μεθόδου με αυτά που λαμβάνονται από μία αξιολογημένη μέθοδο με καθορισμένη ακρίβεια. Για τον προσδιορισμό περιεκτικότητας του σκευάσματος η ακρίβεια προσδιορίζεται από την ανάλυση εμβολιασμένων δειγμάτων με γνωστές τις ποσότητες των συστατικών. Για τον προσδιορισμό των προσμίξεων, η ακρίβεια υπολογίζεται από την ανάλυση δειγμάτων (δραστική ή σκεύασμα) που είναι εμβολιασμένα με γνωστές ποσότητες των προσμίξεων. Για τον προσδιορισμό της ακρίβειας θα πρέπει να γίνονται τουλάχιστον 9 προσδιορισμοί σε 3 τουλάχιστον επίπεδα συγκεντρώσεων για κάθε μελετούμενη περιοχή συγκεντρώσεων (π.χ. 3 συγκεντρώσεις με 3 προσδιορισμούς η κάθε μία) Η ακρίβεια θα πρέπει να παρουσιάζεται ως εκατοστιαία ανάκτηση (% recovery) της γνωστής ποσότητας του αναλύτη που προστέθηκε στο δείγμα και ως η διαφορά μεταξύ του μέσου όρου των τιμών που βρέθηκαν από την εφαρμογή της ελεγχόμενης μεθόδου σε ένα δείγμα και της παραδεκτής αληθούς τιμής μαζί με τα όρια εμπιστοσύνης. Για κάθε δείγμα αναγράφεται η θεωρητική τιμή μ , η τιμή προσδιορισμού x , και η εκατοστιαία ανάκτηση και υπολογίζονται ο μέσος όρος, η τυπική απόκλιση, η σχετική τυπική απόκλιση και η εκατοστιαία ανάκτηση. Η τελευταία θα πρέπει να είναι μεταξύ 90%-110% της θεωρητικής τιμής όταν δεν υπάρχουν κανονισμοί ελέγχου. Για την Αμερικανική και Ευρωπαϊκή φαρμακοποιία τα όρια είναι 98%-102% για τους ποσοτικούς προσδιορισμούς δραστικών ουσιών σε φαρμακευτικά προϊόντα.

4.2.6 ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ

Ο έλεγχος αξιοπιστίας των αναλυτικών μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού ουσιών και ποσοτικού προσδιορισμού προσμίξεων / υπολειμμάτων περιλαμβάνει και εξέταση της πιστότητας της μεθόδου. Αυτή αποτελεί το μέτρο της συμφωνίας αποτελεσμάτων της υπό εξέταση αναλυτικής μεθόδου σε κανονικές συνθήκες και συνήθως εκφράζεται ως το ποσοστό της σχετικής τυπικής απόκλισης για ένα σημαντικό αριθμό υποδειγμάτων του ίδιου δείγματος. Η πιστότητα περιλαμβάνει τον προσδιορισμό της επαναληψιμότητας και της αναπαραγωγιμότητας.

Η επαναληψιμότητα πρέπει να εκτιμάται χρησιμοποιώντας: α) τουλάχιστον 9 προσδιορισμούς που καλύπτουν την καθοριζόμενη περιοχή συγκεντρώσεων της μεθόδου (3 επίπεδα συγκεντρώσεων επί 3 προσδιορισμούς) ή β) τουλάχιστον 6 προσδιορισμούς στο 100% της συγκεντρώσεως του ελέγχου για τον οποίο προτείνεται η μέθοδος. Οι συνθήκες επαναληψιμότητας περιλαμβάνουν ακριβώς τις ίδιες πειραματικές συνθήκες σε βραχύ χρονικό διάστημα.

Ο βαθμός αναγκαιότητας για την εκτίμηση και ενδιάμεσης πιστότητας (intermediate precision) εξαρτάται από τις συνθήκες κάτω από τις οποίες η μέθοδος πρόκειται να χρησιμοποιηθεί. Αυτός που εφαρμόζει τη μέθοδο πρέπει να αποδείξει τις επιδράσεις τυχαίων γεγονότων στην αναπαραγωγιμότητα της αναλυτικής μεθόδου. Τυπικές μεταβολές που πρέπει να μελετηθούν περιλαμβάνουν : ημέρες, αναλυτές, όργανα κτλ. Δεν είναι απαραίτητο να μελετηθούν αυτές οι επιδράσεις κάθε μια χωριστά.

Η αναπαραγωγιμότητα εκτιμάται ενδοεργαστηριακά ή με μια διεργαστηριακή δοκιμασία. Η διεργαστηριακή εκτίμηση διεξάγεται για την προτυποποίηση μιας αναλυτικής μεθόδου, προκειμένου να περιληφθεί ως επίσημη στα βιβλία που εκδίδουν εθνικοί και διεθνείς φορείς, π.χ σε φαρμακοποιίες.

Για κάθε τύπο πιστότητας πρέπει να αναφέρονται η τυπική απόκλιση ή η σχετική τυπική απόκλιση και το διάστημα εμπιστοσύνης.

Κριτήρια αποδοχής %RSD \leq 2.0.

4.2.7 ΕΝΔΙΑΜΕΣΗ ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ [46]

Υπολογίζεται με βάση τη διεξαγωγή 3 επιπλέον πειραμάτων αναπαραγωγιμότητας σε διαφορετική ημέρα, από διαφορετικό αναλυτή και σε άλλο αναλυτικό όργανο. Υπολογίζεται η % ανάκτηση και η % RSD μεταξύ των ανακτήσεων. Τα αποτελέσματα επεξεργάζονται με βάση με την μονοπαραμετρική ανάλυση διακύμανσης (One Way Anova)

Κριτήρια αποδοχής:

Κάθε ανάκτηση θα πρέπει να είναι μεταξύ 98.0 – 102.0%. Η ολική αναπαραγωγιμότητα %RSD_r θα πρέπει να είναι ≤ 2.0%, και η ενδιάμεση επαναληψιμότητα %RSD_R να είναι ≤ 5.0%.

4.2.8 ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

Για τον προσδιορισμό του ορίου ανιχνεύσεως μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες προσεγγίσεις, που εξαρτώνται από το εάν η αναλυτική μέθοδος είναι ενόργανη ή μη ενόργανη. Οι συνήθεις προσεγγίσεις είναι οι ακόλουθες: με βάση την οπτική αξιολόγηση, με βάση το λόγο σήμα προς θόρυβο, με βάση την τυπική απόκλιση της αναλυτικής απόκρισης και την κλίση της καμπύλης αναφοράς και τέλος με βάση την τυπική απόκλιση του λευκού δείγματος.

4.2.9 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ

Η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας μιας αναλυτικής μεθόδου πρέπει να εξετάζεται στη φάση της ανάπτυξής της και εξαρτάται από τον τύπο της μελετώμενης μεθόδου. Η ανθεκτικότητα πρέπει να δείχνει την επιδεκτικότητα της μεθόδου σε σχέση με προσχεδιασμένες μεταβολές στις πειραματικές παραμέτρους της μεθόδου. Στην περίπτωση της HPLC τυπικές μεταβολές αποτελούν οι μεταβολές του pH, της κινητής φάσης, μεταβολές της σύστασης της κινητής φάσης, διαφορετικές στήλες (παρτίδες η/και προμηθευτές), θερμοκρασία, ταχύτητα ροής κινητής φάσης.

4.2.10 ANTOXH ΜΕΘΟΔΟΥ

Αποτελεί τον βαθμό της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (reproducibility) κατά τον οποίο τα δείγματα αναλύονται κάτω από διαφορετικές συνθήκες ελέγχου (διαφορετικά εργαστήρια, αναλυτές, όργανα παρτίδες αντιδραστηρίων, θερμοκρασία προσδιορισμού, χρόνος προσδιορισμού).

4.2.11 ΔΟΚΙΜΕΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ

Ο σκοπός αυτής της μελέτης είναι να επικρατήσουν συνθήκες τέτοιες που θέτουν το τελικό προϊόν σε κατάσταση «στρες», ώστε να αποδειχθεί ότι οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της δραστηκής και των προσμίξων είναι ακόμη ειδικές όταν είναι παρόντα άγνωστα προϊόντα αποικοδόμησης.

Οι εξεταζόμενες συνθήκες εξαρτώνται πρωταρχικά από την ίδια την δραστηκή ουσία του σκευάσματος (ευαισθησία στο φως, ευκολία οξειδωσης) καθώς και/ή την μορφή του τελικού προϊόντος (διάλυμα, γέλη, δισκίο). Ο γενικός κανόνας προϋποθέτει το στρεσάρισμα του προϊόντος μέχρις ότου σημαντική αποικοδόμηση λάβει χώρα χωρίς οστόσο να επιτευχθούν ακραίες συνθήκες.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

ΟΡΓΑΝΑ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

5.1 ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΣΥΣΤΟΙΧΙΑΣ ΦΩΤΟΔΙΟΔΩΝ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το υγροχρωματογραφικό σύστημα της εταιρείας Shimadzu Εικόνα 1, το οποίο αποτελείται από τα ακόλουθα τμήματα:

- Απαερωτή (DGU-20A5),
- Αντλία (LC-20 AD),
- Αυτόματο δειγματολήπτη (SIL-20ACHT),
- Φούρνο στήλης (CTO-20AC),
- Ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (SPD-M20 UV/Vis),
- Σύστημα ελέγχου (A-LC-03).

Διαθέτει το λογισμικό πρόγραμμα Shimadzu LC Solutions (v.1.11 SP1) για την επεξεργασία, την καταγραφή και την ολοκλήρωση των χρωματογραφημάτων.



Εικόνα 1 Υγροχρωματογραφικό σύστημα Shimadzu

Ως αναλυτική στήλη χρησιμοποιήθηκε η MZ-Analysentechnik GmbH, Spherisorb ODS-1 250 × 4,6 mm, 10 μm, Art. No 250.4,6.7050.N.

5.2 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

Ο εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει:

- Αναλυτικό ζυγό τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (Santorinous –Basic),
- Υδατόλουτρο υπερήχων (Metason 60 – (Struers),
- Συσκευή φυγοκέντρωσης (Rotofix 32-Hettich),
- Πεχάμετρο (HACH)
- Συσκευής παραγωγής υπερκαθαρού νερού ειδικής αντίστασης >17,8 ΜΩ cm με απιονισμό και απόσταξη,

- Αναδευτήρα περιδίνησης (Vortex –Velp Scientifica).

Στον εργαστηριακό εξοπλισμό περιλαμβάνονται, επίσης τα παρακάτω σκεύη:

- Ογκομετρικές φιάλες 10, 25, 50, 100 και 1000 mL,
- Ποτήρια ζέσεως των 50 και 500 mL,
- Αυτόματες πιπέττες των 200 και 1000 μ L, διακριβωμένες,
- Σωληνάκια για φυγοκέντρηση με βιδωτό πώμα,
- Βαθμονομημένο σιφώνιο των 5 και των 10 mL,
- Ογκομετρικοί κύλινδροι των 100, 500 και 1000 mL,
- Φίλτρα διήθησης κινητής φάσης 0,45 μ m.

5.3 ΔΙΑΛΥΤΕΣ, ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΥΠΑ

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή της κινητής φάσης είναι καθαρότητας HPLC και περιλαμβάνουν ακετονιτρίλιο (ACN, Merck), οξικό οξύ (Merck Ph. Eu. >99,5%) και υπερκαθαρό νερό ειδικής αντίστασης >17,8 M Ω cm.

Οι πρότυπες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

- Βενζοϋλοϋπεροξειδίο (Benzoyl peroxide, BPO) υλικό αναφοράς (καθαρότητας 75%, Cat. No 517909-100G, Sigma Aldrich., USA).
- Βενζαλδεύδη (Benzaldehyde) υλικό αναφοράς (Πρόσμιξη Α, καθαρότητας \geq 99.0%, Lot S6309656, Merck., Germany).
- Βενζοϊκό οξύ (Benzoic acid) υλικό αναφοράς (Πρόσμιξη Β, καθαρότητας \geq 99.5%, Cat. No 242381-25G, Sigma Aldrich., USA).
- Βενζοϊκός Αιθυλεστέρας (Ethyl benzoate) υλικό αναφοράς (Πρόσμιξη Γ, καθαρότητας \geq 99.0%, Cat. No E12907-100G, Sigma Aldrich., USA).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6°

ΑΝΑΠΤΥΞΗ-ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ HPLC/PDA ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΒΕΝΖΟΪΛΟΪΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ - ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΟΣ

6.1 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ

Κινητή φάση:

Μίγμα παγόμορφου οξικού οξέος, ακετονιτρίλιο και νερό σε αναλογία (1:500:500 V/V/V)

Όγκος ένεσης δείγματος: 20 µL.

Ταχύτητα ροής: 1.0 mL min⁻¹.

Θερμοκρασία δειγματολήπτη: Περιβάλλοντος

Θερμοκρασία στήλης: Περιβάλλοντος

Χρόνος: 30 min

Μήκος κύματος ανιχνευτή: 235 nm.

6.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ FACTORIAL DESIGN 2ⁿ

Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών επεξεργασίας του δείγματος έγινε παραγοντικός πειραματικός σχεδιασμός με εξεταζόμενους παράγοντες το ακετονιτρίλιο και την μεθανόλη, ως μέσα διαλυτοποίησης του δείγματος και τον χρόνο παραμονής στους υπερήχους, πίνακες 4,5.

Πίνακας 4 Πειράματα πειραματικού σχεδιασμού

Αριθμός πειράματος	Βάρος του δείγματος της κρέμας (mg)	Περιεκτ/τα ΒΡΟ (mg) στο δείγμα	Συγκέντρωση Δείγματος (μg/mL)	Εμβαδόν κορυφής	% Ποσοστό διάλυσης ΒΡΟ στο δείγμα
1	2028,0	202,80	263,6	165013	0,6
2	2023,4	202,34	263,0	11059345	40,7
3	2012,8	201,28	261,7	397006	1,5
4	2014,9	201,49	261,9	29729074	109,9
5	2403,6	240,36	312,5	34103256	105,7
6	2118,4	211,84	275,4	20052351	70,5
7	2158,6	215,86	280,6	282267	1,0
8	2064,3	206,43	268,4	7745606	27,9
9	2142,1	214,21	278,5	436611	1,5
10	2334,2	233,42	303,4	34103256	108,8
11	2104,8	210,48	273,6	28400406	100,5
12	2050,3	205,03	266,5	16897166	61,4
13	2136,5	213,65	277,7	445011	1,6
14	1997,5	199,75	259,7	15711131	58,6
15	2093,3	209,33	272,1	4008048	14,3
16	2002,1	200,21	260,3	1436264	5,3
17	1972,8	197,28	256,5	26638759	100,6
18	2162,4	216,24	281,1	10757349	37,0
19	2028,5	202,85	263,7	364856	1,3
20	2066,8	206,68	268,7	26280058	94,7
21	2104,7	210,47	273,6	29627859	104,8
22	2097,0	209,70	272,6	881691	3,1
23	2116,1	211,61	275,1	947701	3,3
24	2069,4	206,94	269,0	28418053	102,3
25	2026,2	202,62	263,4	764152	2,8
26	2015,6	201,56	262,0	194965	0,7
27	2207,3	220,73	286,9	10272300	34,7
28	2023,9	202,39	263,1	2205813	8,1
29	2070,1	207,01	269,1	29009916	104,4
30	2009,2	200,92	261,2	5764389	21,4
31	2104,6	210,46	273,6	13042854	46,2
32	2434,7	243,47	316,5	14799927	45,3

Πίνακας 5 Παράγοντες πειραματικού σχεδιασμού και Απόκριση

	Παράγοντας: % ACN	Παράγοντας: % MetOH	Παράγοντας: Υπέρηχοι (min)	Απόκριση
1	0,0	50,0	5	1,0
2	16,7	50,0	10	40,7
3	16,7	33,3	10	14,3
4	50,0	16,7	10	102,3
5	16,7	50,0	5	61,4
6	0,0	16,7	5	1,6
7	0,0	50,0	10	3,1
8	33,3	0,0	10	108,8
9	0,0	33,3	10	1,0
10	16,7	33,3	5	5,3
11	33,3	0,0	5	0,6
12	0,0	16,7	10	1,5
13	16,7	16,7	5	100,5
14	0,0	0,0	5	0,7
15	16,7	16,7	10	3,3
16	33,3	33,3	5	1,5
17	16,7	0,0	10	0,7
18	50,0	16,7	5	37,0
19	0,0	0,0	10	3,3
20	50,0	33,3	5	14,3
21	50,0	50,0	10	40,7
22	16,7	0,0	5	27,9
23	33,3	50,0	10	104,4
24	50,0	0,0	10	94,7
25	33,3	16,7	5	46,2
26	50,0	50,0	5	105,7
27	50,0	33,3	10	109,9
28	33,3	33,3	10	100,5
29	33,3	50,0	5	70,5
30	0,0	33,3	5	61,4
31	33,3	16,7	10	34,7
32	50,0	0,0	5	100,6

6.3 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ

Για τον προσδιορισμό της δραστηκής παρασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα:

- **Πρότυπο διάλυμα BPO** (25 µg/mL): Ακριβώς ζυγισμένη ποσότητα 25,0 mg πρότυπης ουσίας αναφοράς BPO μεταφέρεται σε ογκομετρική

φιάλη 50 mL και διαλύεται σε ακετονιτρίλιο (ACN). 1,0 mL αυτού του διαλύματος μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη 20.0 mL όπου αραιώνεται με κινητή φάση αποτελούμενη από οξικό οξύ, ακετονιτρίλιο και νερό (1:500:500 V/V/V).

