



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ  
ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΑΛΙΣΚΙΡΕΝΗΣ  
ΚΑΙ ΥΔΡΟΧΛΩΡΟΘΕΙΑΖΙΔΙΟΥ ΣΕ ΔΙΣΚΙΑ ΜΕ ΤΗΝ  
ΤΕΧΝΙΚΗ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ  
ΑΠΟΔΟΣΗΣ**

**ΚΑΡΒΕΛΗΣ ΔΗΜΗΤΡΗΣ  
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ  
ΑΘΗΝΑ 2013**

"Η έγκριση διατριβής ειδίκευσης από το Φαρμακευτικό Τμήμα του Πανεπιστημίου Αθηνών, δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα."

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Μιχαήλ Κουππάρης  
Αικατερίνη Αντωνιάδου-Βυζά  
Ειρήνη Παντερή (Επιβλέπουσα)

Καθηγητής  
Καθηγήτρια  
Αναπλ. Καθηγήτρια

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή ειδίκευσης εκπονήθηκε στον Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Φαρμακευτικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών για την ειδίκευση "Παραγωγή και έλεγχος Φαρμακευτικών ενώσεων", υπό την επίβλεψη και καθοδήγηση της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Ειρήνης Παντερή.

Στον κύριο Μιχαήλ Κουππάρη, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας και την κυρία Αικατερίνη Αντωνιάδου - Βυζά, Καθηγήτρια του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής εκφράζω τις θερμές ευχαριστίες μου για τις εποικοδομητικές συμβουλές τους κατά τη συγγραφή της διατριβής και για την σημαντική προσφορά τους σε όλη τη διάρκεια του σπουδών μου, η οποία συνέβαλε σημαντικά στη διαμόρφωση της επιστημονικής μου κατάρτισης.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου προς την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ειρήνη Παντερή, τόσο για την ανάθεση του θέματος και τη συνεχή καθοδήγηση κατά τη διεξαγωγή της εργασίας, όσο και για την φιλική και ανθρώπινη της στάση στο διάστημα αυτό.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### Εισαγωγή

#### Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>: Υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης

1.1	Γενικά	9
1.2	Πεδίο εφαρμογών της HPLC	11
1.3	Ιστορική αναδρομή	11
1.4	Οργανολογία	12
1.4.1	Έλεγχος ροής και συστήματα προγραμματισμού	15
1.4.2	Συστήματα έγχυσης δείγματος	15
1.5	Πλεονεκτήματα της HPLC έναντι άλλων μορφών υγροχρωματογραφίας	16
1.5.1	Στήλες HPLC	17
1.5.2	Αναλυτικές στήλες HPLC	17
1.5.3	Προστατευτικές στήλες ( pre-column)	18
1.5.4	Θερμοστάτες στήλης	18
1.5.5	Υλικά πλήρωσης χρωματογραφικών στηλών	18
1.6	Ανιχνευτές	19
1.6.1	Τύποι Ανιχνευτών	20
1.7	Είδη υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης	21

#### Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup> : Μελέτες σταθερότητας φαρμακευτικών ενώσεων με με χρωματογραφικές τεχνικές

2.1	Τι είναι η ενδεικτική μέθοδος σταθερότητας	24
2.2	Γενική επισκόπηση της πορείας ανάπτυξης μεθόδου για μελέτες σταθερότητας	25
2.3	Επιλογή της χρωματογραφικής μεθόδου	28
2.3.1	Υγροχρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως	28
2.3.2	Χειρόμορφη Χρωματογραφία	28
2.3.3	Αεριοχρωματογραφία	29
2.3.4	Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (Thin-Layer Chromatography)	30
2.3.5	Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση (CE) και τριχοειδής	

ηλεκτροχρωματογραφία (CEC)	
2.4 Ο ρόλος των μελετών σταθερότητας σε συνθήκες επιταχυνόμενης διάσπασης	31
2.5 Προετοιμασία δείγματος	33
2.6 Ανάπτυξη της μεθόδου διαχωρισμού- Επιλογή των πειραματικών συνθηκών	34
2.7 Βελτιστοποίηση του διαχωρισμού	36
2.8 Επικύρωση Μεθόδου	36
2.8.1 Παράμετροι επικύρωσης	40
2.8.2 Επικύρωση μεθόδων κατά την Αμερικανική Φαρμακοποία	41
2.8.3 Οδηγίες του διεθνούς οργανισμού εναρμόνισης (ICH) για την επικύρωση αναλυτικής μεθόδου	42
2.8.4. Ορισμοί	43

### **Κεφάλαιο 3ο: Υπέρταση- φάρμακα για τη θεραπευτική αντιμετώπιση της υπέρτασης: Rasilez HCT**

3.1 Υπέρταση	54
3.2 Θεραπευτική Αντιμετώπιση	55
3.3 Αλίσκιρένη και υδροχλωροθειαζίδη	56

### **Κεφάλαιο 4ο: Ανάπτυξη και Επικύρωση Μεθόδου Υγροχρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης για τον Ποσοτικό Προσδιορισμό της Αλίσκιρένης και του υδροχλωροθειαζιδίου**

4.1 Εισαγωγή	59
4.2 Αρχή μεθόδου	60
4.3 Εξοπλισμός-Οργανολογία	61
4.4 Αντιδραστήρια	61
4.5 Διαλύματα παρακαταθήκης και εργασίας	62
4.6 Καθορισμός των βέλτιστων χρωματογραφικών συνθηκών	63
4.6.1 Μελέτη της επίδρασης του ποσοστού του οργανικού τροποποιητή στο χρόνο συγκράτησης και τον παράγοντα χωρητικότητας	63
4.6.2 Μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου στο χρόνο συγκράτησης και τον παράγοντα χωρητικότητας	65
4.7 Βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες	67
4.8 Πορεία κατεργασίας των δισκίων	68

4.9 Καμπύλες αναφοράς – Γραμμικότητα	71
4.10 Προσδιορισμός Ορίου Ανίχνευσης και Ορίου Ποσοτικοποίησης	80
4.11 Έλεγχος ορθότητας (Accuracy) και πιστότητας (Precision)	80
4.12 Ανθεκτικότητα της μεθόδου	84
4.13 Ποσοτικός προσδιορισμός της αλίσκιρένης και του υδροχλωροθειαζιδίου σε φαρμακευτικά σκευάσματα	86
4.14 Έλεγχος της ομοιομορφίας του περιεχομένου στην ανάλυση δισκίων αλίσκιρένης-υδροχλωροθειαζιδίου	87
4.15 Μελέτες Σταθερότητας	89
4.16 Έλεγχος ειδικότητας μεθόδου προσδιορισμού	94
4.17 Συμπεράσματα και προοπτικές	97
Συμπεράσματα	99
SUMMARY	100
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	101

## **Θεωρητικό μέρος**

### **Εισαγωγή**

Στην παρούσα διατριβή ειδίκευσης αναπτύχθηκε και αξιολογήθηκε μέθοδος υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αλισκιρένης και του υδροχλωροθειαζιδίου σε δισκία.

Στο 1<sup>ο</sup> κεφάλαιο του θεωρητικού μέρους παρουσιάζονται οι βασικές αρχές και το θεωρητικό υπόβαθρο της υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Στο 2<sup>ο</sup> κεφάλαιο παρουσιάζονται οι βασικές αρχές της σταθερότητας των φαρμακευτικών ενώσεων και παρουσιάζεται ο ρόλος των μελετών σταθερότητας σε συνθήκες επιταχυνόμενης διάσπασης. Στο 3<sup>ο</sup> κεφάλαιο αναφέρονται συνοπτικά τα φαρμακολογικά στοιχεία της αλισκιρένης και της υδροχλωροθειαζιδίου.