- **Διάλυμα εργασίας δείγματος:** Ακριβώς ζυγισμένη ποσότητα κρέμας η οποία αντιστοιχεί σε 200 mg BPO μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη 100 mL και διασπείρεται σε μίγμα ακετονιτριλίου-μεθανόλης (50:50). Ακολουθεί η τοποθέτηση σε λουτρό υπερήχων για 10 min πλήρωση με ακετονιτρίλιο μέχρι την ένδειξη της χαραγής και διήθηση μέσω φίλτρου 0,45 μm. Τέλος 650 μL αυτού του διαλύματος αραιώνονται στα 50,0 mL με κινητή φάση αποτελούμενη από οξικό οξύ, ακετονιτρίλιο και νερό (1:500:500 V/V/V).

Η % περιεκτικότητα του BPO στα διαλύματα εργασίας υπολογίζεται από τη σχέση:

$$\% \text{ περιεκ/τα} = \frac{A_{\text{εργ.}}}{A_{\text{προτ.}}} \times \frac{W_{\text{προτ.}} / 25.0 \times P_s}{W_{\text{εργ.}} \times L / 200} \quad \text{Εξίσωση 12}$$

Όπου:

$A_{\text{εργ.}}$: το εμβαδόν κορυφής χρωματογραφήματος του BPO στο διάλυμα εργασίας.

$A_{\text{προτ.}}$: το εμβαδόν κορυφής χρωματογραφήματος του BPO στο πρότυπο διάλυμα.

$W_{\text{προτ.}}$: το βάρος σε mg του υλικού αναφοράς BPO που χρησιμοποιήθηκε στην παρασκευή του πρότυπου διαλύματος.

$W_{\text{εργ.}}$: το βάρος σε mg του δείγματος για την παρασκευή του διαλύματος εργασίας.

P_s : η καθαρότητα του BPO στο υλικό αναφοράς.

L : η ένδειξη περιεκτικότητας BPO της ετικέτας σε mg/g.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των προσμίξεων παρασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα:

- **Διάλυμα αναφοράς Α:** Ακριβής ποσότητα πρότυπης ουσίας αναφοράς πρόσμιξης Α 20,0 mg, ακριβής ποσότητα πρότυπης ουσίας αναφοράς πρόσμιξης Β 200,0 mg και ακριβής ποσότητα πρότυπης ουσίας αναφοράς πρόσμιξης Γ 20,0 mg μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη. 100 mL όπου διαλύονται μέχρι τη χαραγή με κινητή φάση. 1,0 mL από το διάλυμα αυτό μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 10,0 mL και αραιώνεται με κινητή φάση μέχρι τη χαραγή.
- **Διάλυμα αναφοράς Β:** 1.0 mL του διαλύματος εργασίας δείγματος αραιώνεται σε ογκομετρική φιάλη 100,0 mL με κινητή φάση.
- **Διάλυμα εργασίας δείγματος:** (περιγράφεται ανωτέρω).

Η αντίστοιχη περιεκτικότητα για τις προσμίξεις δίνεται από τη σχέση:

$$\% \text{ περιεκτικότητα πρόσμιξης} = \frac{A_{\text{προσμ.}}}{A_{\text{αναφ.}}} \times \% \text{ όριο της κάθε πρόσμιξης}$$

Εξίσωση 13

Όπου:

$A_{\text{προσμ.}}$: το εμβαδόν της πρόσμιξης στο χρωματογράφημα του διαλύματος εργασίας.

$A_{\text{αναφ.}}$: το εμβαδόν της πρόσμιξης στο χρωματογράφημα του πρότυπου διαλύματος.

% όριο κάθε πρόσμιξης: 1% για την πρόσμιξη Α και Γ και 10% για την πρόσμιξη Β.

6.3.1 ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Για τον έλεγχο της ειδικότητας παρασκευάστηκε λευκό διάλυμα (placebo) που περιείχε όλα τα έκδοχα εκτός της δραστικής ΒΡΟ. Η εξέταση του χρωματογραφήματος του διαλύματος "placebo" επιβεβαίωσε ότι δεν εμφανίζονται κορυφές στον χρόνο που εκλούεται το ΒΡΟ ($t_R=21,15 \text{ min}$).

6.3.2 ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ

6.3.2.1 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΔΡΑΣΤΙΚΗΣ (ASSAY)

Παρασκευάστηκε σειρά προτύπων διαλυμάτων τα οποία καλύπτουν 5 επίπεδα συγκέντρωσης για καθένα από τα συστατικά τους.

- **Πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης BPO** ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$): παρασκευάστηκε από ακριβώς ζυγισμένη ποσότητα περίπου 50 mg πρότυπου BPO η οποία μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL και αραιώθηκε μέχρι τελικού όγκου με ACN. Τέλος 2,5 mL μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL.
- **Πρότυπο διάλυμα Α BPO** ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$, το οποίο αντιστοιχεί στο 80% της συγκέντρωσης εργασίας): Παρασκευάστηκε αραιώνοντας 0,8 mL του πρότυπου διαλύματος παρακαταθήκης με κινητή φάση μέχρι τελικού όγκου 10,0 mL
- **Πρότυπο διάλυμα Β BPO** ($22,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, το οποίο αντιστοιχεί στο 90% της συγκέντρωσης εργασίας): Παρασκευάστηκε αραιώνοντας 0,9 mL του πρότυπου διαλύματος παρακαταθήκης σε κινητή φάση μέχρι τελικού όγκου 10,0 mL
- **Πρότυπο διάλυμα Γ BPO** ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$, το οποίο αντιστοιχεί στο 100% της συγκέντρωσης εργασίας): Παρασκευάστηκε αραιώνοντας 1,0 mL του πρότυπου διαλύματος παρακαταθήκης σε κινητή φάση μέχρι τελικού όγκου 10,0 mL
- **Πρότυπο διάλυμα Δ BPO** ($27,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, το οποίο αντιστοιχεί στο 110% της συγκέντρωσης εργασίας): Παρασκευάστηκε αραιώνοντας 1,1 mL του πρότυπου διαλύματος παρακαταθήκης σε κινητή φάση μέχρι τελικού όγκου 10,0 mL
- **Πρότυπο διάλυμα Ε BPO** ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$, το οποίο αντιστοιχεί στο 120% της συγκέντρωσης εργασίας): Παρασκευάστηκε αραιώνοντας 1,2 mL του πρότυπου διαλύματος παρακαταθήκης σε κινητή φάση μέχρι τελικού όγκου 10,0 mL

6.3.2.2 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ (IMPURITIES)

Παρασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα:

- **Πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης Α** (περιλαμβάνει τις προσμίξεις Α και Γ που έχουν κοινό όριο 1% και ΒΡΟ, 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ της κάθε ένωσης που αντιστοιχεί στο 100,0% του περιεχομένου των προσμίξεων): διαλύθηκαν 20,0 mg υλικού αναφοράς Πρόσμιξης Α, 20,0 mg υλικού αναφοράς Πρόσμιξης Γ και 20,0 mg υλικού αναφοράς (ΒΡΟ) σε 10,0 mL κινητής φάσης.
- **Πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης Β** (που περιλαμβάνει την πρόσμιξη Β 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, που αντιστοιχεί στο 100,0% του περιεχομένου των προσμίξεων): διαλύθηκαν 20,0 mg υλικού αναφοράς Πρόσμιξης Β σε 10,0 mL κινητής φάσης.
- **Πρότυπο διάλυμα Α** (από 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ για τις προσμίξεις Α, Β, Γ και το ΒΡΟ που αντιστοιχεί στο 0,1% του περιεχομένου των προσμίξεων): αραιώθηκαν 0,1 mL πρότυπου διαλύματος παρακαταθήκης Α και 0,1 mL πρότυπου διαλύματος παρακαταθήκης Β με κινητή φάση σε τελικό όγκο 100,0 mL.
- **Πρότυπο διάλυμα Β** (από 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ για τις προσμίξεις Α, Γ και το ΒΡΟ, που αντιστοιχεί στο 0,5% του περιεχομένου των προσμίξεων και 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ για την Πρόσμιξη Β, που αντιστοιχεί στο 1,0% του περιεχομένου των προσμίξεων): αραιώθηκαν 0,5 mL πρότυπου διαλύματος παρακαταθήκης Α και 1,0 mL πρότυπου διαλύματος παρακαταθήκης Β με κινητή φάση σε τελικό όγκο 100,0 mL.
- **Πρότυπο διάλυμα Γ** (από 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ για τις προσμίξεις Α, Γ και το ΒΡΟ, που αντιστοιχεί στο 1,0% του περιεχομένου των προσμίξεων και 200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ για την Πρόσμιξη Β, που αντιστοιχεί στο 10,0% του περιεχομένου των προσμίξεων): αραιώθηκαν 0,1 mL πρότυπου διαλύματος παρακαταθήκης Α και 1,0 mL πρότυπου διαλύματος παρακαταθήκης Β με κινητή φάση σε τελικό όγκο 10,0 mL.
- **Πρότυπο διάλυμα Δ** (από 40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ για τις προσμίξεις Α, Γ και το ΒΡΟ, που αντιστοιχεί στο 2,0% του περιεχομένου των προσμίξεων και 250,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ για την Πρόσμιξη Β, που αντιστοιχεί στο 12,5% του περιεχομένου των προσμίξεων): αραιώθηκαν 0,2 mL πρότυπου

διαλύματος παρακαταθήκης Α και 1,25 mL πρότυπου διαλύματος παρακαταθήκης Β με κινητή φάση σε τελικό όγκο 1,0 mL

- ο **Πρότυπο διάλυμα Ε** (από 100,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ για τις προσμίξεις Α, Γ και το ΒΡΟ, που αντιστοιχεί στο 5,0% του περιεχομένου των προσμίξεων και 300,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ για την Πρόσμιξη Β, που αντιστοιχεί στο 15,0% του % περιεχομένου των προσμίξεων): αραιώθηκαν 0,5 mL πρότυπου διαλύματος παρακαταθήκης Α και 1,5 mL πρότυπου διαλύματος παρακαταθήκης Β με κινητή φάση σε τελικό όγκο 1,0 mL

6.3.3 ΑΚΡΙΒΕΙΑ

6.3.3.1 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΑΚΡΙΒΕΙΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΗΣ (ASSAY)

Για τον προσδιορισμό της ακρίβειας παρασκευάστηκαν εμβολιασμένα διαλύματα τα οποία καλύπτουν μία συγκεκριμένη περιοχή εργασίας για τα συστατικά τους.

- ο **Εμβολιασμένο διάλυμα Α** (επίπεδο ενίσχυσης του ΒΡΟ ίσο με 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$, το οποίο αντιστοιχεί στο 80% της συγκεντρώσεως εργασίας): ζυγίστηκε ποσότητα placebo που αντιστοιχεί περίπου σε 25 mg ΒΡΟ και μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη 1000 mL. Σε αυτήν προστέθηκε μία ακριβώς ζυγισμένη ποσότητα υλικού αναφοράς ΒΡΟ περίπου 20 mg. Ακολούθησε αραιώση με κινητή φάση και εμβάπτιση σε λουτρό υπερήχων για 10 min. Το διαυγές διάλυμα διήλθε μέσω φίλτρου 0.45 μm .
- ο **Εμβολιασμένο διάλυμα Β** (επίπεδο ενίσχυσης του ΒΡΟ ίσο με 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, το οποίο αντιστοιχεί στο 100% της συγκεντρώσεως εργασίας): όπως ακριβώς για το εμβολιασμένο διάλυμα Α με τη διαφορά ότι προστέθηκε μία ακριβώς ζυγισμένη ποσότητα πρότυπης ενώσεως ΒΡΟ περίπου 25 mg.
- ο **Εμβολιασμένο διάλυμα Γ** (επίπεδο ενίσχυσης του ΒΡΟ ίσο με 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$, το οποίο αντιστοιχεί στο 100% της συγκεντρώσεως εργασίας):

όπως ακριβώς για το εμβολιασμένο διάλυμα Α με τη διαφορά ότι προστέθηκε μία ακριβώς ζυγισμένης ποσότητα πρότυπης ενώσεως ΒΡΟ περίπου 30 mg.

Ο υπολογισμός της % ανάκτησης γίνεται με βάση τον τύπο:

$$\% \text{ _ανάκτηση} = \frac{\text{BPO _ \%assay}}{\% \text{ _Επίπεδο _ Ενίσχυσης}} \times 100 \text{ Εξίσωση 14}$$

6.3.3.2 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΑΚΡΙΒΕΙΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ (IMPURITIES)

Παρασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα:

- **Πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης Α** (περιλαμβάνει τις προσμίξεις Α, Γ και ΒΡΟ, από 2000 μg mL⁻¹, που αντιστοιχεί στο 100,0% του περιεχομένου των προσμίξεων): διαλύθηκαν 20,0 mg υλικού αναφοράς πρόσμιξης Α, 20,0 mg υλικού αναφοράς πρόσμιξης Γ και 20,0 mg υλικού αναφοράς ΒΡΟ, σε 10,0 mL τελικό όγκο της κινητής φάσης.
- **Πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης Β** (περιλαμβάνει την πρόσμιξη Β 2000 μg mL⁻¹, που αντιστοιχεί στο 100,0% του περιεχομένου των προσμίξεων): διαλύθηκαν 20,0 mg υλικού αναφοράς πρόσμιξης Β σε 10,0 mL τελικό όγκο της κινητής φάσης.
- **Εμβολιασμένο διάλυμα Α** (επίπεδο ενίσχυσης για τις προσμίξεις Α, Γ 2,0 μg mL⁻¹, που αντιστοιχεί στο 0.1% του περιεχομένου των προσμίξεων): Ζυγίστηκε επακριβώς ποσότητα κάθε πρόσμιξης που αντιστοιχεί σε 2,0 g ΒΡΟ (βάσει περιεχομένου ετικέτας) και 2,0 g ΒΡΟ και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη όπου προστέθηκαν 50 μL πρότυπου διαλύματος παρακαταθήκης Β μέχρι τελικού όγκου 1000 mL με κινητή φάση.
- **Εμβολιασμένο διάλυμα Β** (επίπεδο ενίσχυσης για την πρόσμιξη Β 2,0 μg mL⁻¹, που αντιστοιχεί στο 0,2% του % περιεχομένου των προσμίξεων): Ό,τι ισχύει για το εμβολιασμένο διάλυμα Α αλλά με χρήση 200 μL πρότυπου διαλύματος παρακαταθήκης Β.