Το πειραματικό μέρος της διατριβής περιλαμβάνει το κεφάλαιο 4 στο οποίο περιγράφεται η τεχνική που αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε με στόχο τον ποσοτικό προσδιορισμό της αλισκιρένης και του υδροχλωροθειαζιδίου σε δισκία. Αναφέρεται η οργανολογία και οι πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι μελέτες που πραγματοποιήθηκαν ώστε να διερευνηθούν οι παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκράτηση των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου (βρωμαζεπάμη) ώστε να καθοριστούν οι βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες. Ακολούθως, η μέθοδος HPLC αξιολογήθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητάς της (γραμμικότητα, ακρίβεια, επαναληψιμότητα, ανθεκτικότητα) ενώ παράλληλα καθορίστηκε το όριο ανίχνευσης και το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου. Πραγματοποιήθηκαν μελέτες σταθερότητας σε συνθήκες επιταχυνόμενης διάσπασης. Τέλος η μέθοδος εφαρμόστηκε στον έλεγχο περιεκτικότητας και στον έλεγχο ομοιομορφίας περιεχομένου σε δισκία που κυκλοφορούν στην Ελληνική αγορά και φέρουν ως δραστικά συστατικά την αλισκιρένη και το υδροχλωροθειαζίδιο.



## Κεφάλαιο 1: Υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης

### 1.1 Γενικά

Υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης<sup>1,2</sup> - High Performance Liquid Chromatography (HPLC) - αναπτύχθηκε τις τελευταίες δεκαετίες ως μία από τις πλέον αξιόπιστες αναλυτικές τεχνικές στη Φαρμακευτική Βιομηχανία, αλλά και για ερευνητικούς σκοπούς. Η σημαντική αυτή άνοδος οφείλεται στους εξής λόγους:<sup>3,4</sup>

- α) στη χρήση των ηλεκτρονικών υπολογιστών,
- β) στην αλματώδη εξέλιξη της τεχνολογίας στήλης (ελάττωση του μεγέθους των τεμαχιδίων του υλικού πλήρωσης, "πακετάρισμα" του υλικού πλήρωσης με τη χρήση υπερήχων),
- γ) στη μεγάλη ικανότητά της να ανιχνεύει δραστικές ουσίες σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις,
- δ) στη δυνατότητα της HPLC να διαχωρίζει και να προσδιορίζει ταυτόχρονα πολλές φαρμακευτικές ουσίες, εφόσον συνυπάρχουν σε κάποιο σκεύασμα. Επίσης να προσδιορίζει παραπροϊόντα (impurities) τα οποία εντοπίζονται στις αμιγείς δραστικές ουσίες προερχόμενα, είτε από τη σύνθεση ως κατάλοιπα, είτε ως προϊόντα διάσπασης των δραστικών ουσιών και τέλος
- ε) στη δυνατότητα της HPLC να προσδιορίζει μικροποσότητες (της τάξης των ng και pg) δραστικής ουσίας και των μεταβολιτών της σε βιολογικά υγρά και ιστούς.

Η σύγχρονη οργανολογία της HPLC μπορεί να δώσει αξιόπιστα αποτελέσματα, με ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Όπως όλες οι άλλες αναλυτικές τεχνικές, η HPLC εισήχθη αρχικά στην εργαστηριακή έρευνα, αλλά γρήγορα το πεδίο δράσης της επεκτάθηκε στο να συμπεριλάβει και αναλύσεις καθημερινότητας, ώστε σήμερα να χρησιμοποιείται ως μία αξιόπιστη αναλυτική διαδικασία στην καθ' ημέρα εργαστηριακή πρακτική κυρίως για ποσοτικούς προσδιορισμούς.

Σε σχέση με την κλασική χρωματογραφία διαφέρει, γιατί στην HPLC χρησιμοποιούνται υλικά πλήρωσης με τεμαχίδια μικρού μεγέθους και κατά συνέπεια εφαρμόζονται μεγάλες πιέσεις. Υπερτερεί δε της κλασικής χρωματογραφίας επιτυγχάνοντας ταχύτερους και καλύτερης απόδοσης διαχωρισμούς μιγμάτων<sup>5</sup>.

Ο σχεδιασμός για έναν επιτυχή διαχωρισμό με HPLC στηρίζεται στη σωστή επιλογή της κατάλληλης κινητής φάσης για συγκεκριμένη στήλη και δείγμα. Πρέπει επίσης να συνυπολογισθούν πολλές και διαφορετικές ιδιότητες ενός διαλύτη και κυρίως η ιονική ισχύς και η εκλεκτικότητά του.

Η HPLC ανήκει στη χρωματογραφία στήλης που βεβαίως ο διαχωρισμός είναι αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης μιας στατικής και μιας κινητής φάσης. Το δείγμα εφαρμόζεται στην κορυφή της στήλης και με τη βοήθεια της κινητής φάσης τα συστατικά του μετακινούνται με τη μορφή ζωνών κατά μήκος της στήλης και τελικά εκλούνται διαδοχικά. Οι υπό προσδιορισμό ουσίες κατανέμονται ή προσροφώνται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης κι αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της στήλης. Στην HPLC συνήθως χρησιμοποιείται μίγμα διαλυτών ή και βαθμιαία μεταβολή της σύστασης της κινητής φάσης<sup>6</sup>. Ο χρόνος ανάλυσης είναι της τάξης των μερικών λεπτών, ενώ η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων είναι πλήρως αποδεκτές<sup>7</sup>.

Αρχικά, η HPLC πραγματοποιείτο με υάλινες στήλες διαμέτρου 1 έως 5 cm και μήκους 50 έως και 500 cm. Για την επίτευξη ρεαλιστικής ταχύτητας ροής, η διάμετρος των σωματιδίων της στερεάς φάσης ήταν συνήθως 150 έως 250 μm. Ακόμη και έτσι οι ταχύτητες ροής ήταν μικρές, της τάξης των μερικών δεκάτων του χιλιοστόλιτρου ανά λεπτό. Συνεπώς, οι χρόνοι διαχωρισμού ήταν μεγάλοι και συχνά έφθαναν τις μερικές ώρες. Απόπειρες επιτάχυνσης με εφαρμογή κενού ή με άντληση, δεν ήταν αποτελεσματικές, επειδή αυξήσεις στην ταχύτητα ροής προκαλούσαν αύξηση των υψών των θεωρητικών πλακών μακριά από το ελάχιστο, που εμφανίζεται στην τυπική καμπύλη ύψους πλάκας-ταχύτητας-ροής. Το αποτέλεσμα αυτών ήταν οι ελαττωμένες αποδόσεις<sup>8</sup>.

Γρήγορα, κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της HPLC, οι επιστήμονες κατάλαβαν ότι σημαντική βελτίωση στην απόδοση της στήλης θα μπορούσε να επιτευχθεί

με ελάττωση του μεγέθους των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης της στήλης. Στο τέλος της δεκαετίας του 1960 αναπτύχθηκε η τεχνολογία παραγωγής και χρήσης πληρωτικών υλικών με σωματίδια διαμέτρου 3 έως και 10  $\mu\text{m}^2$ . Η τεχνολογία απαιτούσε εξελιγμένα όργανα, με δυνατότητα λειτουργίας σε υψηλές πιέσεις, κάτι που ήταν αδύνατο να επιτευχθεί με τις απλές υάλινες στήλες της κλασικής υγρής χρωματογραφίας με βαρυτική ροή. Η ονομασία Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) χρησιμοποιείται για να διακρίνει αυτές τις νεότερες τεχνικές από τις παλαιότερες, που ακόμη χρησιμοποιούνται για παρασκευαστικούς σκοπούς<sup>10</sup>.