- ο **Εμβολιασμένο διάλυμα Γ** (επίπεδο ενίσχυσης για την πρόσμιξη Β 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, που αντιστοιχεί στο 0,5% του περιεχομένου των προσμίξεων): Ό,τι ισχύει για το εμβολιασμένο διάλυμα Α αλλά με χρήση 500 μL πρότυπου διαλύματος παρακαταθήκης Β.
- ο **Εμβολιασμένο διάλυμα Δ** (επίπεδο ενίσχυσης για την πρόσμιξη Β 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, που αντιστοιχεί στο 1,0% του περιεχομένου των προσμίξεων): Ό,τι ισχύει για το εμβολιασμένο διάλυμα Α αλλά με χρήση 1000 μL πρότυπου διαλύματος παρακαταθήκης Β.

Ο υπολογισμός της ανάκτησης για την πρόσμιξη Β δίνεται από τη εξίσωση 16.

$$\% \text{ΑΝΑΚΤΗΣΗ} = \frac{\% \text{ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΠΡΟΣΜΙΞΗΣ Β}}{\% \text{ΕΠΙΠΕΔΟ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟ Υ} \times \text{RRF}} \times 100 \quad \text{Εξίσωση 15}$$

Όπου: RRF=παράγοντας σχετικής απόκρισης

6.3.4 ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ

Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας ετοιμάσθηκαν 6 διαφορετικά εμβολιασμένα διαλύματα Β (περιγράφονται στο εδάφιο 6.3.3.1). Για τον προσδιορισμό της δραστηκής παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα ΒΡΟ (αναφέρεται στο στάδιο της ακρίβειας). Επίσης παρασκευάστηκε διάλυμα αναφοράς Α (περιγράφεται στο εδάφιο 6.3) για τον προσδιορισμό των προσμίξεων. Σε κάθε διάλυμα γίνονται 6 επαναλήψεις. Ο προσδιορισμός της ενδιάμεσης πιστότητας έγινε με την παρασκευή των ίδιων διαλυμάτων όπως και παραπάνω με την διαφορά ότι οι αναλύσεις διεξάγονται: α) σε διαφορετική μέρα, β) με διαφορετικό αναλυτή και γ) με διαφορετικό όργανο. Έγιναν 3 επαναλήψεις για το κάθε διάλυμα.

6.3.5 ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

Το όριο ανίχνευσης προσδιορίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση (σ) της αναλυτικής απόκρισης και την κλίση της καμπύλης αναφοράς (S). (Εξίσωση 17)

$$3.3 \times \frac{\sigma}{S} \quad \text{Εξίσωση 16}$$

6.3.6 ΟΡΙΟ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ

Το όριο ποσοτικοποίησης προσδιορίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση της αναλυτικής απόκρισης (σ) και την κλίση της καμπύλης αναφοράς (S). (Εξίσωση 18)

$$10 \times \frac{\sigma}{S} \quad \text{Εξίσωση 17}$$

6.4 ΔΟΚΙΜΕΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ

Για τον έλεγχο καταλληλότητας της μεθόδου να χρησιμοποιηθεί σε μελέτη σταθερότητας έγινε εφαρμογή της σε δείγματα που εκτέθηκαν σε εξαναγκασμένες συνθήκες (stress conditions).

Οι συνθήκες που εξετάστηκαν είναι οι εξής:

- Θερμική διάσπαση: ορισμένη ποσότητα του τελικού προϊόντος τοποθετήθηκε σε κλίβανο στους 80 °C. Αντιπροσωπευτικά δείγματα αναλύθηκαν έπειτα από 3, 5, 7 και 10 ημέρες.
- Διάσπαση υπό την επίδραση φωτός : ορισμένη ποσότητα του τελικού προϊόντος εξετέθη σε λυχνία τεχνητού ηλιακού φωτός (D 65 spectral distribution). Αντιπροσωπευτικά δείγματα αναλύθηκαν έπειτα από 3, 5, 7 και 10 ημέρες.
- Οξειδωτική διάσπαση : χρησιμοποιήθηκε υπεροξείδιο του υδρογόνου 3% ως μέσον αποικοδόμησης των προς εξέταση διαλυμάτων. Αυτά αναλύθηκαν έπειτα από 6, 12, 18, 24 και 48 ώρες.
- Διάσπαση σε όξινο περιβάλλον: χρησιμοποιήθηκε υδροχλωρικό οξύ 1 M ως μέσον αποικοδόμησης των προς εξέταση διαλυμάτων. Αυτά αναλύθηκαν έπειτα από 3, 5, 7 και 10 ημέρες.
- Διάσπαση σε αλκαλικό περιβάλλον: χρησιμοποιήθηκε υδροξείδιο του νατρίου 0,01 M ως μέσον αποικοδόμησης των προς εξέταση διαλυμάτων. Αυτά αναλύθηκαν έπειτα από 1, 2, 3, 4 και 5 ημέρες

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7°

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΒΕΝΖΟΪΛΟΪΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ

7.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΤΗΣ ΚΡΕΜΑΣ

Τα αποτελέσματα των πινάκων 4,5 για την μελέτη του πειραματικού σχεδιασμού προέκυψαν με βάση το στατιστικό πακέτο Statgraphics Centurion XV και παρατίθενται παρακάτω στους πίνακες 6-8.

Πίνακας 6 Βασικός Πειραματικός Σχεδιασμός

Base Design

Number of experimental factors: 3
Number of blocks: 1
Number of responses: 1
Number of runs: 32
Error degrees of freedom: 23
Randomized: Yes

<i>Factors</i>	<i>Low</i>	<i>High</i>	<i>Levels</i>	<i>Units</i>
Factor ACN	0,0	50,0	4	
Factor_MetOH	0,0	50,0	4	
Factor_sonication	5,0	10,0	2	

Πίνακας 7 Ανάλυση Διακύμανσης για τη Απόκριση

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
A:factor ACN	20428,1	1	20428,1	17,48	0,0003
B:Factor_MetOH	395,956	1	395,956	0,34	0,5655
C:Factor_sonication	509,603	1	509,603	0,44	0,5148
AC	4031,05	1	4031,05	3,45	0,0746
BB	524,07	1	524,07	0,45	0,5090
Total error	30381,9	26	1168,54		
Total (corr.)	56270,7	31			

R-squared = 46,0076 percent
R-squared (adjusted for d.f.) = 35,6244 percent
Standard Error of Est. = 34,1838

Mean absolute error = 24,9193
Durbin-Watson statistic = 1,51682 (P=0,0947)
Lag 1 residual autocorrelation = 0,198083

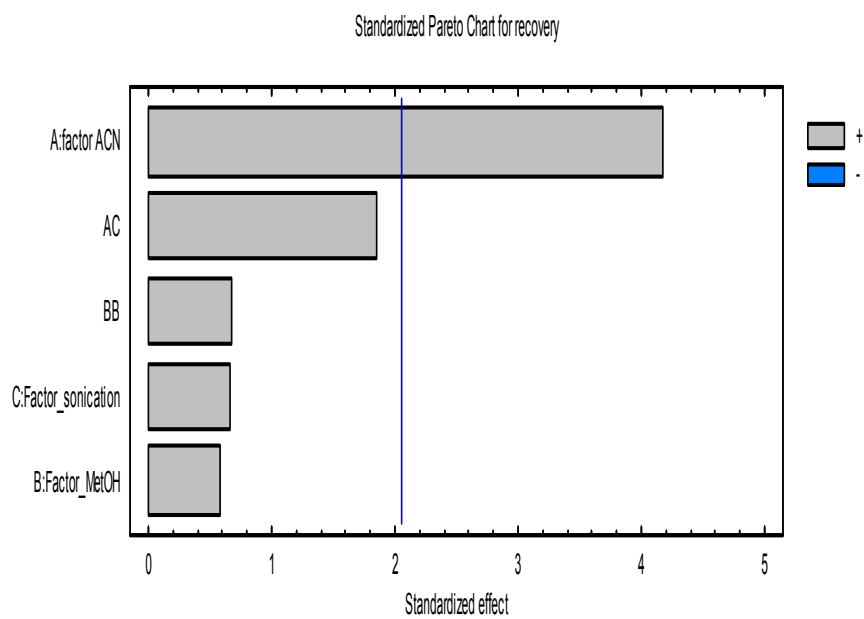
Η τιμή R-Squared υποδεικνύει ότι το μοντέλο αυτό του πειραματικού σχεδιασμού όπως εφαρμόστηκε εξηγεί ικανοποιητικά μόνο το 46 % για τη συνολική διακύμανση σε ότι αφορά στη Απόκριση, γεγονός που ενδεχομένως να βάζει σε αμφισβήτηση τον πρώτο σχεδιασμό και να θέτει ερωτήματα σχετικά με το αν χρειάζονται να υπεισέλθουν και άλλοι παράγοντες ή περισσότερα επίπεδα στον αρχικό σχεδιασμό.

Πίνακας 8 Πίνακας βέλτιστης απόκρισης

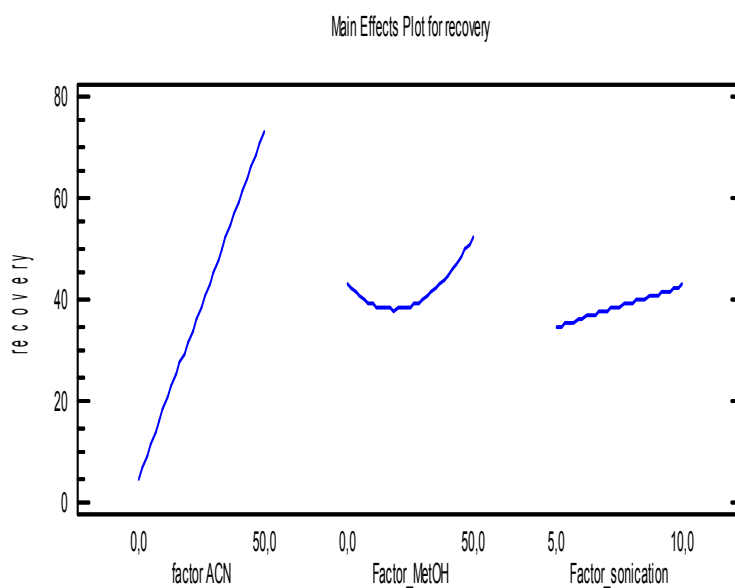
Optimum value = 105,466

<i>Factor</i>	<i>Low</i>	<i>High</i>	<i>Optimum</i>
factor ACN	0,0	50,0	50,0
Factor_MetOH	0,0	50,0	50,0
Factor_sonication	5,0	10,0	10,0

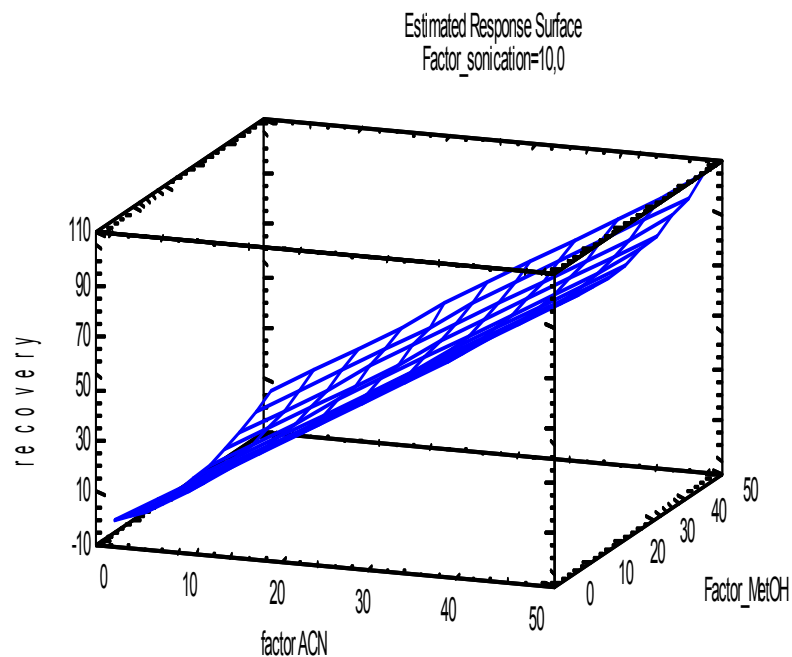
Από τα παρακάτω σχήματα 9-11, φαίνεται ότι στατιστικά σημαντική επίδραση έχει ο παράγοντας ακετονιτρίλιο, ενώ οι υπόλοιποι δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Ενώ η χρήση ακετονιτριλίου παρουσιάζει γραμμική επίδραση στην απόκριση (μεγάλη κλίση) από την αρχή, η μεθανόλη παρουσιάζει μία σχετική καμπή με αύξηση στην επίδραση από την παρουσία της από τα 25 ml περίπου και μετά. Ο παράγοντας της τοποθέτησης στους υπερήχους παρουσιάζει μικρή αύξηση στη απόδοση της απόκρισης.



Σχήμα 9 Χάρτης "Pareto" για την Απόκριση



Σχήμα 10 Επίδραση Παραγόντων στην Απόκριση



Σχήμα 11 Επίδραση Παραγόντων στην Απόκριση - Διάγραμμα επιφάνειας

Για τις συνθήκες που μελετήθηκαν προέκυψε ότι η μέγιστη απόκριση (ως % ανάκτηση) στην κατεργασία της κρέμας του δείγματος σημειώθηκε για την αναλογία (ακετονιτρίλιο: μεθανόλη: νερό) ίση με (50 mL: 50 mL: 0 mL) και χρόνο στο λουτρό υπερήχων 10 min γεγονός που σημειώνει τη συνεργιστική δράση των δύο διαλυτών με ταυτόχρονη την παντελή έλλειψη του νερού. Τελικά για την κατεργασία του δείγματος επιλέχθηκε η πιο πάνω αναλογία.