## **1.2 Πεδίο εφαρμογών της HPLC**

Η HPLC είναι η πιο διαδεδομένη απ' όλες τις αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού, με ετήσιες πωλήσεις σε όργανα HPLC που φθάνουν τα δισεκατομμύρια δολάρια. 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.

Παραδείγματα αποτελούν τα αμινοξέα, οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα, οι υδρογονάνθρακες, τα φάρμακα, τα τερπενοειδή, τα φυτοφάρμακα, τα αντιβιοτικά, τα στεροειδή, οι οργανομεταλλικές ενώσεις και μια ποικιλία ανόργανων ουσιών.

Για ιοντικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους χρησιμοποιείται ευρέως η χρωματογραφία ιοντανταλλαγής. Επιπλέον, η παραλλαγή αυτή της υγρής χρωματογραφίας χρησιμοποιείται συχνά για διαχωρισμούς ενώσεων, που ανήκουν στην ίδια ομόλογη σειρά. Η χρωματογραφία προσρόφησης συχνά επιλέγεται για διαχωρισμό μη-πολικών ενώσεων, ισομερών και κατηγορίες ενώσεων, όπως είναι οι αλειφατικοί υδρογονάνθρακες από αλειφατικές αλκοόλες<sup>11</sup>.

## **1.3 Ιστορική αναδρομή**

Το 1941 οι Martin και Synge περιέγραψαν τις αρχές της υγρής-υγρής χρωματογραφίας

κατανομής και στην ίδια εργασία βρίσκονταν τα θεμέλια της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Στην εργασία αυτή γίνεται λόγος για το “ύψος” κάποιων θεωρητικών στοιβάδων εντός της στήλης που είναι ισοδύναμες με μία “θεωρητική πλάκα”. Αυτή η παράμετρος έχει υιοθετηθεί σήμερα ως μέτρο της χρωματογραφικής ικανότητας της στήλης.

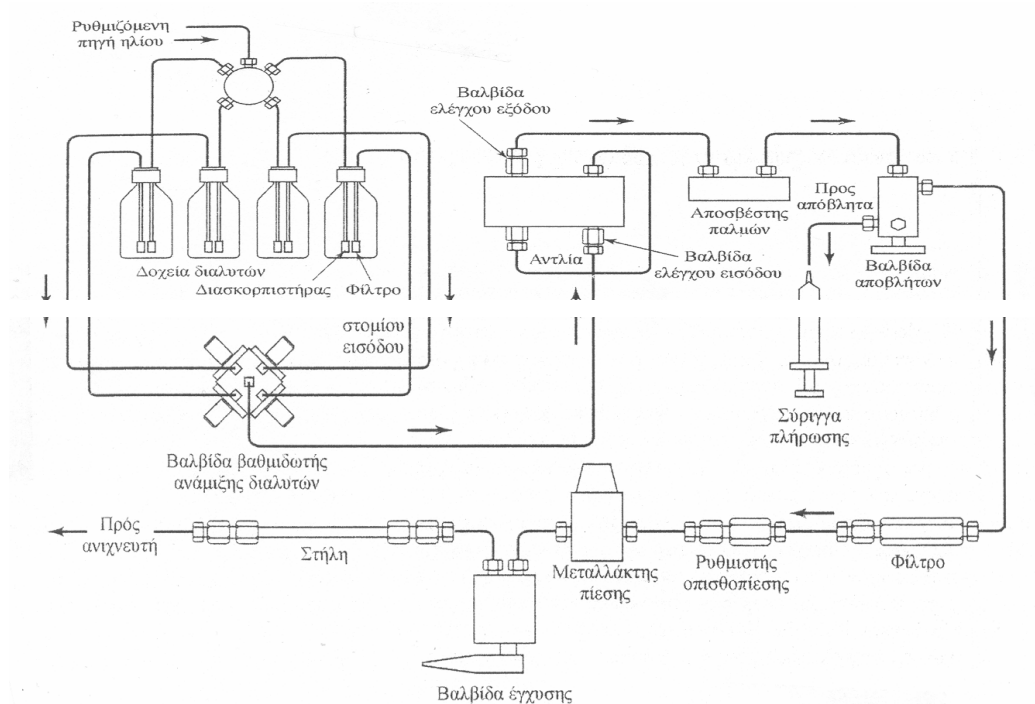
Επίσης φαίνεται, ότι η αυξημένη απόδοση της στήλης μπορούσε να επιτευχθεί με τη χρήση τεμαχιδίων στατικής φάσης μικρότερου μεγέθους. Είναι ωστόσο παραδεκτό, ότι η ανάπτυξη της HPLC άρχισε τη δεκαετία του 1960<sup>12</sup> και μεταξύ 1967-1969, οι Kirkland,<sup>13</sup> Huber<sup>14</sup> και Horvath, Presis και Lipsky,<sup>15</sup> περιέγραψαν την πρώτη χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, όπως τουλάχιστον χρησιμοποιείται σήμερα.

Η HPLC είναι μία μέθοδος ανάλογη της αερίου χρωματογραφίας, όπου η στατική φάση

αποτελείται από κάποια στερεή ή υγρή επιφάνεια υπό τη μορφή πορώδους υλικού, πακεταρισμένου σε μεταλλική στήλη, όπου η υγρή κινητή φάση μετακινείται επειδή ασκείται πίεση.

#### **1.4 Οργανολογία**

Για να αναπτυχθούν ικανοποιητικές ταχύτητες ροής του υγρού έκλουσης όταν χρησιμοποιούνται υλικά πλήρωσης αποτελούμενα από σωματίδια μεγέθους 2 έως και 10  $\mu\text{m}$ , που είναι συνηθισμένα στη σύγχρονη HPLC, οι απαιτούμενες πιέσεις από τις αντλίες φθάνουν τις μερικές χιλιάδες  $\text{psi}$  (  $\text{pounds per square inch}$ ,  $1 \text{ atm} = 14,696 \text{ psi}$ ). Ως συνέπεια αυτών των υψηλών πιέσεων, η οργανολογία της HPLC είναι πολυπλοκότερη, με υψηλό κόστος, σε σύγκριση με την οργανολογία άλλων ειδών χρωματογραφίας. Στο Σχήμα 1.1 παρουσιάζονται τα σημαντικότερα τμήματα από τα οποία αποτελείται μια διάταξη HPLC<sup>16,17</sup>.



**Σχήμα 1.1:** Σχηματική παράσταση μιας διάταξης HPLC.

Ένα σύγχρονο σύστημα HPLC είναι εφοδιασμένο με ένα ή περισσότερα υάλινα ή ανοξείδωτα δοχεία, καθένα από τα οποία περιέχει 200 έως 1000 mL διαλύτη. Τα δοχεία είναι συχνά εφοδιασμένα με μέσα απομάκρυνσης των διαλυμένων αερίων, συνήθως οξυγόνου και αζώτου, που παρεμποδίζουν το σχηματισμό φυσαλίδων στη στήλη και στον ανιχνευτή των συστημάτων. Οι φυσαλίδες αυτές προκαλούν διεύρυνση των κορυφών. Επιπλέον, εμποδίζουν συχνά τη σωστή λειτουργία του ανιχνευτή. Οι απαερωτές μπορεί να αποτελούνται από ένα σύστημα άντλησης κενού, ένα σύστημα απόσταξης, διατάξεις που θερμαίνουν και αναδεύουν τους διαλύτες ή (όπως φαίνεται στο Σχήμα 2) από συστήματα εισαγωγής μικρών φυσαλίδων αδρανούς αερίου χαμηλής διαλυτότητας. Συχνά τα συστήματα αυτά περιλαμβάνουν φίλτρα απομάκρυνσης σκόνης και αιωρούμενων σωματιδίων από τους διαλύτες για να προληφθούν πιθανές βλάβες στις αντλίες ή στα συστήματα έγχυσης, όπως και η έμφραξη της στήλης. Όπως δείχνεται στο Σχήμα 2, δεν είναι αναγκαίο οι απαερωτές και τα φίλτρα να είναι ενσωματωμένα τμήματα ενός συστήματος HPLC. Για παράδειγμα, ένας απλός τρόπος επεξεργασίας διαλυτών, πριν την εισαγωγή τους στο δοχείο, είναι η διήθησή τους μέσω μικροπορώδους

φίλτρου (millipore filter) με εφαρμογή κενού. Η επεξεργασία αυτή απομακρύνει αέρια και αιωρούμενα σωματίδια.<sup>18</sup>

Ο διαχωρισμός στον οποίο χρησιμοποιείται ένας διαλύτης σταθερής σύστασης καλείται ισοκρατική έκλουση (isocratic elution). Συχνά, η απόδοση διαχωρισμού ενισχύεται σημαντικά με τη βαθμιδωτή έκλουση (gradient elution). Εδώ χρησιμοποιούνται δύο ή τρία συστήματα διαλυτών, που διαφέρουν σημαντικά ως προς την πολικότητα. Αφού αρχίσει η έκλουση, ο λόγος των διαλυτών μεταβάλλεται με τρόπο προγραμματισμένο άλλες φορές συνεχώς και άλλες με μια σειρά βημάτων. Τα σύγχρονα συστήματα HPLC συχνά είναι εφοδιασμένα με διατάξεις, οι οποίες εισάγουν διαλύτες από δύο ή περισσότερα δοχεία σε θάλαμο ανάμιξης με ρυθμούς που μεταβάλλονται συνεχώς. Ο λόγος των όγκων των διαλυτών μπορεί να μεταβάλλεται ως προς το χρόνο γραμμικά ή λογαριθμικά.

Όταν η στατική φάση είναι πιο πολική από την κινητή φάση, αυτή η μορφή της HPLC ονομάζεται κανονικής φάσεως χρωματογραφία. Σ' αυτή την περίπτωση, η στατική φάση έχει προσροφητικές ιδιότητες. Συνήθη υλικά πληρώσεως της στήλης περιλαμβάνουν τη silica και διάφορες πολικές δεσμευμένες φάσεις (κύανο-, διολο-, αμινο-). Στην HPLC κανονικής φάσης, οι αλληλεπιδράσεις διαλύτη-δείγματος είναι σχετικά ισχυρές.<sup>19</sup> Αυτή η μέθοδος HPLC χρησιμοποιείται συνήθως για το διαχωρισμό συστατικών διαλυτών σε οργανικούς διαλύτες και για το διαχωρισμό ισομερών. Η κινητή φάση συνίσταται από μη πολικούς διαλύτες, όπως εξάνιο ή 1,1,2-τριφθορο,1,1,2-τριχλωροαιθάνιο (freon). Τροποποιητές, όπως το μεθυλοχλωρίδιο ή ο μέθυλο-t-βουτυλαιθέρας, προστίθενται συχνά.

Τα συστήματα HPLC αντιστρόφου φάσεως, εισήχθησαν από τους Howard και Martin<sup>20</sup> το 1950, χρησιμοποιώντας μη πολική στατική φάση, σε συνδυασμό με πολική κινητή φάση. Χαρακτηρίζονται από ισχυρές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στην πολική κινητή φάση και τα μόρια του δείγματος. Αντίθετα, η αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων του δείγματος και της μη πολικής στατικής φάσης, είναι ασθενής. Αυτό υποδεικνύει, ότι οι αλληλεπιδράσεις, συνήθως μεταξύ δείγματος και διαλύτη, είναι αυτές που καθορίζουν τη σχετική κατακράτηση και το διαχωρισμό στα συστήματα HPLC αντιστρόφου φάσεως. Οι πιο συνηθισμένες αντίστροφες φάσεις είναι οι δεκαοκτυλο-(C18), οκτυλο-(C8), φαιναιθυλο- και κυανοπροπυλο- που είναι χημικά συνδεδεμένες με οξείδιο

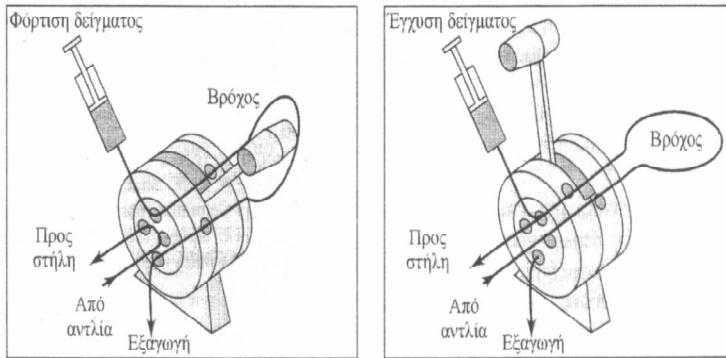
του πυριτίου. Η κινητή φάση, συνήθως συνίσταται από μεθανόλη, ακετονιτρίλιο ή τετραϋδροφουράνιο, αναμειγμένα με νερό.

#### **1.4.1 Έλεγχος ροής και συστήματα προγραμματισμού**

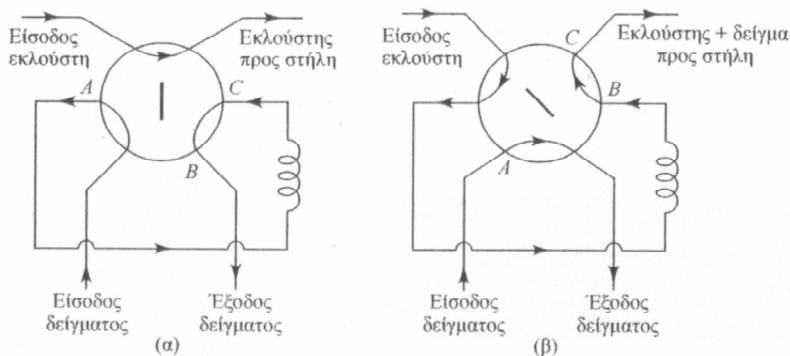
Πολλά εμπορικά όργανα είναι εφοδιασμένα με συσκευές ελεγχόμενες από υπολογιστή για τη μέτρηση της ταχύτητας ροής, η οποία υπολογίζεται από την πτώση πίεσης σε έναν αναστολέα τοποθετημένο στην έξοδο της αντλίας. Κάθε παρατηρούμενη διαφορά στο σήμα από μια προκαθορισμένη τιμή χρησιμοποιείται ακολούθως για αύξηση ή μείωση της ταχύτητας του κινητήρα της αντλίας. Επίσης, τα περισσότερα όργανα διαθέτουν έναν μηχανισμό μεταβολής της σύστασης του διαλύτη κατά συνεχή ή βηματικό τρόπο. Για παράδειγμα, το όργανο του Σχήματος 2 διαθέτει μια βαλβίδα, που επιτρέπει την ανάμιξη μέχρι και τεσσάρων διαλυτών κατά ένα εκ των προτέρων προγραμματισμένο και συνεχώς μεταβαλλόμενο λόγο.<sup>21</sup>