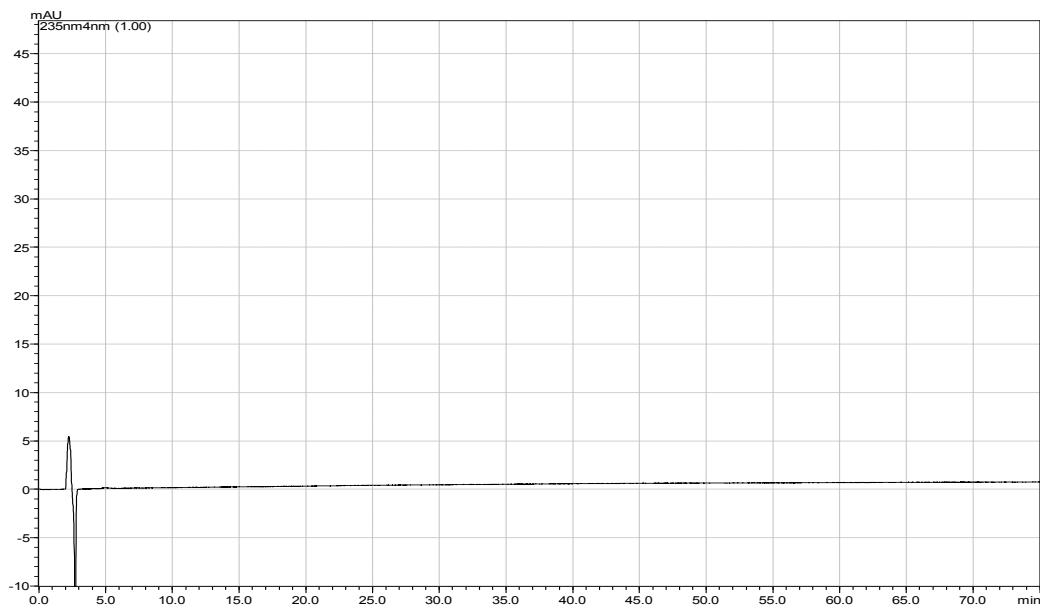
7.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ (ASSAY)

7.2.1 ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

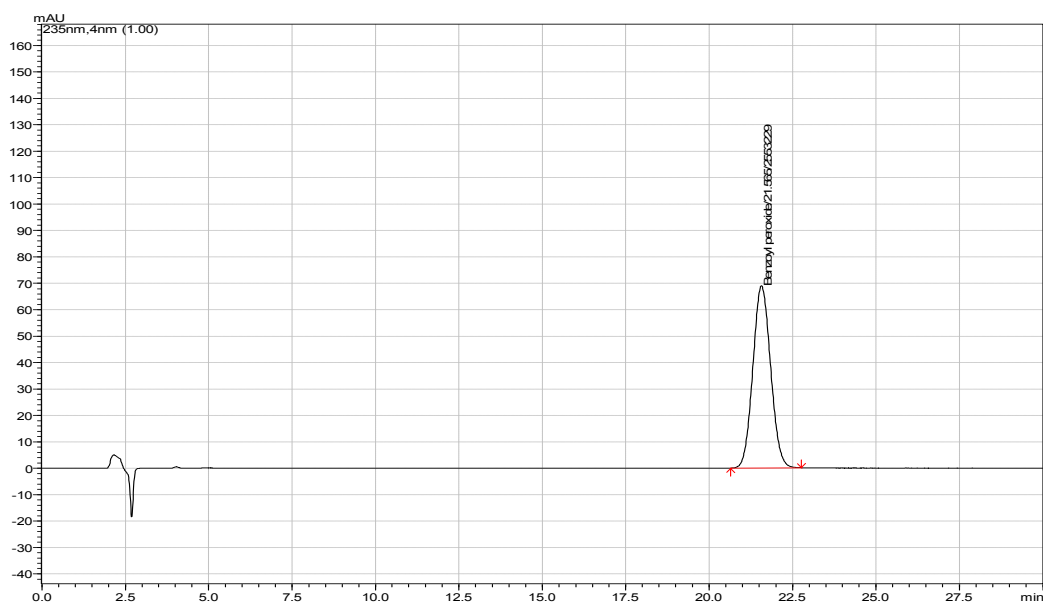
α) Διάλυμα λευκό: Η εξέταση του χρωματογραφήματος για το “λευκό” διάλυμα επιβεβαίωσε ότι δεν εμφανίζονται κορυφές στον χρόνο που εκλούεται το βενζοϋλοϋπεροξειδίο ($t_R \approx 21$ min), Στα σχήματα 12, 13 δίνονται ένα τυπικό χρωματογράφημα του “λευκού” διαλύματος και του BPO.

β) Η καθαρότητα κορυφής του υπεροξειδίου του βενζολίου από το φάσμα UV βρέθηκε ίση με 1,00

Επομένως, όλα τα κριτήρια αποδοχής για την ειδικότητα ικανοποιούνται.



Σχήμα 12 Χρωματογράφημα Λευκού διαλύματος



Σχήμα 13 Τυπικό χρωματογράφημα BPO

7.2.2 ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ – ΕΥΡΟΣ

Στον πίνακα 9 δίνονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων για τον έλεγχο γραμμικότητας.

Πίνακας 9 Αποτελέσματα για τη μελέτη της γραμμικότητας

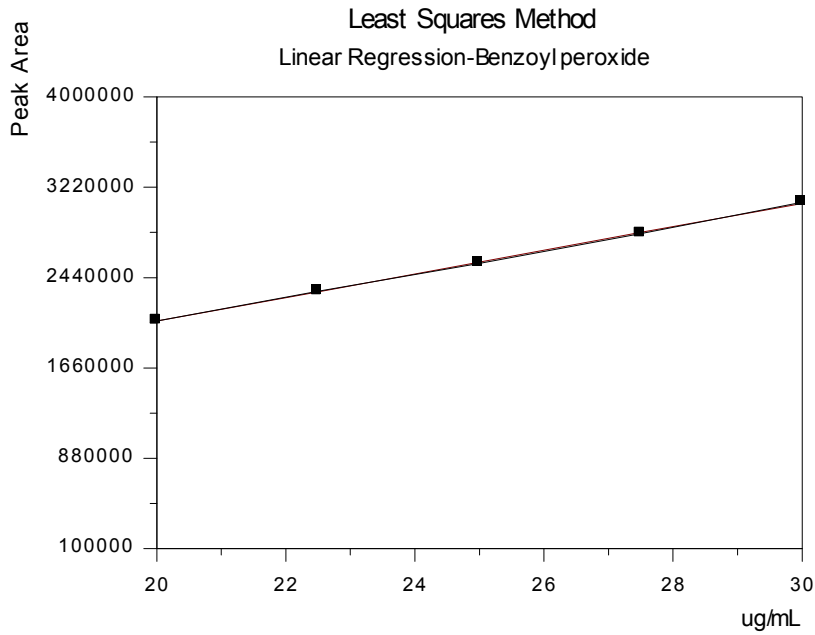
Πρότυπα διαλύματα/Συγκέντρωση BPO (% του διαλύματος εργασίας)	Συγκέντρωση BPO (μg/mL)	Εμβαδόν κορυφής	Μέσος Όρος(±SD) %RSD
A/80	80	2069089 2072234 2061221	206,75 (±0,57)×10 ⁴ 0,27%
B/90	90	2329931 2321360 2321073	232,41 (±0,50)×10 ⁴ 0,22%
Γ/100	100	2553497 2565636 2571583	256,36 (±0,92)×10 ⁴ 0,36%
Δ/110	110	2824400 2826415 2808400	281,97 (±0,99)×10 ⁴ 0,35%
Ε/120	120	3083739 3086291 3102806	30,91 (±0,10)×10 ⁵ 0,33%

Έπειτα από την εφαρμογή της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων προέκυψε η εξίσωση παλινδρόμησης:

Τομή στον άξονα των Υ: $0,31(\pm 0,31) \times 10^5$ (μονάδες εμβαδού)

Κλίση: $10,17(\pm 0,12) \times 10^4$ (μονάδες εμβαδού x mL x μg⁻¹)

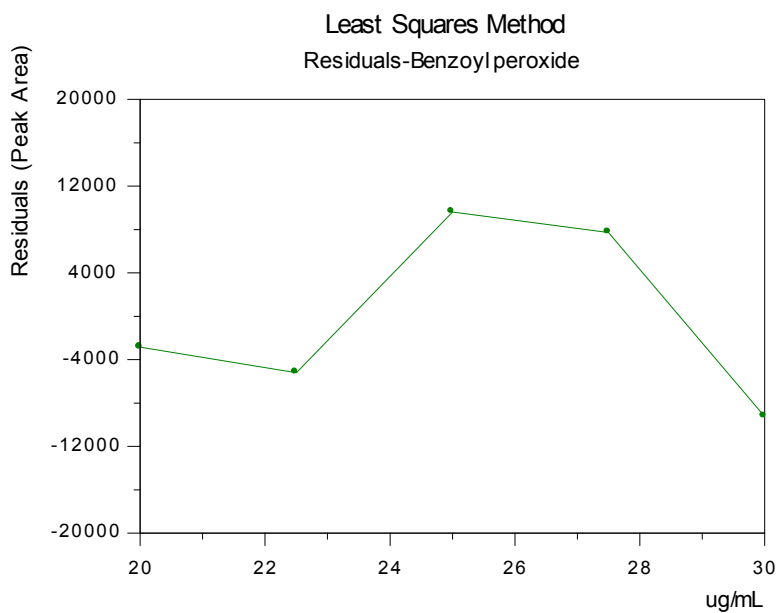
Συντελεστής συσχέτισης (r): >0,9997



Σχήμα 14 Καμπύλη βαθμονόμησης προτύπων διαλυμάτων ΒΡΟ

Η γραμμή διέρχεται από το μηδέν των αξόνων και επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος ποσοτικοποίησης του ενός προτύπου.

$$t_{\text{πειρ}} = \text{τομή} / S_{\text{τομή}} = 1,008 < t_{\text{θεωρ}} = 3,182 [(v=5-2), 95\%]$$



Σχήμα 15 Διάγραμμα υπολοίπων πρότυπων διαλυμάτων ΒΡΟ

Το εύρος της γραμμικής περιοχής καθορίστηκε σε 20-30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, το οποίο αντιστοιχεί στο 80-120% της συγκέντρωσης εργασίας. Από τα δεδομένα επαναληψιμότητας προκύπτει ότι η επαναληψιμότητα συστήματος είναι $\leq 0,36\%$.

7.2.3 ΑΚΡΙΒΕΙΑ

Στον πίνακα 10 δίνονται τα αποτελέσματα ελέγχου της ακρίβειας της μεθόδου προσδιορισμού του ΒΡΟ.

Πίνακας 10 Αποτελέσματα για τη μελέτη της Ακρίβειας

Εμβολ/νο Δείγμα	Εμβαδόν Κορυφής Δείγματος	Εμβαδόν Κορυφής Προτύπου	% επίπεδο εμβολ/μου	% Ανάκτηση	Μέσος Όρος (\pm SD)/ %RSD
A	2009323	2555887	79,7	98,64	98,87(\pm 0,20)
	2016177	2571159	79,2	99,01	0,21%
	2007983	2571300	78,9	98,98	
B	2548820	2555887	100,3	99,43	99,39(\pm 0,36)
	2563538	2571159	100,7	99,01	0,36%
	2564394	2571300	100,0	99,73	
Γ	3098742	2555887	120,3	100,78	100,26(\pm 0,20)
	3099678	2571159	120,2	100,30	0,54%
	3086387	2571300	120,4	99,69	

Από τον παραπάνω πίνακα διαπιστώνεται ότι η Ανάκτηση είναι μεταξύ 98,64-100,78% με %RSD $\leq 0,54$ γεγονός που ικανοποιεί τα κριτήρια αποδοχής.

7.2.4 ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ

Τα αποτελέσματα ελέγχου της ενδιάμεσης πιστότητας δίνονται στον πίνακα 11.

Πίνακας 11 Αποτελέσματα για τον έλεγχο της Πιστότητας

	Εμβαδόν Κορυφής στο εμβολιασμένο διάλυμα	Εμβαδόν Κορυφής στο πρότυπο διάλυμα	% Ανάκτηση	Μέσος Όρος (\pm SD)/ %RSD
Αναλυτής 1 Ημέρα 1 Όργανο 1	2557181	2549409	100,30	100,46(\pm 0,14) 0,14%
	2565479	2549801	100,61	
	2560184	2549833	100,41	
	2561343	2552510	100,35	
	2566941	2550697	100,64	
	2564157	2553229	100,43	
Αναλυτής 2	2560788	2561990	99,95	100,02(\pm 0,06) 0,06%
	2563696	2562624	100,04	
	2552019	2550198	100,07	
Όργανο 2	2548713	2559002	99,60	100,03(\pm 0,55) 0,55%
	2544576	2548611	99,84	
	2562462	2545769	100,66	
Ημέρα 2	2559009	2557116	100,07	99,81(\pm 0,33) 0,33%
	2545491	2559788	99,44	
	2551934	2554134	99,91	

Τα παραπάνω αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με ONE WAY ANOVA.

Από τον παραπάνω πίνακα και τα αποτελέσματα ANOVA διαπιστώνεται ότι η ανάκτηση είναι μεταξύ 99,44-100,66%, με Ολική Επαναληψιμότητα %RSD_r=0,29% και ενδιάμεση πιστότητα %RSD_R=0,63% δεδομένα που ικανοποιούν τα κριτήρια αποδοχής.

7.2.5 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ

Οι παράγοντες που εξετάστηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα 12.

Πίνακας 12 Παράγοντες μελέτης της Ανθεκτικότητας

		επίπεδο+	επίπεδο-
Παράγοντας Α	Ταχύτητα ροής κινητής φάσης (mLmin ⁻¹)	1,0	1,1
Παράγοντας Β	Όγκος οξικού οξέος στην κινητή φάση (V/V)	1	0,9
Παράγοντας Γ	Αναλογία ακετονιτριλίου/νερού στην κινητή φάση (V/V)	500/500	505/795

Στον πίνακα 13 ως επίπεδο (+) νοείται η ονομαστική τιμή της βελτιωμένης συνθήκης και ως (-) η “πειραγμένη” συνθήκη.

Πίνακας 13 Πειράματα για τον έλεγχο της ανθεκτικότητας

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

	Εμβαδόν Κορυφής στο εμβολιασμένο διάλυμα	Εμβαδόν Κορυφής στο πρότυπο διάλυμα	% Ανάκτηση	Μέσος Όρος (±SD)/ %RSD
Y1	2557181 2565479 2560184 2561343 2566941 2564157	2549409 2549801 2549833 2552510 2550697 2553229	100,30 100,61 100,41 100,35 100,64 100,43	100,46(±0,14) 0,14%
Y2	2431383 2430674 2431928	2439617 2437772 2439592	99,66 99,71 99,69	99,69(±0,02) 0,02%
Y3	2686501 2689020 2685643	2690920 2692242 2688016	99,84 99,88 99,91	99,88(±0,04) 0,04%
Y4	2632487 2632205 2628912	2633481 2633481 2636239	99,96 99,95 99,96	99,69(±0,01) 0,01%

Από τον παραπάνω πίνακα διαπιστώνεται ότι η Ανάκτηση είναι μεταξύ 99,66-99,91% με %RSD ≤0,04% γεγονός που υποδεικνύει ότι μικρές αποκλίσεις των παραπάνω εξεταζομένων χρωματογραφικών συνθηκών δεν επηρεάζουν σημαντικά τον προσδιορισμό του βενζουλοϋπεροξειδίου.

7.2.6 ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΜΙΑ ΗΜΕΡΑ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ 25 °C

Πίνακας 14 Πειράματα Σταθερότητας

Εμβαδόν Κορυφής στο ενισχυμένο διάλυμα	Εμβαδόν Κορυφής στο πρότυπο διάλυμα	% Ανάκτηση	Μέσος Όρος (±SD)/ RSD%
2550541	2559277	99,66	99,81(±0,17) 0,17%
2551238	2556889	99,78	
2551832	2551941	100,00	

Από τον παραπάνω πίνακα 14 επιβεβαιώνεται ότι πληρούνται τα κριτήρια αποδοχής, και τα διαλύματα του ΒΡΟ εμφανίζονται σταθερά για τουλάχιστον μία ημέρα εργασίας στους 25 °C.