#### **1.4.2 Συστήματα έγχυσης δείγματος**

Συχνά, ο περιοριστικός παράγοντας στην επαναληψιμότητα των μετρήσεων στην HPLC είναι ο τρόπος εισαγωγής των δειγμάτων στη στήλη. Το πρόβλημα επιδεινώνεται με τη διεύρυνση των κορυφών, που προκαλεί η υπερφόρτωση των στηλών. Συνεπώς, οι όγκοι πρέπει να είναι οι ελάχιστοι δυνατοί, από μερικές δεκάδες mL έως 500 mL. Επιπλέον, είναι σημαντικό να εισάγεται το δείγμα χωρίς να προκαλείται αποσυμπίεση του συστήματος. Ο παλαιότερος και απλός τρόπος εισαγωγής δείγματος ήταν η έγχυση με σύριγγα μέσω ενός ελαστικού διαφράγματος γνωστού ως septum. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται μικροσύριγγες σχεδιασμένες να αντέχουν σε πιέσεις μέχρι 1500 psi. Σε εγχύσεις αναχαίτισης ροής, η ροή του διαλύτη διακόπτεται στιγμιαία, απομακρύνεται ένας προσαρμογέας στην κεφαλή της στήλης και το δείγμα εγχέεται απευθείας στην κορυφή (κεφαλή) της στήλης. Μετά την επανατοποθέτηση του προσαρμογέα, το σύστημα επανέρχεται σε συνθήκες πίεσης. Το πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι η απλότητά της. Η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος εισαγωγής δείγματος στην HPLC βασίζεται σε βρόχους δειγμάτων, όπως αυτός που φαίνεται στα σχήματα 1.2 και 1.3.



**Σχήμα 1.2:** Βρόχος δειματοληψίας HPLC. Με τη χειρολαβή της βαλβίδας, όπως δείχνεται στο αριστερό σχήμα, ο βρόχος γεμίζει από τη σύριγγα και η κινητή φάση ρέει από την αντλία προς τη στήλη. Όταν η βαλβίδα τοποθετηθεί στη θέση που δείχνεται στο δεξιό σχήμα, ο βρόχος παρεμβάλλεται μεταξύ αντλίας και στήλης, οπότε η κινητή φάση μεταφέρει το δείγμα προς τη στήλη.



**Σχήμα 1.3:** Περιτροφική βαλβίδα δείγματος: α) θέση πλήρωσης του βρόχου ACB, β) εισαγωγή του δείγματος στη στήλη.

Οι διατάξεις αυτές είναι συχνά ένα αλληλένδετο τμήμα ενός υδροχρωματογράφου με βρόχους μεταβλητού όγκου από 5 έως 500  $\mu\text{L}$ . Με βρόχους αυτού του τύπου εισάγονται δείγματα σε πιέσεις μέχρι 7000  $\text{psi}$  με αποκλίσεις μικρότερες του 1%. Επίσης είναι διαθέσιμες βαλβίδες έγχυσης για μικροόγκους με βρόχους δείγματος από 0,5 έως 5  $\mu\text{L}$ .

### 1.5 Πλεονεκτήματα της HPLC έναντι άλλων μορφών υδροχρωματογραφίας

Μερικά από τα πλεονεκτήματα είναι:

- Οι στήλες της HPLC χρησιμοποιούνται πολλές φορές χωρίς την ανάγκη αναγέννησης.
- Η διαχωριστική ικανότητα τέτοιων στηλών είναι πολύ μεγαλύτερη από τις κοινές ανοικτές στήλες.
- Ο χρόνος ανάλυσης είναι μικρότερος.



δ) Η οργανολογία της HPLC αυτοματοποιείται εύκολα, επομένως είναι δυνατόν ναπραγματοποιηθεί μεγάλος αριθμός ποσοτικών αναλύσεων.

ε) Επειδή η όλη διαδικασία της ανάλυσης εξαρτάται από την οργανολογία και λιγότερο από την ικανότητα του χειριστού-αναλυτή, η επαναληψιμότητα είναι καλύτερη.

στ) Είναι δυνατή η ταυτόχρονη διεξαγωγή χρωματογραφικών αναλύσεων φαρμάκων διαφορετικής χημικής δομής.

### **1.5.1 Στήλες HPLC**

Οι στήλες της HPLC συνήθως κατασκευάζονται από σωλήνες μικρής διαμέτρου (mm) από ανοξείδωτο χάλυβα, αν και περιστασιακά χρησιμοποιούνται και παχύτοιχοι υάλινοι σωλήνες. Οι τελευταίοι χρησιμοποιούνται σε πιέσεις μικρότερες από 600 psi. Εκατοντάδες πακεταρισμένων στηλών με διαφορετικό μέγεθος και υλικό πλήρωσης είναι διαθέσιμες από διαφορετικούς κατασκευαστές.

### **1.5.2 Αναλυτικές στήλες HPLC**

Οι περισσότερες στήλες HPLC έχουν μήκος από 10 έως 30 cm. Συνήθως οι στήλες είναι ευθύγραμμες. Όταν απαιτείται επιμήκυνσή τους, αυτή επιτυγχάνεται με σύζευξη δύο ή περισσότερων στηλών σε σειρά. Περιστασιακά χρησιμοποιούνται σπειροειδείς στήλες, αν και λόγω σχήματος η αποτελεσματικότητά τους δεν είναι καλή. Η εσωτερική διάμετρος των στηλών είναι συνήθως 4 έως 10 mm και το μέγεθος σωματιδίων του υλικού πλήρωσης είναι 5 ή 10 μm.

Σήμερα, η πιο συνηθισμένη στήλη έχει μήκος 25 cm, εσωτερική διάμετρος 4,6 mm και υλικό πλήρωσης με σωματίδια μεγέθους 5 μm. Στήλες αυτού του τύπου διαθέτουν 40.000 έως 60.000 θεωρητικές πλάκες/m.

Πρόσφατα, ορισμένοι κατασκευαστές προσφέρουν στήλες HPLC, με μικρότερες διαστάσεις από αυτές που ήδη περιγράφηκαν.<sup>22</sup> Οι στήλες αυτές έχουν εσωτερικές διαμέτρους από 1 έως 4,6 mm και μέγεθος σωματιδίων υλικού πλήρωσης 3 έως 5 μm. Το μήκος τους είναι μικρό (3 έως 7,5 cm). Οι στήλες του τύπου αυτού διαθέτουν μέχρι και 100.000 πλάκες/m και προσφέρουν το πλεονέκτημα της ταχύτητας και της ελάχιστης κατανάλωσης διαλύτη. Η τελευταία ιδιότητα έχει ιδιαίτερη σημασία, επειδή οι διαλύτες υψηλής

καθαρότητας, που απαιτούνται στην HPLC είναι δαπανηροί τόσο στην αγορά όσο και στη διάθεσή τους ως εργαστηριακά απόβλητα.

### **1.5.3 Προστατευτικές στήλες (pre-column)**

Συνήθως πριν από την αναλυτική στήλη, παρεμβάλλεται μια μικρή προστατευτική στήλη<sup>23</sup> (guard column) ή προστήλη (pre-column) για να αυξήσει το χρόνο ζωής της, απομακρύνοντας όχι μόνο τα αιωρούμενα σωματίδια και τις προσμίξεις από το διαλύτη, αλλά και συστατικά του δείγματος που συνδέονται με τη στατική φάση μη αντιστρεπτά. Επιπλέον, στη χρωματογραφία υγρού-υγρού, η προστήλη προκαλεί κορεσμό της κινητής φάσης με τη στατική έτσι, ώστε να ελαχιστοποιούνται οι απώλειες του διαλύτη της αναλυτικής στήλης. Η σύσταση του υλικού της προστήλης πρέπει να είναι παρόμοια με αυτό της αναλυτικής στήλης. Ωστόσο, το μέγεθος των σωματιδίων είναι συνήθως μεγαλύτερο για να ελαχιστοποιείται η πτώση πίεσης. Όταν η προστήλη ρυπαίνεται, αναγομώνεται ή απορρίπτεται και αντικαθίσταται με νέα του ίδιου τύπου.

Επομένως, η προστήλη θυσιάζεται για την προστασία της δαπανηρότερης αναλυτικής στήλης.

### **1.5.4 Θερμοστάτες στήλης**

Σε πολλές εφαρμογές ο αυστηρός έλεγχος της θερμοκρασίας της στήλης δεν είναι αναγκαίος και οι στήλες λειτουργούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ωστόσο συχνά λαμβάνονται καλύτερα χρωματογραφήματα διατηρώντας τη θερμοκρασία της στήλης σταθερή εντός μερικών δεκάτων του βαθμού Κελσίου. Τα σύγχρονα όργανα είναι σήμερα εφοδιασμένα με θερμοστάτες, που ελέγχουν τη θερμοκρασία της στήλης στην περιοχή θερμοκρασιών δωματίου μέχρι 100 ή 150 0C με ακρίβεια μερικών δεκάτων του βαθμού. Επίσης, οι στήλες μπορεί να συνδέονται με μανδύες ύδατος τροφοδοτούμενους από υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας για τον ακριβή έλεγχο της θερμοκρασίας.

### **1.5.5 Υλικά πλήρωσης χρωματογραφικών στηλών**

Στην HPLC χρησιμοποιούνται δύο βασικοί τύποι πληρωτικών υλικών, ο πρώτος τύπος αποτελείται από σωματίδια σφαιροειδή (pellicular) και ο δεύτερος από πορώδη. Τα πρώτα αποτελούνται από σφαιρικά σωματίδια από ύαλο ή

πολυμερές με τυπικές διαμέτρους 30 έως 40  $\mu\text{m}$ . Στην επιφάνεια των σφαιριδίων αυτών αποτίθεται λεπτό πορώδες στρώμα, όπως  $\text{SiO}_2$ , αλουμίνα, συνθετική ρητίνη πολυστερινίου-διβινυλοβενζολίου ή μια ιονανταλλακτική ρητίνη. Για μερικές εφαρμογές προστίθεται ένα επιπλέον στρώμα, αποτελούμενο από μια υγρή στατική φάση, που συγκρατείται με προσρόφηση. Εναλλακτικά, τα σφαιρίδια μπορεί να υποστούν χημική επεξεργασία για να παραχθεί ένα οργανικό επιφανειακό στρώμα. Αυτό το είδος υλικού πλήρωσης χρησιμοποιείται συχνότατα για την κατασκευή προστηλών κι όχι για αναλυτικές στήλες.

Το υλικό πλήρωσης με βάση τα πορώδη σωματίδια αποτελείται από μικροσωματίδια διαμέτρου 3 έως 10  $\mu\text{m}$ . Καταβάλλεται κάθε προσπάθεια για την ελαχιστοποίηση του εύρους περιοχής μεγεθών τους. Τα σωματίδια αποτελούνται από  $\text{SiO}_2$ , αλουμίνα, συνθετικές ρητίνες πολυστερινίου-διβινυλοβενζολίου ή μια ιονανταλλακτική ρητίνη. Το  $\text{SiO}_2$  είναι το συνηθέστερο υλικό πλήρωσης στην HPLC. Τα σωματίδια του  $\text{SiO}_2$  παρασκευάζονται με συσσωμάτωση σωματιδίων  $\text{SiO}_2$  μεγέθους μικρότερου από ένα  $\mu\text{m}$  σε συνθήκες που οδηγούν στο σχηματισμό μεγαλύτερων σωματιδίων πολύ στενής περιοχής τιμών διαμέτρου. Τα σχηματιζόμενα σωματίδια συχνά καλύπτονται με λεπτά οργανικά στρώματα, που συνδέονται με την επιφάνεια με χημικό ή φυσικό τρόπο.

## **1.6 Ανιχνευτές**

Αντίθετα με την αέριο χρωματογραφία, στην υγρή χρωματογραφία δεν υπάρχουν ανιχνευτές<sup>24</sup>, που βασίζονται σε γενικές ιδιότητες της ύλης και τόσο αξιόπιστοι, όπως ο ανιχνευτής φλόγας και ο θερμικής αγωγιμότητας. Η μεγάλη πρόκληση στην ανάπτυξη της υγρής χρωματογραφίας είναι η βελτίωση των ανιχνευτών. Ο ιδανικός ανιχνευτής για την HPLC πρέπει να έχει όλες τις ιδιότητες που αναφέρονται στους ανιχνευτές της αερίου χρωματογραφίας με τη διαφορά ότι ο ανιχνευτής της HPLC δεν απαιτείται να αποκρίνεται σε τόσο μεγάλη περιοχή θερμοκρασιών. Επιπλέον, ένας ανιχνευτής HPLC πρέπει να έχει τον ελάχιστο δυνατό εσωτερικό όγκο για να περιορίζεται η διεύρυνση των κορυφών.

### 1.6.1 Τύποι ανιχνευτών

Υπάρχουν δύο βασικοί τύποι ανιχνευτών HPLC<sup>25</sup>. Αυτοί που ανταποκρίνονται σε μια βασική ιδιότητα (bulk property detectors) της κινητής φάσης, όπως ο δείκτης διάθλασης, η διηλεκτρική σταθερά ή η πυκνότητα, οι τιμές των οποίων επηρεάζονται από την παρουσία των εκλουόμενων συστατικών. Αντίθετα, υπάρχουν ανιχνευτές που αποκρίνονται σε ιδιότητα του εκλουόμενου συστατικού (solute property detectors), όπως είναι η απορρόφηση στο υπεριώδες, ο φθορισμός ή το ρεύμα διάχυσης. Την ιδιότητα αυτή δεν πρέπει να διαθέτει η κινητή φάση.

Στον Πίνακα 1 αναφέρονται οι συνηθέστεροι ανιχνευτές HPLC και μερικές από τις πιο σημαντικές ιδιότητές τους. Μια καταγραφή του 1982, από 365 δημοσιευμένες εργασίες στις οποίες η HPLC έπαιζε σημαντικό ρόλο, αποκάλυψε ότι στο 71% γινόταν χρήση ανιχνευτή απορρόφησης UV, στο 15% φθορισμού, στο 5,4% δείκτη διάθλασης, στο 4,3% γινόταν χρήση ηλεκτροχημικού ανιχνευτή και στο 4,3% χρησιμοποιήθηκαν διάφορα άλλα συστήματα μέτρησης.<sup>26</sup> Από τους ανιχνευτές απορρόφησης UV, το 39% βασίσθηκε σε μια από τις γραμμές εκπομπής υδραργύρου, το 13% σε επιλεγμένη ακτινοβολία από πηγή δευτερίου και το 48% σε ακτινοβολία επιλεγμένη με μονοχρωμάτορα.

**Πίνακας 1.1:** Απόδοση ανιχνευτών HPLC

Ανιχνευτής HPLC	Διαθεσιμότητα στο εμπόριο	Όριο ανίχνευσης μάζας (LOD) (εμπορικοί ανιχνευτές) <sup>α</sup>	Όριο ανίχνευσης μάζας (LOD) (υπάρχουσα κατάσταση) <sup>β</sup>
Απορρόφησης	Ναι <sup>γ</sup>	100pg-1 ng	1 pg
Φθορισμού	Ναι <sup>γ</sup>	1 – 10 pg	10 fg
Ηλεκτροχημικός	Ναι <sup>γ</sup>	10 pg – 1 ng	100 fg
Δείκτη διάθλασης	Ναι	100 ng – 1 μg	10 ng
Αγωγιμότητας	Ναι <sup>δ</sup>	100 pg – 1 ng	500 pg
FT-IR	Ναι <sup>δ</sup>	1 μg	100 ng
Σκέδαση φωτός <sup>ε</sup>	Ναι	-	500 mg
Επιλογής στοιχείου	Όχι	-	10 ng
Φωτοϊοντισμού	Όχι	-	1 pg – 1ng

<sup>α</sup> Το όριο ανίχνευσης μάζας (LOD) υπολογίζεται ως η εγχεόμενη μάζα που αποδίδει σήμα ίσο με το πενταπλάσιο του θορύβου ( $\sigma$ ), χρησιμοποιώντας ένα γραμμομοριακό βάρος 200 g/mol.