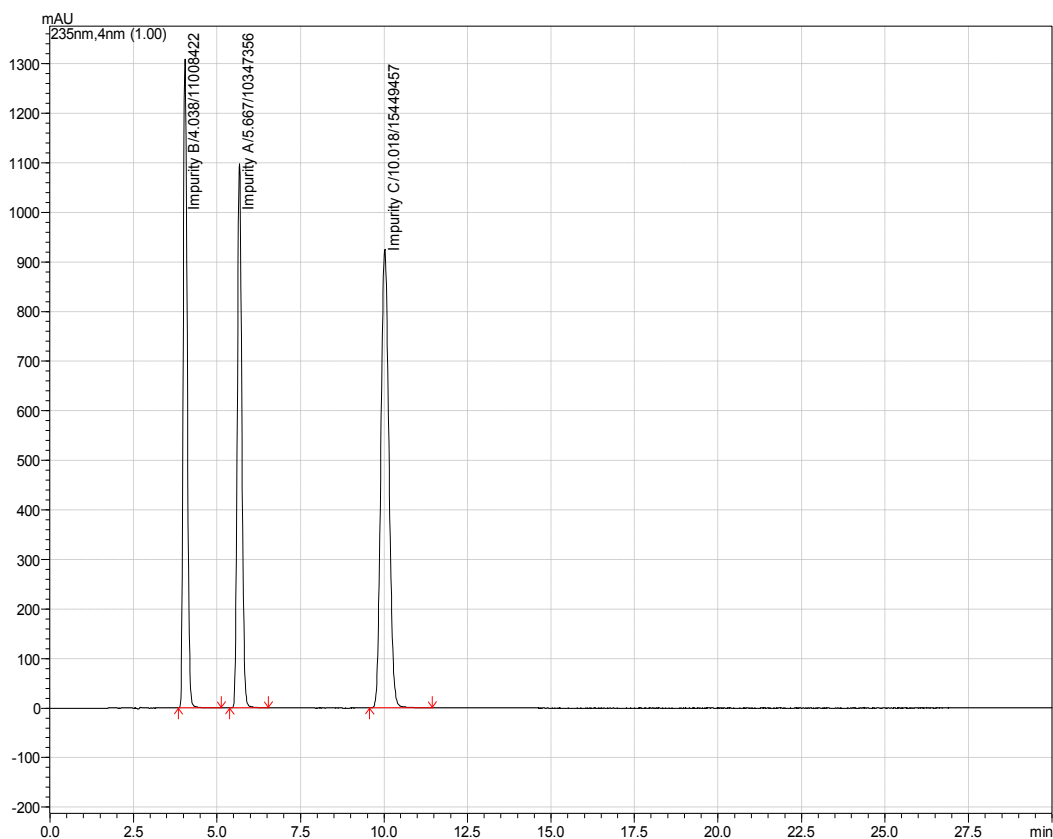
7.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ (IMPURITIES)

7.3.1 ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

α) Διάλυμα placebo: Η εξέταση των χρωματογραφημάτων για το διάλυμα "placebo" επιβεβαίωσε ότι δεν εμφανίζονται κορυφές στον χρόνο που εκλούεται το υπεροξειδίο του βενζολίου ($t_R=21,15$ min) καθώς και των προσμίξεων αυτού.

	Impurity B	Impurity A	Impurity C	ΒΡΟ
Χρόνος (min)	4,03	5,61	9,88	21,15

Στο παρακάτω σχήμα 16 δίνεται ένα τυπικό χρωματογράφημα.



Σχήμα 16 Τυπικό χρωματογράφημα μίγματος Προσμίξεων.

β) Διαχωριστικότητα μεταξύ πρόσμιξης Β και Α είναι ίση με 6,9.

γ) Η καθαρότητα κορυφής των προσμίξεων του BPO από το φάσμα UV βρέθηκε ίση με 1,00

Επομένως, όλα τα κριτήρια αποδοχής για την ειδικότητα της μεθόδου προσδιορισμού προσμίξεων ικανοποιούνται.

7.3.2 ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ

Στους πίνακες 15 - 18 δίνονται τα αποτελέσματα γραμμικότητας για τις προσμίξεις Α, Β, Γ και του BPO (που χρησιμοποιείται ως πρότυπο), αντίστοιχα.

Πίνακας 15 Αποτελέσματα γραμμικότητας Πρόσμιξης Α

Πρότυπο διάλυμα (% του διαλύματος εργασίας)	Συγκέντρωση (μg/mL)	Εμβαδόν κορυφής	Μέσος Όρος (±SD) %RSD
A 0,1	2,0	187000 187062 187027	187,03 (±0,03)×10 ³ 0,02%
B 0,5	10	923428 924548 923817	923,93 (±0,57)×10 ³ 0,06%
Γ 1,0	20	1911124 1910550 1908975	191,02 (±0,11)×10 ⁴ 0,06%
Δ 2,0	40	3846688 3844616 3846284	384,59 (±0,11)×10 ⁴ 0,03%
E 5,0	100	9408969 9414748 9406602	941,01 (±0,42)×10 ⁵ 0,04%

Έπειτα από την εφαρμογή της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων προέκυψε η εξίσωση παλινδρόμησης:

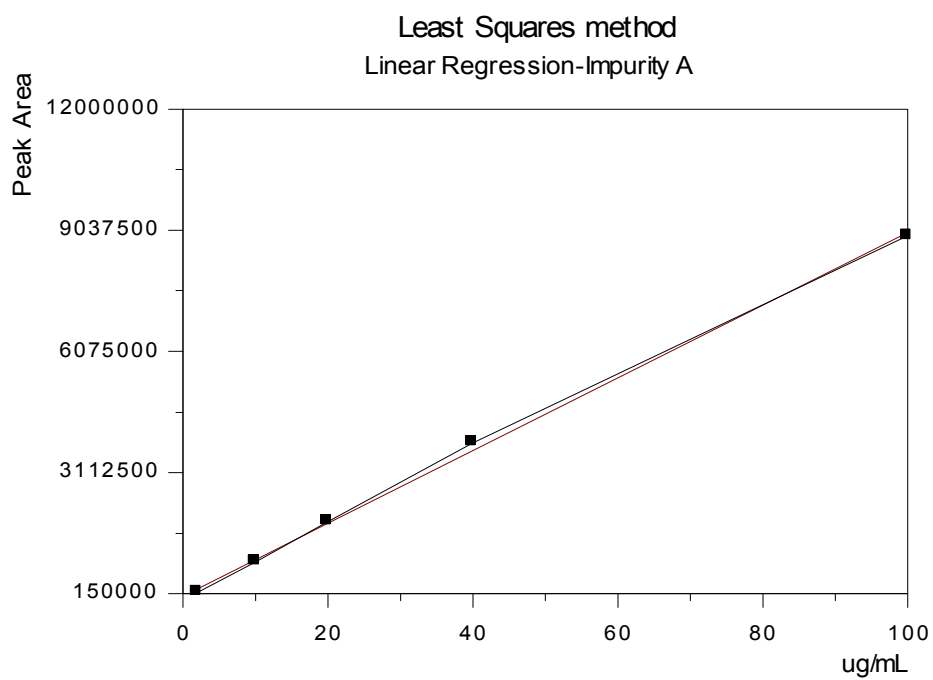
Τομή στον άξονα των Υ: $-0,99(\pm 0,86) \times 10^5$ (μονάδες εμβαδού)

Κλίση: $8,89(\pm 0,17) \times 10^4$ (μονάδες εμβαδού x mL x μg^{-1})

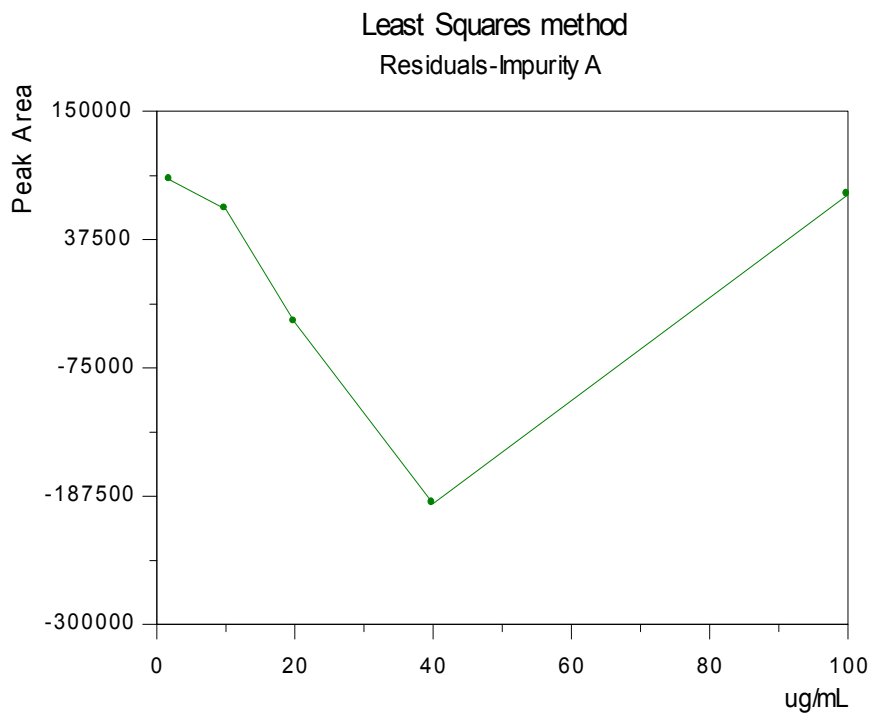
Συντελεστής συσχέτισης (r): $>0,9994$

Η γραμμή διέρχεται από την αρχή των αξόνων και επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος ποσοτικοποίησης του ενός προτύπου (BPO).

$t_{\text{πειρ}} = \text{τομή} / S_{\text{τομής}} = 1,151 < t_{\text{θεωρ}} = 3,182 [(v=5-2), 95\%]$



Σχήμα 17 Καμπύλη βαθμονόμησης προτύπων διαλυμάτων Πρόσμιξης Α



Σχήμα 18 Διάγραμμα υπολοίπων προτύπων διαλυμάτων Πρόσμιξης Α

Το εύρος της γραμμικής περιοχής καθορίστηκε σε 2,0-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, το οποίο αντιστοιχεί στο 0,05-5,0% της περιεκτικότητας κάθε πρόσμιξης. Από τα αποτελέσματα επαναληψιμότητας προκύπτει ότι η RSD συστήματος $\leq 0,14\%$.

Πίνακας 16 Αποτελέσματα Γραμμικότητας Πρόσμξης Β

Πρότυπο διάλυμα (% του διαλύματος εργασίας)	Συγκέντρωση ($\mu\text{g/mL}$)	Εμβαδόν κορυφής	Μέσος Όρος ($\pm\text{SD}$) % RSD
A 0,1	2,0	170885 170692 171141	17,09 ($\pm 0,02$) $\times 10^4$ 0,13%
B 1,0	20	1595136 1593299 1597782	159,54 ($\pm 0,22$) $\times 10^4$ 0,14%
Γ 10,0	200	12233575 12264359 12258566	122,52 ($\pm 0,16$) $\times 10^5$ 0,13%
Δ 12,5	250	15763144 15785087 15787130	157,78 ($\pm 0,13$) $\times 10^5$ 0,08%
E 15,0	300	18530483 18553872 18560980	185,48 ($\pm 0,16$) $\times 10^5$ 0,09%

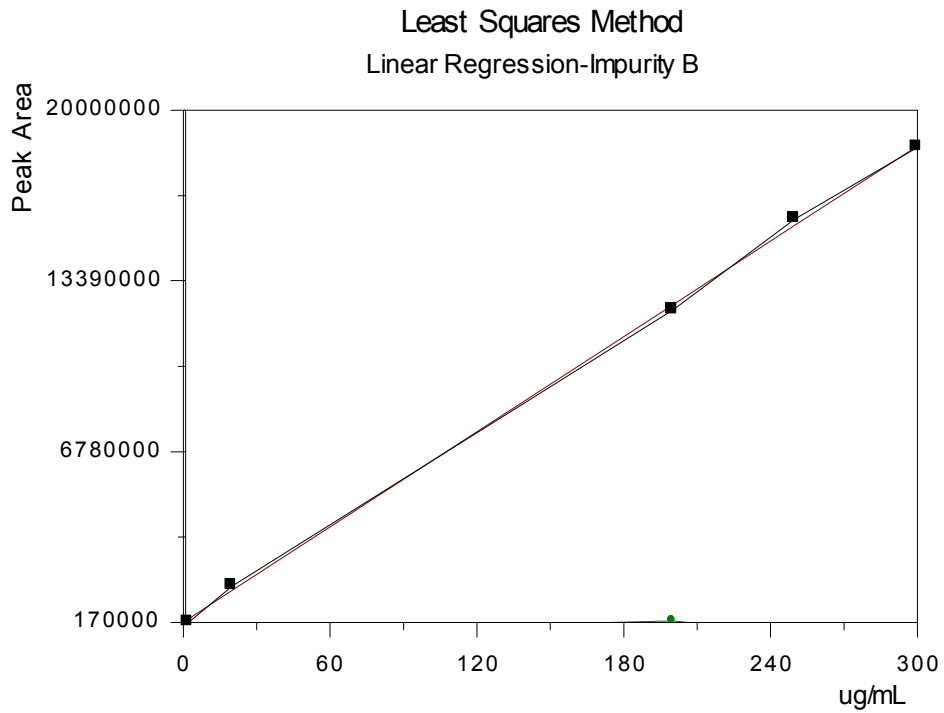
Έπειτα από την εφαρμογή της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων προέκυψε η εξίσωση παλινδρόμησης:

Τομή στον άξονα των Υ: $0,18(\pm 0,17)\times 10^5$ (μονάδες εμβαδού)

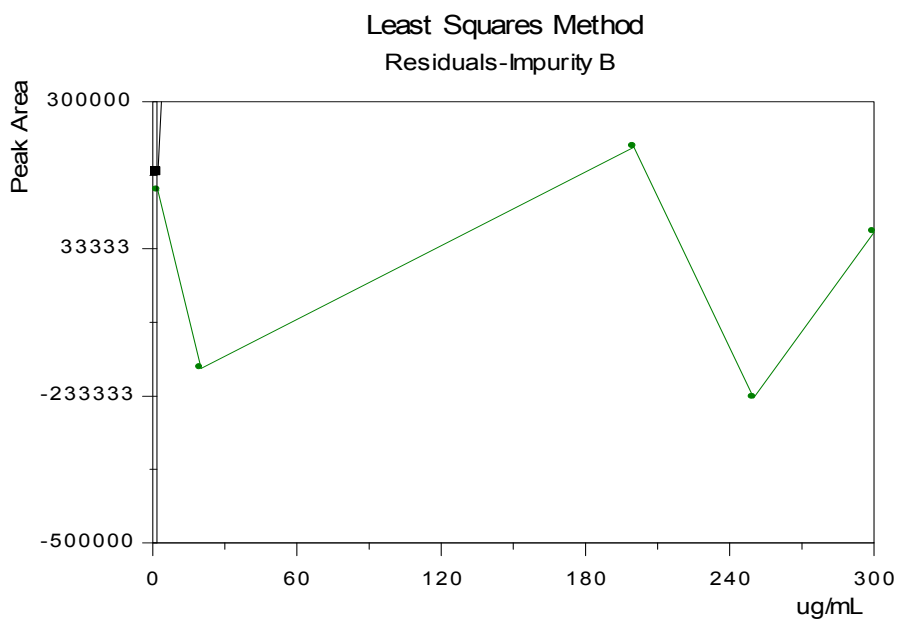
Κλίση; $61,42(\pm 0,85)\times 10^3$ (μονάδες εμβαδού $\times \text{mL} \times \mu\text{g}^{-1}$). Συντελεστής συσχέτισης (r): $>0,9997$

Η γραμμή διέρχεται από το μηδέν των αξόνων και επομένως μπορεί να εφαρμοσθεί η μέθοδος ποσοτικοποίησης του ενός προτύπου (BPO).

$$t_{\text{πειρ}} = \text{τομή} / S_{\text{τομή}} = 1,058 < t_{\text{θεωρ}} = 3,182 [(v=5-2), 95\%]$$



Σχήμα 19 Καμπύλη βαθμονόμησης προτύπων διαλυμάτων Πρόσμιξης B



Σχήμα 20 Διάγραμμα υπολοίπων προτύπων διαλυμάτων Πρόσμιξης B

Το εύρος της γραμμικής περιοχής καθορίστηκε σε 2,0-300 $\mu\text{g mL}^{-1}$, το οποίο αντιστοιχεί στο 0,05-15,0% της περιεκτικότητας κάθε πρόσμιξης. Από τα

αποτελέσματα της επαναληψιμότητας προκύπτει ότι η RSD του συστήματος $\leq 0,14\%$.