<sup>β</sup> Έγχυση 10 mL για συνήθη ή 1 mL για μικροσωληνώδη LC.

<sup>γ</sup> Ορίζεται όπως στο α, αλλά ο όγκος έγχυσης είναι γενικά μικρότερος.

<sup>δ</sup> Εμπορικά διαθέσιμοι για μικροσωληνώδη LC.

<sup>ε</sup> Εμπορικά διαθέσιμοι, ωστόσο υψηλού κόστους.

<sup>ε</sup> Συμπεριλαμβανομένης της σκέδασης φωτός μικρής γωνίας και της νεφελομετρίας.

## 1.7 Είδη υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης

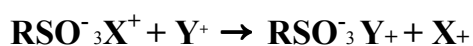
Στην HPLC μπορούν να εφαρμοστούν όλα τα είδη των φυσικοχημικών μηχανισμών που λαμβάνουν χώρα στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς,<sup>27</sup> με την κατάλληλη χρήση υλικού πλήρωσης της στήλης, δηλαδή της στατικής φάσης και του διαλύτη έκλουσης της λεγόμενης κινητής φάσης. Έτσι λοιπόν, με βάση το υλικό πλήρωσης της στήλης και κατά συνέπεια το μηχανισμό διαχωρισμού των υπό ανάλυση ουσιών (φαρμάκων)<sup>28</sup>, η HPLC διακρίνεται σε:

**1) Χρωματογραφία Προσρόφησης:** είναι η παλαιότερη χρωματογραφική τεχνική<sup>29</sup>, στην οποία τα συστατικά του μίγματος αλληλεπιδρούν (προσροφούνται) στην επιφάνεια ή σε ορισμένες θέσεις της επιφάνειας της-στερεής συνήθως-στατικής φάσης. Η ισορροπία που καθίσταται μεταξύ των προσροφημένων σωματιδίων και των σωματιδίων στην κινητή φάση, η οποία

μπορεί να είναι υγρή ή αέρια, πετυχαίνει το διαχωρισμό. Οι αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι ηλεκτροστατικής φύσης, διπόλου-διπόλου, δυνάμεις London, ή συνδυασμός των δυνάμεων αυτών. Κατατάσσεται στη χρωματογραφία κανονικής φάσης, όπου η στατική φάση (διοξείδιο του πυριτίου SiO<sub>2</sub> ή αλουμίνα Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) είναι πολικότερη από την κινητή φάση που αποτελείται από μη πολικούς διαλύτες, όπως εξάνιο, χλωροφόρμιο κ.ά.

**2) Χρωματογραφία Κατανομής:** εφαρμόζεται στην ανάλυση ομόλογων μη ιονικών ενώσεων<sup>30</sup>. Η υγρή στατική φάση σχηματίζει ένα λεπτό υμένιο στην επιφάνεια του στερεού υποστρώματος. Ο διαχωρισμός βασίζεται στη διαφορετική κατανομή μεταξύ της υγρής κινητής και της υγρής στατικής φάσης. Κατατάσσεται στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, όπου η στατική φάση που είναι λιγότερο πολική της κινητής, αποτελείται από διοξείδιο του πυριτίου (SiO<sub>2</sub>) συζευγμένο με ομοιοπολικό δεσμό με αλκύλια, φαινύλια, αμινοομάδες, διόλες κ.ά., ενώ η κινητή φάση αποτελείται από μίγματα οργανικών διαλυτών (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο) με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα ή νερό. Τα υλικά της συζευγμένης φάσης πλεονεκτούν ως προς τη σταθερότητα, αλλά και τη συμβατότητα με μεγάλη ποικιλία εκλουστικών συστημάτων. Είναι η πιο διαδεδομένη τεχνική HPLC και χρησιμοποιείται στο 80% περίπου των αναλυτικών εφαρμογών.

**3) Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής:** ο διαχωρισμός οφείλεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αναλυόμενων ιόντων και των φορτισμένων ομάδων της στατικής φάσης<sup>31</sup>. Έτσι στην περίπτωση της κατιοντοανταλλαγής λαμβάνει χώρα η ισορροπία:



όπου: RSO<sub>3</sub>X<sup>+</sup> είναι η δραστική ομάδα της στατικής φάσης και Y<sup>+</sup> το αναλυόμενο κατιόν. Ανάλογη ισορροπία ισχύει και στην περίπτωση της ανιοντοανταλλαγής.

Οι κυριότερες παράμετροι που καθορίζουν τη συγκράτηση στη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής είναι το αντίθετο ιόν της δραστικής ομάδας της στατικής φάσης, η ιονική ισχύς, το pH, ο τροποποιητής της κινητής φάσης και η θερμοκρασία.

Ως υλικά πλήρωσης χρησιμοποιούνται διάφορες ρητίνες που αποτελούν συμπολυμερή στυρενίου-διβινυλοβενζολίου, στα οποία έχουν εισαχθεί σουλφονικές ή καρβοξυλικές ομάδες, τριτοταγείς ή τεταρτοταγείς αμίνες.

**4) Χρωματογραφία Συγγένειας (Affinity Chromatography):** για να επιτευχθεί διαχωρισμός, οι προσδιοριζόμενες ενώσεις δεσμεύονται εκλεκτικά σε υποκαταστάτες (ligands)<sup>32</sup> οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι με ομοιοπολικούς δεσμούς στην επιφάνεια του διοξειδίου του πυριτίου. Για παράδειγμα ο υποκαταστάτης μπορεί να είναι ένα είδος αντισώματος σε μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Κατά τη διέλευση μέσα από τη στήλη μίγματος μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών, μόνο μία πρωτεΐνη αντιδρά με το συγκεκριμένο αντίσωμα. Μετά την έκπλυση των υπολοίπων συστατικών από τη στήλη, η επιθυμητή πρωτεΐνη αποδεσμεύεται από το αντίσωμα με μεταβολή της τιμής pH ή της ιονικής ισχύος. Αποτελεί την πιο σύγχρονη και πιο εκλεκτική χρωματογραφική τεχνική. Στην κατηγορία αυτή ανήκει η Χρωματογραφία Εναντιομερών με την οποία διαχωρίζονται εναντιομερείς μορφές ενώσεων που παρουσιάζουν χειρομορφία (Chiral Chromatography)<sup>33</sup>. Για μερικά φάρμακα που παρουσιάζουν χειρομορφία, η επιθυμητή φαρμακολογική δράση οφείλεται εφ' ολοκλήρου στο ένα εναντιομερές, ενώ ο αντίποδας είναι υπεύθυνος για σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες. Η Χρωματογραφία Εναντιομερών είναι αποτελεσματική μέθοδος για το διαχωρισμό των ρακεμικών μιγμάτων.