Πίνακας 17 Αποτελέσματα Γραμμικότητας Πρόσμιξης Γ

Πρότυπο διάλυμα (% του διαλύματος εργασίας)	Συγκέντρωση (μg/mL)	Εμβαδόν κορυφής	Μέσος Όρος (±SD) % RSD
A 0,1	2,0	157079 157534 156957	157,19 (±0,30)×10 ³ 0,19%
B 0,5	10	779063 779069 778536	778,89 (±0,31)×10 ³ 0,04%
Γ 1,0	20	1611170 1612625 1612343	1612 (±0,77)×10 ³ 0,05%
Δ 2,0	40	3243605 3247962 3246086	324,59 (±0,22)×10 ⁴ 0,07%
E 5,0	100	7967517 7962108 7958975	796,29 (±0,43)×10 ⁴ 0,05%

Έπειτα από την εφαρμογή της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων προέκυψε η εξίσωση παλινδρόμησης:

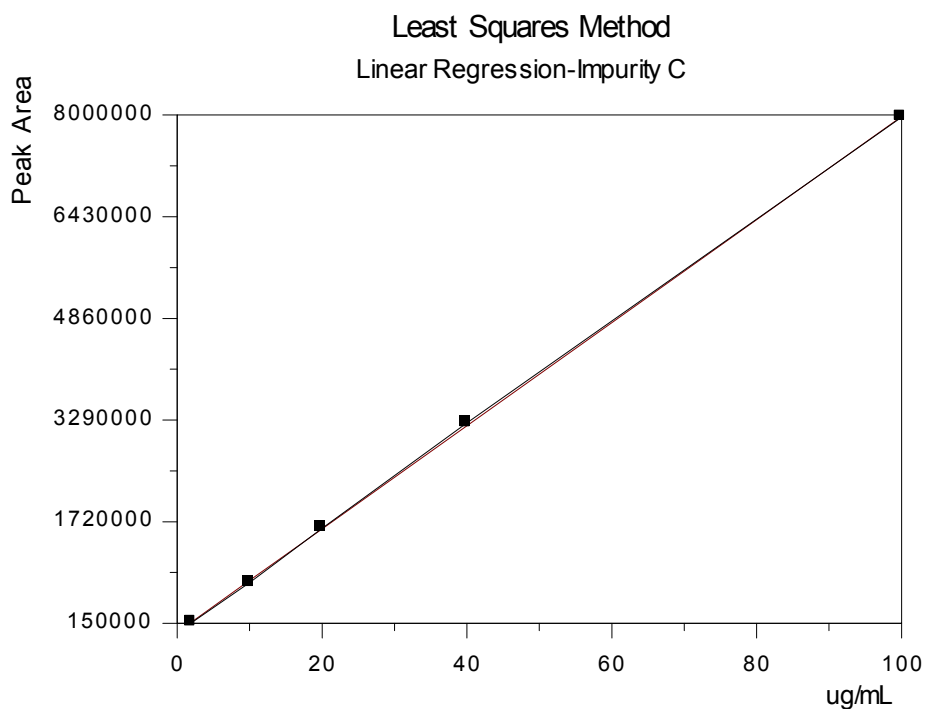
Τομή στον άξονα των Υ: $0,10(\pm 0,22) \times 10^5$ (μονάδες εμβαδού)

Κλίση; $79,71(\pm 0,44) \times 10^3$ (μονάδες εμβαδού x mL x μg^{-1})

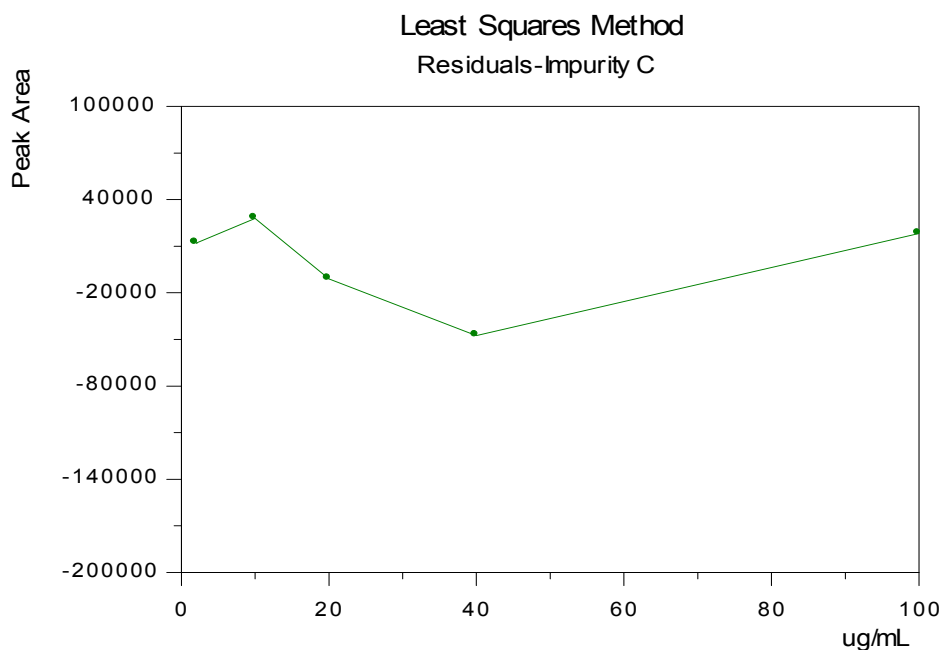
Συντελεστής συσχέτισης (r): $>0,99995$

Η γραμμή διέρχεται από το μηδέν των αξόνων και επομένως μπορεί να εφαρμοσθεί η μέθοδος ποσοτικοποίησης του ενός προτύπου (BPO).

$t_{\text{πειρ}} = \text{τομή} / S_{\text{τομή}} = 0,454 < t_{\text{θεωρ}} = 3,182 [(v=5-2), 95\%]$



Σχήμα 21 Καμπύλη βαθμονόμησης προτύπων διαλυμάτων Πρόσμιξης Γ



Σχήμα 22 Διάγραμμα υπολοίπων προτύπων διαλυμάτων Πρόσμιξης Γ

Το εύρος της γραμμικής περιοχής καθορίστηκε σε 2,0-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ το οποίο αντιστοιχεί στο 0,05-5,0% της κάθε πρόσμιξης. Από τα αποτελέσματα επαναληψιμότητας προκύπτει ότι η RSD του συστήματος $\leq 0,19\%$.

Πίνακας 18 Αποτελέσματα Γραμμικότητας BPO (χρησιμοποιείται ως πρότυπο για τις προσμίξεις).

Πρότυπο διάλυμα BPO (% του διαλύματος εργασίας)	Συγκέντρωση ($\mu\text{g/mL}$)	Εμβαδόν κορυφής	Μέσος Όρος ($\pm\text{SD}$) % RSD
A 0,1	2,0	195204 192957 195105	19,44 ($\pm 0,13$) $\times 10^4$ 0,65%
B 0,5	10	932674 930402 930616	93,12 ($\pm 0,13$) $\times 10^4$ 0,13%
Γ 1,0	20	1947338 1943289 1944443	194,50 ($\pm 0,21$) $\times 10^4$ 0,05%
Δ 2,0	40	3867156 3866180 3866313	386,66 ($\pm 0,05$) $\times 10^4$ 0,01%
E 5,0	100	9515634 9519595 9520365	951,85 ($\pm 0,25$) $\times 10^4$ 0,03%

Έπειτα από εφαρμογή της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων προέκυψε η εξίσωση παλινδρόμησης:

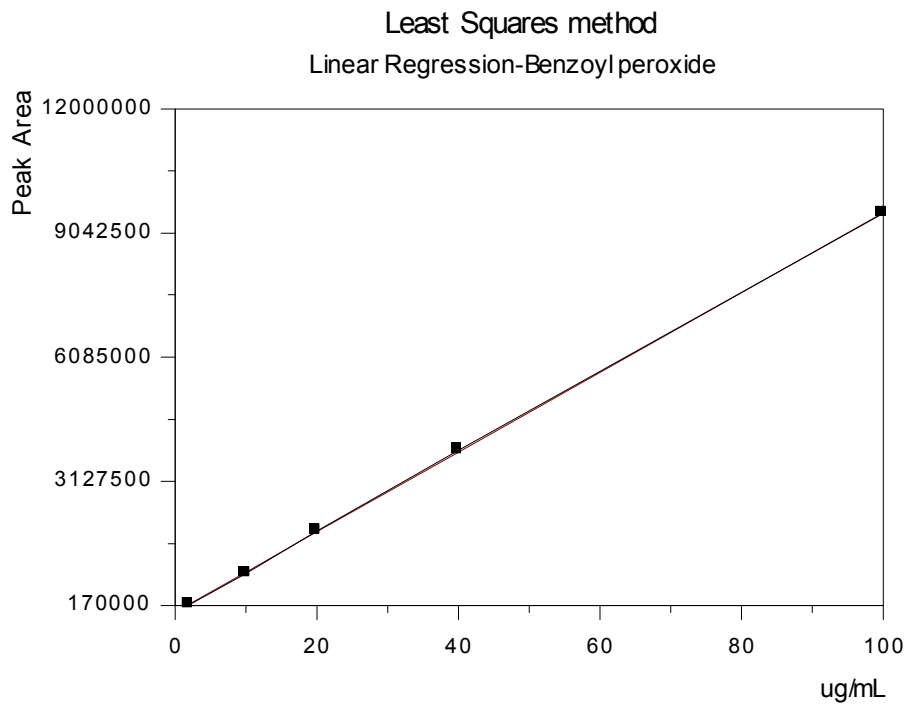
Τομή στον άξονα των Y: $0,16(\pm 0,24)\times 10^5$ (μονάδες εμβαδού)

Κλίση; $95,20(\pm 0,48)\times 10^3$ (μονάδες εμβαδού $\times \text{mL} \times \mu\text{g}^{-1}$)

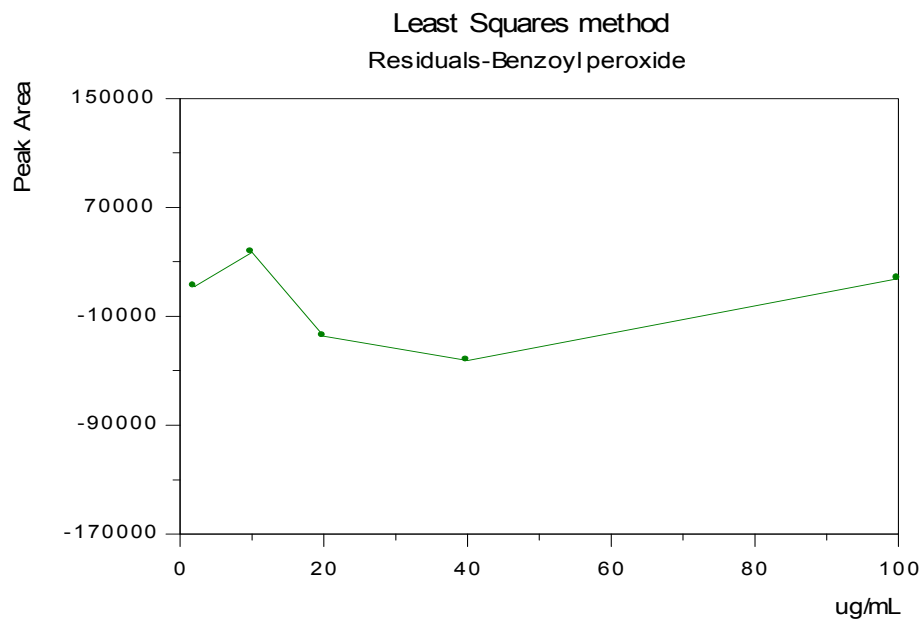
Συντελεστής συσχέτισης (r): $>0,99996$

Η γραμμή διέρχεται από το μηδέν των αξόνων και επομένως μπορεί να εφαρμοσθεί η μέθοδος ποσοτικοποίησης του ενός προτύπου (BPO).

$$t_{\text{πειρ}} = \text{τομή} / S_{\text{τομή}} = 0,666 < t_{\text{θεωρ}} = 3,182 [(v=5-2), 95\%]$$



Σχήμα 23 Καμπύλη βαθμονόμησης προτύπων διαλυμάτων BPO μεθόδου προσμίξεων



Σχήμα 24 Διάγραμμα υπολοίπων προτύπων διαλυμάτων BPO μεθόδου προσμίξεων

Το εύρος της γραμμικής περιοχής καθορίστηκε σε 2,0-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, το οποίο αντιστοιχεί στο 0,05-5,0% της περιεκτικότητας κάθε πρόσμιξης. Από τα αποτελέσματα επαναληψιμότητας προκύπτει ότι η RSD συστήματος $\leq 0,65\%$.

7.3.3 ΑΚΡΙΒΕΙΑ

Τα αποτελέσματα ακρίβειας της μεθόδου προσδιορισμού προσμίξεων παρουσιάζονται στους πίνακες 19-21.

Πίνακας 19 Αποτελέσματα Ακρίβειας Πρόσμμιξης Α

% επίπεδο εν/σης	Εμβαδόν Κορυφής Πρόσμμιξης ενισχυμένο διάλυμα	Εμβαδόν Κορυφής ΒΡΟ, διάλυμα αναφοράς	% Περιεκτικ/τα	% Ανάκτηση	Μέσος Όρος (\pm SD)/ % RSD
0,10	181144	1885906	0,10	96,05	96,42(\pm 0,54) 0,56%
	182772	1883516	0,10	97,04	
	181701	1889357	0,10	96,17	
1,0	1922592	1885906	1,00	101,95	101,23 (\pm 0,54) 0,88%
	1931135	1883516	1,01	101,51	
	1931655	1889357	1,02	100,23	
5,0	9244333	1885906	5,00	98,04	98,0 (\pm 1,2) 1,2%
	8864350	1883516	4,86	96,84	
	9240537	1889357	4,93	99,21	

Από τον παραπάνω πίνακα διαπιστώνεται ότι η Ανάκτηση είναι μεταξύ 96,05-101,95% με % RSD $\leq 1,2$ γεγονός που ικανοποιεί τα κριτήρια αποδοχής.

Πίνακας 20 Αποτελέσματα Ακρίβειας Πρόσμμιξης Β

% επίπεδο εν/σης	Εμβαδόν Κορυφής Πρόσμμιξης ενισχυμένο διάλυμα	Εμβαδόν Κορυφής ΒΡΟ, διάλυμα αναφοράς	% Περιεκτικ/τα	% Ανάκτηση	Μέσος Όρος (\pm SD)/ % RSD
0,5	669823	12382595	0,55	98,35	98,38(\pm 0,13) 0,13%
	681842	12358339	0,56	98,52	
	753033	12358432	0,62	98,28	
10,0	13161652	12382595	10,25	103,70	102,07 (\pm 1,1) 1,0%
	13196489	12358339	10,51	101,60	
	13156120	12358432	10,35	102,85	
15,0	19459984	12382595	10,25	103,46	102,91 (\pm 0,61) 0,59%
	19439780	12358339	10,51	103,01	
	19398813	12358432	10,35	102,26	

Από τον παραπάνω πίνακα διαπιστώνεται ότι η Ανάκτηση είναι μεταξύ 98,28-103,70% με % RSD $\leq 1,0$ γεγονός που ικανοποιεί τα κριτήρια αποδοχής.

Πίνακας 21 Αποτελέσματα Ακρίβειας Πρόσμιξης Γ

% επίπεδο εν/σης	Εμβαδόν Κορυφής Πρόσμιξης ενισχυμένο διάλυμα	Εμβαδόν Κορυφής BPO, διάλυμα αναφοράς	% Περιεκτικ/τα	% Ανάκτηση	Μέσος Όρος (\pm SD)/ RSD%
0,10	154733	1590162	0,10	97,31	97,33(\pm 0,05)
	154970	1591140	0,10	97,40	0,06%
	154978	1592858	0,10	97,30	
1,0	1626611	1590162	1,02	100,29	100,07 (\pm 1,6)
	1628556	1591140	1,03	99,37	1,6%
	1631505	1592858	1,00	102,43	
5,0	7840819	1590162	4,99	98,81	98,93(\pm 0,17)
	7894575	1591140	5,02	98,84	0,17%
	7847191	1592858	4,97	99,12	

Από τον παραπάνω πίνακα διαπιστώνεται ότι η Ανάκτηση είναι μεταξύ 97,31-100,29% με % RSD $\leq 1,6$ γεγονός που ικανοποιεί τα κριτήρια αποδοχής.

Υπολογισμοί RRF προσμίξεων:

Υπολογίστηκαν από τις κλίσεις καμπυλών αναφοράς προσμίξεων και του BPO.

Πρόσμιξη Α:

$$RRF_A = \text{κλίση πρόσμιξης Α} / \text{κλίση BPO} = 0,9338$$

Πρόσμιξη Β:

$$RRF_B = \text{κλίση πρόσμιξης Β} / \text{κλίση BPO} = 0,6449$$

Πρόσμιξη Γ:

$$RRF_G = \text{κλίση πρόσμιξης Γ} / \text{κλίση BPO} = 0,8373$$

Οι αντίστοιχες τιμές RRF χρησιμοποιούνται στην εξίσωση 16 για τον υπολογισμό κάθε πρόσμιξης με χρήση προτύπου BPO.

7.3.4 ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ

Τα αποτελέσματα πιστότητας της μεθόδου προσδιορισμού προσμίξεων παρουσιάζονται στους πίνακες 22-24. Τα αποτελέσματα υπέστησαν ανάλυση ONE WAY ANOVA για τον υπολογισμό της ενδιάμεσης πιστότητας.

Πίνακας 22 Αποτελέσματα Πιστότητας Πρόσμιξη Α

	Εμβαδόν Κορυφής πρόσμιξης Α στο ενισχυμένο διάλυμα	Εμβαδόν Κορυφής ΒΡΟ στο διάλυμα αναφοράς	% Ανάκτηση	Μέσος Όρος (\pm SD)/ RSD%
Αναλυτής 1 Ημέρα 1 Όργανο 1	1895414	1929199	98,25	98,57(\pm 0,16) 0,16%
	1895316	1921272	98,65	
	1895282	1920360	98,69	
	1893218	1919649	98,62	
	1893952	1920322	98,63	
	1893552	1920510	98,60	
Αναλυτής 2	1892041	1920244	98,53	98,54(\pm 0,02) 0,02%
	1893106	1920726	98,56	
	1892358	1920791	98,52	
Ημέρα 2	1892827	1921977	98,48	98,51(\pm 0,07) 0,07%
	1893620	1920833	98,58	
	1891382	1921139	98,45	
Όργανο 2	1890461	1920796	98,42	98,28(\pm 0,24) 0,25%
	1890425	1920799	98,42	
	1888642	1927190	98,00	

Από τον παραπάνω πίνακα διαπιστώνεται ότι η Ανάκτηση είναι μεταξύ 98,00-98,69% με Ολική Επαναληψιμότητα %RSD_r=0,16% και ενδιάμεση πιστότητα %RSD_R=0,27% δεδομένα που ικανοποιούν τα κριτήρια αποδοχής.

Πίνακας 23 Αποτελέσματα Πιστότητας Πρόσμιξης Β

	Εμβαδόν Κορυφής πρόσμιξης Β στο ενισχυμένο διάλυμα	Εμβαδόν Κορυφής ΒΡΟ στο διάλυμα αναφοράς	% Ανάκτηση	Μέσος Όρος (±SD)/ RSD%
Αναλυτής 1	12259404	12860300	95,33	95,50(±0,09)
Ημέρα 1	12275045	12847928	95,54	0,10%
Όργανο 1	12277846	12848411	95,56	
	12277819	12859135	95,48	
	12296007	12864443	95,58	
	12287633	12865394	95,51	
Αναλυτής 2	12280699	12874606	95,39	95,40(±0,08)
Ημέρα 2	12291679	12893532	95,33	0,08%
	12315583	12898351	95,48	
	12304570	12902610	95,36	95,36(±0,12)
Όργανο 2	12290442	12872293	95,48	0,12%
	12261230	12872831	95,25	
	12269582	12868454	95,35	95,39(±0,17)
	12287160	12855920	95,58	0,18%
	12272910	12885809	95,24	

Από τον παραπάνω πίνακα διαπιστώνεται ότι η Ανάκτηση είναι μεταξύ 95,24-95,58% με Ολική Επαναληψιμότητα %RSD_r=0,12% και ενδιάμεση πιστότητα %RSD_R=0,14% δεδομένα που ικανοποιούν τα κριτήρια αποδοχής.

Πίνακας 24 Αποτελέσματα Πιστότητας Πρόσμιξης Γ

	Εμβαδόν Κορυφής πρόσμιξης Γ στο ενισχυμένο διάλυμα	Εμβαδόν Κορυφής ΒΡΟ στο διάλυμα αναφοράς	% Ανάκτηση	Μέσος Όρος (±SD)/ RSD%
Αναλυτής 1	1599344	1623212	98,53	98,51(±0,09)
Ημέρα 1	1598419	1624094	98,42	0,09%
Όργανο 1	1599737	1622258	98,61	
	1599681	1622438	98,60	
	1598672	1623488	98,47	
	1598839	1624678	98,41	
Αναλυτής 2	1597932	1622905	98,46	98,37(±0,08)
Ημέρα 2	1596766	1623882	98,33	0,08%
	1598195	1625407	98,33	
Όργανο 2	1597902	1626556	98,24	98,38(±0,22)
	1598792	1620871	98,64	0,23%
	1595934	1624144	98,26	
Όργανο 2	1597526	1624580	98,33	98,34(±0,09)
	1597486	1625912	98,25	0,09%
	1597864	1623327	98,43	

Από τον παραπάνω πίνακα διαπιστώνεται ότι η Ανάκτηση είναι μεταξύ 98,24-98,61%, με Ολική Επαναληψιμότητα %RSD_r=0,12% και ενδιάμεση πιστότητα %RSD_R=0,17%, δεδομένα που ικανοποιούν τα κριτήρια αποδοχής.

7.3.5 ΟΡΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

Πρόσμιξη Α

$\sigma = 31$ (μονάδες εμβαδού, SD αραιότερου προτύπου 0,1 %, πίνακας 17).

$S = 88849$ (μονάδες εμβαδού x mL x μg^{-1} , κλίση καμπύλης βαθμονόμησης, πίνακας 17).

$DL = 3,3 \times \sigma/S = 0,01 \mu\text{g/mL}$, το οποίο αντιστοιχεί σε 0,00006% πρόσμιξης Α % περιεχομένου.

Πρόσμιξη Β

$\sigma = 225$ (μονάδες εμβαδού, SD αραιότερου προτύπου 0,1 %, πίνακας 18)

$S = 61418$ (μονάδες εμβαδού x mL x μg^{-1} , κλίση καμπύλης βαθμονόμησης, πίνακας 18).

$DL = 3,3 \times \sigma/S = 0,012 \mu\text{g/mL}$, το οποίο αντιστοιχεί σε 0,0006% πρόσμιξης Β % περιεχομένου.

Πρόσμιξη Γ

$\sigma = 304$ (μονάδες εμβαδού, SD αραιότερου προτύπου 0,1 %, πίνακας 19)

$S = 79711$ (μονάδες εμβαδού x mL x μg^{-1} , κλίση καμπύλης βαθμονόμησης, πίνακας 19).

$DL = 3,3 \times \sigma/S = 0,013 \mu\text{g/mL}$, το οποίο αντιστοιχεί σε 0,0006% πρόσμιξης Γ % περιεχομένου.

Άλλη πρόσμιξη

$\sigma = 1270$ (μονάδες εμβαδού, SD αραιότερου προτύπου 0,1 %, πίνακας 20)

$S = 95202$ (μονάδες εμβαδού x mL x μg^{-1} , κλίση καμπύλης βαθμονόμησης, πίνακας 20).

$DL = 3,3 \times \sigma/S = 0,044 \mu\text{g/mL}$, το οποίο αντιστοιχεί σε 0,0022% πρόσμιξης % περιεχομένου.

7.3.6 ΟΡΙΑ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ

Πρόσμιξη Α

$QL = 10 \times \sigma/S = 0,003 \mu\text{g/mL}$, το οποίο αντιστοιχεί σε 0,0002% πρόσμιξης Α % περιεχομένου.

Πρόσμιξη Β

$QL = 10 \times \sigma/S = 0,037 \mu\text{g/mL}$, το οποίο αντιστοιχεί σε 0,0018% πρόσμιξης Α % περιεχομένου.

Πρόσμιξη Γ

$QL = 10 \times \sigma/S = 0,038 \mu\text{g/mL}$, το οποίο αντιστοιχεί σε 0,0019% πρόσμιξης Α % περιεχομένου.

Βενζουλοϋπεροξειδίο – Άλλη πρόσμιξη.

$QL = 10 \times \sigma/S = 0,133 \mu\text{g/mL}$, το οποίο αντιστοιχεί σε 0,0067% πρόσμιξης % περιεχομένου.

7.3.7 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ

Ο πειραματικός σχεδιασμός της μελέτης ανθεκτικότητας της μεθόδου των προσμίξεων ήταν ακριβώς ο ίδιος με τη μέθοδο προσδιορισμού ΒΡΟ και περιγράφεται στους πίνακες 14 και 15.

Τα αποτελέσματα της μελέτης ανθεκτικότητας για τις προσμίξεις Α, Β και Γ παρουσιάζονται στους πίνακες 25, 26 και 27 αντίστοιχα.

Πίνακας 25 Αποτελέσματα Ανθεκτικότητας Πρόσμιξης Α

	Εμβαδόν Κορυφής Πρόσμιξης Α στο εμβολιασμένο διάλυμα	Εμβαδόν Κορυφής ΒΡΟ στο διάλυμα αναφοράς	% Ανάκτηση	Μέσος Όρος (±SD)/ % RSD
Y1	1895414	1929199	98,25	98,57(±0,16) 0,16%
	1895316	1921272	98,65	
	1895282	1920360	98,69	
	1893218	1919649	98,62	
	1893952	1920322	98,63	
	1893552	1920510	98,60	
Y2	2005301	1967343	101,93	101,86(±0,06) 0,06%
	1999509	1964110	101,80	
	1999962	1963469	101,86	
Y3	1829293	1796148	101,85	101,83(±0,02) 0,01%
	1829770	1796741	101,84	
	1830411	1797755	101,82	
Y4	2022407	1986252	101,82	101,90(±0,09) 0,01%
	2023541	1985992	101,89	
	2026226	1986468	102,00	

Από τον παραπάνω πίνακα διαπιστώνεται ότι η Ανάκτηση είναι μεταξύ 101,80-102,00% με % RSD ≤0,06

Πίνακας 26 Αποτελέσματα Ανθεκτικότητας Πρόσμιξης Β

	Εμβαδόν Κορυφής Πρόσμιξης Β στο εμβολιασμένο διάλυμα	Εμβαδόν Κορυφής ΒΡΟ στο διάλυμα αναφοράς	% Ανάκτηση	Μέσος Όρος (±SD)/ % RSD
Y1	12259404	12860300	95,33	95,50(±0,09) 0,10%
	12275045	12847928	95,54	
	12277846	12848411	95,56	
	12277819	12859135	95,48	
	12296007	12864443	95,58	
	12287633	12865394	95,51	
Y2	13263432	12757246	103,97	104,50(±0,47) 0,06%
	13370264	12755155	104,82	
	13400357	12796714	104,72	
Y3	12298869	11745780	104,71	104,64(±0,21) 0,20%
	12253590	11736368	104,41	
	12331366	11765688	104,81	
Y4	13567068	12990320	104,44	104,53(±0,26) 0,24%
	13564319	13000400	104,34	
	13634292	13007008	104,82	

Από τον παραπάνω πίνακα διαπιστώνεται ότι η Ανάκτηση είναι μεταξύ 103,97—104,82% με % RSD $\leq 0,24$

Πίνακας 27 Αποτελέσματα Ανθεκτικότητας Πρόσμμιξης Γ

	Εμβαδόν Κορυφής Πρόσμμιξης Γ στο εμβολιασμένο διάλυμα	Εμβαδόν Κορυφής ΒΡΟ στο διάλυμα αναφοράς	% Ανάκτηση	Μέσος Όρος (\pm SD)/ % RSD
Y1	1599344	1623212	98,53	98,51(\pm 0,09) 0,09%
	1598419	1624094	98,42	
	1599737	1622258	98,61	
	1599681	1622438	98,60	
	1598672	1623488	98,47	
	1598839	1624678	98,41	
Y2	1694953	1663399	101,90	101,95(\pm 0,07) 0,07%
	1687821	1656099	101,92	
	1690697	1657025	102,03	
Y3	1545658	1515394	102,00	102,06(\pm 0,06) 0,06%
	1546910	1514743	102,12	
	1544779	1513779	102,05	
Y4	1710365	1675439	102,08	102,30(\pm 0,19) 0,19%
	1715071	1674877	102,40	
	1712697	1672110	102,43	

Από τον παραπάνω πίνακα διαπιστώνεται ότι η Ανάκτηση είναι μεταξύ 101,90-102.43% με % RSD $\leq 0,19$. Από τα αποτελέσματα αποδεικνύεται ότι μικρές αποκλίσεις των παραπάνω εξεταζομένων χρωματογραφικών συνθηκών δεν επηρέασαν σημαντικά τον προσδιορισμό του % ποσοστού της ανακτήσεως όλων των προσμίξεων.

7.3.8 ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΜΙΑ ΗΜΕΡΑ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ 25 °C

Πίνακας 28 Αποτελέσματα Σταθερότητας Πρόσμιξης Α

Εμβαδόν Κορυφής Πρόσμιξης Α στο ενισχυμένο διάλυμα	Εμβαδόν Κορυφής Πρόσμιξης Α στο διάλυμα αναφοράς	% Ανάκτηση	Μέσος Όρος (±SD)/ RSD%
12880957	12283831	104,86	104,83(±0,02)
12881290	12288733	104,82	0,02%
12863393	12272371	104,82	

Πίνακας 29 Αποτελέσματα Σταθερότητας Πρόσμιξης Β

Εμβαδόν Κορυφής Πρόσμιξης Β στο ενισχυμένο διάλυμα	Εμβαδόν Κορυφής Πρόσμιξης Β στο διάλυμα αναφοράς	% Ανάκτηση	Μέσος Όρος (±SD)/ RSD%
1920528	1888388	101,70	101,68(±0,08)
1920289	1890323	101,59	0,08%
1921941	1888946	101,75	

Πίνακας 30 Αποτελέσματα Σταθερότητας Πρόσμιξης Γ

Εμβαδόν Κορυφής Πρόσμιξης Γ στο ενισχυμένο διάλυμα	Εμβαδόν Κορυφής Πρόσμιξης Γ στο διάλυμα αναφοράς	% Ανάκτηση	Μέσος Όρος (±SD)/ RSD%
1626817	1597629	101,83	101,81(±0,04)
1625549	1596059	101,85	0,04%
1624833	1596605	101,77	

Από τους παραπάνω πίνακες επιβεβαιώνεται ότι πληρούνται τα κριτήρια αποδοχής, τα δε διαλύματα των προσμίξεων εμφανίζονται σταθερά για τουλάχιστον μία ημέρα εργασίας στους 25 °C.

7.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ

7.4.1 ΘΕΡΜΙΚΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από την παραμονή στον κλίβανο στους 80 °C για 0, 3, 5, 7,10 ημέρες παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 31 Μελέτη θερμικής διάσπασης

Χρόνος (days)	Ποσοτικός Προσδιορισμός, (% περιεκ/τα)	Καθαρότητα κορυφής ΒΡΟ	Προσμίξεις RRT/ % περιεκτικότητα		Ολικές προσμίξεις % περιεκ/τα
0	98,6	1,00	Impurity B 0,23 0,59	3,1 0,05 0,01	3,2
3	98,8	1,00	Impurity B 0,23 0,59	3,1 0,05 0,01	3,2
5	98,8	1,00	Impurity B 0,23 0,59	3,1 0,05 0,01	3,2
7	98,5	1,00	Impurity B 0,23 0,59	3,1 0,05 0,01	3,2
10	98,6	1,00	Impurity B 0,23 0,59	3,1 0,05 0,01	3,2

7.4.2 ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΦΩΤΟΣ

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από την παραμονή σε συνθήκες τεχνητού ηλιακού φωτός για 0, 3, 5, 7, 10 ημέρες παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 32 Μελέτη επίδρασης τεχνητού φωτός

Χρόνος (days)	Ποσοτικός Προσδιορισμός, (%περιεκ/τα)	Καθαρότητα κορυφής ΒΡΟ	Προσμίξεις RRT/ % περιεκ/τα		Ολικές προσμίξεις % περιεκ/τα	
0	98,6	1,00	Impurity B	3,3	3,5	
				0,23		0,06
				0,77		0,05
3	99,1	1,00	Impurity B	3,3	3,4	
				0,23		0,06
				0,77		0,05
5	98,6	1,00	Impurity B	3,3	3,4	
				0,23		0,06
				0,77		0,05
7	98,8	1,00	Impurity B	3,3	3,4	
				0,23		0,06
				0,77		0,05
10	98,8	1,00	Impurity B	3,3	3,4	
				0,23		0,06
				0,77		0,05

7.4.3 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν έπειτα από την επίδραση υπεροξειδίου του υδρογόνου 3% για 0, 6, 12, 18 ημέρες παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 33 Μελέτη οξειδωτικής αποικοδόμησης

Χρόνος (hours)	Ποσοτικός Προσδιορισμός, (%περιεκ/τα)	Καθαρότητα κορυφής ΒΡΟ	Προσμίξεις RRT/ % περιεκ/τα	Ολικές προσμίξεις % περιεκ/τα
0	98,6	1,00	Impurity B 0,23 0,77	3,3 0,06 0,05 3.5%
6	95,1	1,00	Impurity B 0,23 0,60 0,77	6,7 0,04 0,01 0,01 6,8
12	85,1	1,00	Impurity B 0,23 0,36 0,58 0,75	15,09 0,07 0,01 0,02 0,01 15,2
18	80,1	1,00	Impurity B 0,23 0,36 0,58 0,75	20,42 0,06 0,01 0,02 0,01 20,5
24	75,2	1,00	Impurity B 0,23 0,36 0,58 0,75	24,01 0,06 0,01 0,02 0,02 24,1
48	72,1	1,00	Impurity B 0,23 0,36 0,58 0,75	28,50 0,05 0,01 0,02 0,02 28,6

7.4.4 ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΙΣΧΥΡΟΥ ΟΞΕΟΣ

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν έπειτα από την επίδραση υδροχλωρικού οξέος 1,0 Μ για 0, 3, 5, 7, 10 ημέρες παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 34 Μελέτη επίδρασης με υδροχλωρικό οξύ

Χρόνος (days)	Ποσοτικός Προσδιορισμός, (%περιεκ/τα)	Καθαρότητα κορυφής ΒΡΟ	Προσμίξεις RRT/ % περιεκ/τα		Ολικές προσμίξεις % περιεκ/τα
0	98,9	1,00	Impurity B 0,23	3,5 0,01	3,6
3	99,1	1,00	Impurity B 0,23	3,5 0,01	3,6
5	99,1	1,00	Impurity B 0,23	3,5 0,01	3,6
7	98,8	1,00	Impurity B 0,23	3,5 0,01	3,6
10	99,2	1,00	Impurity B 0,23	3,5 0,01	3,6

7.4.5 ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΙΣΧΥΡΗΣ ΒΑΣΗΣ

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν έπειτα από την επίδραση καυστικού νατρίου 1,0 M για 0, 1,2, 3, 4, 5 ημέρες παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 35 Μελέτη διάσπασης με καυστικό νάτριο

Χρόνος (days)	Ποσοτικός Προσδιορισμός, (%περιεκ/τα)	Καθαρότητα κορυφής ΒΡΟ	Προσμίξεις RRT/ % περιεκ/τα		Ολικές προσμίξεις % περιεκ/τα
0	98,6	1,00	Impurity B 0,23 0,77	3,3 0,06 0,05	3,5
1	95,7	1,00	Impurity B 0,23 0,29 0,30 0,38 0,59 0,76	5,1 0,05 0,02 0,01 0,02 0,01 0,01	5,2
2	93,1	1,00	Impurity B 0,23 0,29	8,4 0,05 0,05	8,6

			0,31 0,38 0,40 0,59 0,77 0,93	0,01 0,05 0,01 0,01 0,03 0,01	
3	91,4	1,00	Impurity B 0,23 0,29 0,31 0,38 0,40 0,59 0,76 0,93	9,7 0,05 0,06 0,01 0,06 0,01 0,01 0,04 0,01	9,9
4	90,2	1,00	Impurity B 0,23 0,29 0,31 0,38 0,40 0,59 0,76 0,93	10,9 0,06 0,08 0,01 0,08 0,01 0,01 0,05 0,01	11,2
5	88,1	1,00	Impurity B 0,23 0,29 0,31 0,35 0,38 0,40 0,57 0,59 0,76 0,93	12,7 0,12 0,21 0,03 0,01 0,22 0,04 0,01 0,01 0,13 0,04	13,5

7.4.6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΠΟΡΕΙΩΝ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ

Σε όλα τα “στρεσαρισμένα” δείγματα η καθαρότητα της χρωματογραφικής κορυφής του βενζοϋλοϋπεροξειδίου βρέθηκε ίση με 1,00 επιβεβαιώνοντας την ειδικότητα των αναλυτικών μεθόδων. Επιπλέον από τον ποσοτικό προσδιορισμό επιβεβαιώθηκε με την ταυτόχρονη αύξηση του ποσοστού των διασπώμενων προσμίξεων η μείωση της δραστηκής.

Στη θερμική διάσπαση δεν παρουσιάστηκε κάποια αποικοδόμηση κατά την πορεία μελέτης εξαναγκασμένων συνθηκών.

Κατά τη φωτόλυση επίσης καμία αποικοδόμηση δεν παρουσιάστηκε κατά τη διάρκεια της πορείας μελέτης εξαναγκασμένων συνθηκών.

Κατά την οξειδωτική αποικοδόμηση παρουσιάστηκε σημαντική διάσπαση, με κύριο προϊόν αποικοδόμησης την πρόσμιξη Β.

Κατά την πορεία της επίδρασης ισχυρού οξέος δεν παρατηρήθηκε κάποια διάσπαση.

Τέλος κατά την επίδραση ισχυρής βάσης παρουσιάστηκε σημαντική διάσπαση με κύριο προϊόν την πρόσμιξη Β.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- 1) ΕΦΗΜΕΡΙΣ ΤΗΣ ΚΥΒΕΡΝΗΣΕΩΣ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑΣ ΤΕΥΧΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ Αρ. Φύλλου 135 29 Ιανουαρίου 2009
- 2) <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2001:311:0067:0128:EL:PDF> τελευταία επίσκεψη 05.03.12 18:44
- 3) ΕΦΗΜΕΡΙΣ ΤΗΣ ΚΥΒΕΡΝΗΣΕΩΣ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑΣ ΤΕΥΧΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ Αρ. Φύλλου 135 29 Ιανουαρίου 2009
- 4) Κουππάρης Μ., “ Έλεγχος Ποιότητας Φαρμάκων”, Διαπανεπιστημιακό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών, Χημική Ανάλυση – Έλεγχος Ποιότητας, Αθήνα 2008.
- 5) A.Braithwaite and F.J.Smith Chromatographic Methods Fifth Edition Kluwer Academic Publishers
- 6) Αρχοντακη Ελένη Εισαγωγή στις Χρωματογραφικές Τεχνικές
- 7) HPLC FOR PHARMACEUTICAL SCIENTISTS Edited by Yuri Kazakevich Rosario Lobrutto Copyright c 2007 by John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.
- 8) Introduction to modern liquid chromatography / Lloyd R. Snyder, Joseph J. Kirkland. – 3rd ed. / John W. Dolan. Copyright 2010 by John Wiley & Sons, Inc.
- 9) Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης (μετάφραση) Πέμπτη Έκδοση, Εκδόσεις Κωσταράκης 2002 ISBN 960-8278-01-5
- 10) HPLC A Practical User’s Guide SECOND EDITION Marvin C. McMaster
- 11) MODERN ANALYTICAL CHEMISTRY Copyright © 2000 by The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved. David Harvey DePauw University
- 12) Sandor Gorog Trends in Analytical Chemistry, Vol. 26, No. 1, 2007
- 13) Conclusions and Future Trends Edited by Danilo Corradini Consulting Editor Terry M. Phillips. Handbook of HPLC Second Edition
- 14) W.M.A. Niessen Journal of Chromatography A, **1000** (2003) 413–436
- 15) James N Kyranos*, Hong Cait, Darren Weit and Wolfgang K Goetzinger Current Opinion in Biotechnology 2001, 12:105–111

- 16) *Review* Adaptation of High-Throughput Screening in Drug Discovery—Toxicological Screening Tests Paweł Szymański, Magdalena Markowicz * and Elżbieta Mikiciuk-Olasik *Int. J. Mol. Sci.* 2012, **13**, 427-452; doi:10.3390/ijms13010427
- 17) Jeremy R Kenseth_ and Shelley J Coldiron *Current Opinion in Chemical Biology* 2004, 8:418–423
- 18) Mark A. Strege *Journal of Chromatography B*, **725** (1999) 67–78
- 19) <http://www.chem.uoa.gr/vocabulary/Vocabularyview.asp?key=benzoyl+peroxide> τελ επισκ 11/03/12
- 20) http://www.who.int/selection_medicines/committees/subcommittee/2/expert/Dermatologic_Reviewer2.pdf τελ επισκ 02/09/12
- 21) http://www.who.int/selection_medicines/committees/expert/17/second_children_list_en.pdf τελ επισκ 31/8/12
- 22) <http://translate.google.com/translate?hl=el&langpair=en%7Cel&u=http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jecfa/cta/63/Benzoylperoxide.pdf>
τελ. Επισκ.31/8/12
- 23) <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol71/mono71-13.pdf> τελ επισκ 11/03/12
- 24) <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@rn+94-36-0> τελ επισκ.1/9/12
- 25) A. Sahut, S. Aiache, G. Andermanno, G. De Burlets: and J.-M. AIACHE. *International Journal of Cosmetic Science* **7**, (1985) 61-69
- 26) M. Jelvehgari, M.R. Siah-Shadbad, S. Azarmi, Gary P. Martin, Ali Nokhodchi *International Journal of Pharmaceutics* **308** (2006) 124–132
- 27) Vermeulen, J.P. Remon, H. Nelis *International Journal of Pharmaceutics* **178** (1999) 137–141 B.
- 28) <http://eof1.eof.gr/Syntagologio/Chapter13.htm#135> τελ επισκ 11/3 16;04
- 29) *Journal of the American Academy of Dermatology* Volume 57, Issue 5, November 2007, Pages 791–799 Nacht S, Yeung D, Beasley JN Jr, Anjo MD, Maibach HI. *J Am Acad Dermatol.* 1981 Jan;**4**(1):31-7.

- 30) Stefan U Weber , Jens J Thiele, Nancy Han, Chate Luu Giuseppe Valacchi, Stefanie Weber, Lester Packer Free Radical Biology and Medicine Volume 34, Issue 2, 15 January 2003, Pages 170–176
- 31) <http://17lykthess.thess.sch.gr/files/antonakou/files/foodadditives/flavoring.htm> last 11/3 15:08
- 32) F. W. Burton, R. R. Gadde, and W. L. Mckenzie” 14213. Journal of Pharmaceutical Sciences Vol. 68, No. 3, March 1979
- 33) N. Gaddipati”, F. Volpe, and G. Anthony Quantitative Determination of Benzoyl Peroxide by High-Performance Liquid Chromatography and Comparison to the Iodometric Method, Journal of Pharmaceutical sciences Vol 72, No. 12 (1983).
- 34) Yukiko Abe-Onishi, Chikako Yomota Naoki Sugimoto, Hiroki Kubota, Kenichi Tanamoto Journal of Chromatography A, **1040** (2004) 209–214
- 35) Dehouck P ., Journal of Chromatography B., **794** (2003) 293-302
- 36) Chellquist E. M., Gorman W. G. Pharmaceutical Research Vol 9, No 10, 1992
- 37) Wang Q., Shi W., Hou C., Journal of Food Processing and Preservation, **34** (2010) 414-424
- 38) Mu G., Liu H., Gao Y., Luan F., J Sci Food Agric 2012; **92**: 960-964
- 39) Hongo T., Hikage S., Sato A., Dental Materials Journal **25** (2) : 298-302, 2006
- 40) Saiz A.I., Manrique G.D., Fritz R., J. Agric. Food Chem. 2001, **49**, 98-102
- 41) Onishi Y., Yomota C., Sugimoto N., Kubota H., Tanamoto., Journal of Chrom.,A, **1040** (2004) 209-214
- 42) EP Μονογραφία 01/2008:0704 corrected 7.0
- 43) Kozan, J.V.B., Silva R.P., Serrano S. H. P., Lima A. W. O., Angnes L., Biosensors and Bioelectronics, **25** (2010) 1143-1148
- 44) Sotomayor M.P.T, Dias I.L.T., Neto G.O., Kubota L.T., Analytica Chimica Acta **494** (2003) 199-205
- 45) Wei L., Zhujun Z., Liu Y., Food Chemistry **95** (2006) 693-698
- 46) Yang W.P., Zhang Z.J., Hun X., Talanta **62** (2004) 661-666
- 47) Chen W., Shi W., Analytica Chemicha Acta **708** (2011) 84-88

- 48) Κ Κουππάρης Μ., Σημειώσεις Χημειομετρίας, Διαπανεπιστημιακό Πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών, Χημική Ανάλυση – Έλεγχος Ποιότητας, Αθήνα 2008.
- 49) *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* (2005), International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland
- 50) Ref.: DIN ISO 5725-2: Accuracy (treatment and precision) of measurement methods and results; a basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method. 1994
- 51) DATA HANDLING IN SCIENCE AND TECHNOLOGY -VOLUME 12
Advisory Editors: B.G.M. Vandeginste and S.C. Rutan Methods for experimental design principles and applications for physicists and chemists
JACQUES L. GOUPY ELSEVIER1993
- 52) Design and Analysis of Experiments Volume 1 Introduction to Experimental Design 2nd Klaus Hinkelmann Oscar Kempthorne Copyright 2008 by John Wiley & Sons. Inc.
- 53) Design and Analysis of Experiments Volume 2 Advanced Experimental Design KLAUS HINKELMANN OSCAR KEMPTHORNE A JOHN WILEY & SONS, INC., PUBLICATION Copyright □ 2005 by John Wiley & Sons, Inc.
- 54) Principles and Practice of Analytical Chemistry 5th Ed. F.W. Fifield Kingston University And D. Kealey University of Surrey © 2000 by Blackwell Science Ltd.