**5) Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους (Size Exclusion) ή Διαπερατότητας Πηκτής (Gel Permeation Chromatography):** ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με βάση το σχήμα και το μέγεθος των μορίων των υπό ανάλυση ενώσεων. Τα μεγαλύτερα μόρια προχωρούν με μεγαλύτερη ταχύτητα. Σ' αντίθεση με τα άλλα είδη χρωματογραφίας, δεν υπάρχει αλληλεπίδραση ανάμεσα στη στατική φάση και τα διαχωριζόμενα συστατικά. Η υγρή ή η αέρια κινητή φάση διαπερνά μέσα από πορώδη πηκτή. Το μέγεθος των πόρων είναι μικρό και αποκλείονται τα μεγάλα μόρια του προσδιοριζόμενου συστατικού που προχωρούν, χωρίς να εισέλθουν στην πηκτή, ενώ τα μικρά μόρια εξέρχονται από τη στήλη σε μεγαλύτερο χρόνο. Η Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους βρίσκει εφαρμογές στους προσδιορισμούς και το χαρακτηρισμό των πολυμερών.

## **Κεφάλαιο 2: Μελέτες σταθερότητας φαρμακευτικών ενώσεων με χρωματογραφικές τεχνικές**

### **2.1 Τι είναι η ενδεικτική μέθοδος σταθερότητας**

Σύμφωνα με τον τυπικό ορισμό της έννοιας, μία ενδεικτική μέθοδος σταθερότητας είναι ένας αριθμός ποσοτικών αναλυτικών μεθόδων που βασίζονται στη χαρακτηριστική δομή, τις χημικές ή βιολογικές ιδιότητες κάθε δραστικού συστατικού του φαρμακευτικού προϊόντος και οι οποίες διακρίνουν κάθε ενεργό συστατικό από τα προϊόντα αποικοδόμησης έτσι ώστε κάθε δραστικό συστατικό να μπορεί να μετρηθεί με ακρίβεια. Επομένως, μία ενδεικτική μέθοδος σταθερότητας είναι μία αναλυτική διαδικασία η οποία είναι ικανή να διαχωρίζει το δραστικό συστατικό από τα προϊόντα διάσπασης και τα προϊόντα διάσπασης μεταξύ τους παρουσία προσμίξεων κατά την διάρκεια της αξιολόγησης της μεθόδου σταθερότητας. Επιπλέον, η μέθοδος πρέπει να είναι ευαίσθητη ώστε να ανιχνεύει και να ποσοτικοποιεί ένα ή περισσότερα από τα προϊόντα διάσπασης και να είναι ικανή να διαχωρίζει κάθε άλλη πιθανή κορυφή όπως είναι εκείνη του εσωτερικού προτύπου.

Με τα παραπάνω κριτήρια, η 'διαγνωστική' φύση της μεθόδου υποδεικνύει ότι η μέθοδος πρέπει να είναι ειδική για μελέτες σταθερότητας (stability-specific). Ακραίες (stress) συνθήκες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επιτάχυνση της διαδικασίας αποικοδόμησης και την παραγωγή των προϊόντων διάσπασης της δραστικής ουσίας. Ωστόσο, οι ακραίες συνθήκες διάσπασης οι οποίοι πραγματοποιούνται σε έντονες συνθήκες οξειδωσης, φωτόλυσης ή υδρόλυσης σε ακραίες τιμές pH μπορεί να σχηματιστούν κάποια προϊόντα διάσπασης τα οποία είναι απίθανο να σχηματιστούν σε συνθήκες επιταχυνόμενες ή σε μακράς διάρκειας μελέτες σταθερότητας κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των φαρμακευτικών προϊόντων. Τα παραγόμενα προϊόντα διάσπασης είναι χρήσιμα για την ανάπτυξη και την επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου για τον ποιοτικό έλεγχο η οποία να είναι ενδεικτική για μελέτες σταθερότητας (stability-indicating) διευρύνοντας έτσι τη χρησιμότητα της αναλυτικής μεθόδου.

Μια μέθοδο ενδεικτική για μελέτες σταθερότητας πρέπει να είναι σύμφωνη με την επιδιωκόμενη εφαρμογή της, επομένως πρέπει να επιλέγεται η κατάλληλη τεχνική ώστε να προσδιορίζει τις απαιτήσεις της μελέτης

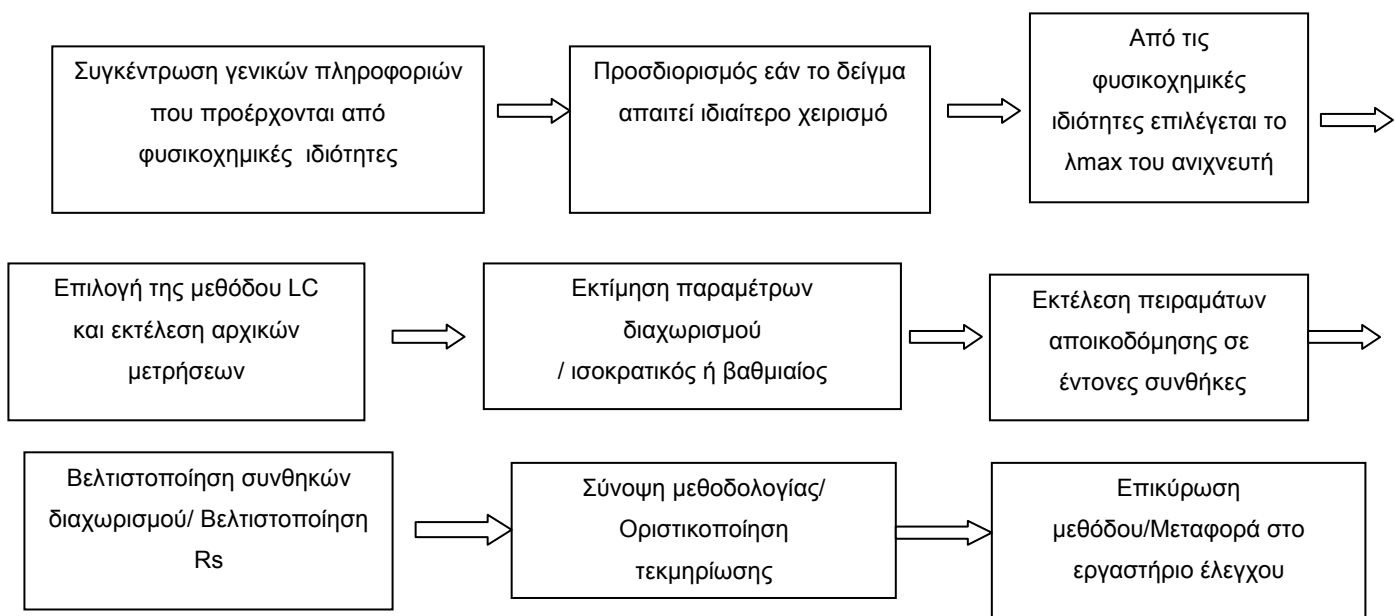


σταθερότητας. Προφανώς, η σκοπούμενη εφαρμογή της ενδεικτικής μεθόδου σταθερότητας αφορά την παρακολούθηση της σταθερότητας μιας συγκεκριμένης ουσίας- σε τελικό προϊόν- και απαιτεί αξιολόγηση της μεθόδου. Ωστόσο, όταν τίθεται θέμα αναμονής χρόνου, όπως συμβαίνει κατά την διάρκεια της διαλυτοποίησης ή κατά τη διαδικασία της παραγωγής, προτείνεται να αξιολογείται η μέθοδος ως προς τα χαρακτηριστικά της μεθόδου σταθερότητας πριν την σκοπούμενη εφαρμογή της.

Η περισσότερο διαδεδομένη τεχνική για μελέτες σταθερότητας είναι η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC). Στην τεχνική αυτή βασίζεται πάνω από το 85% των φαρμακευτικών εφαρμογών. Άλλες χρωματογραφικές τεχνικές διαχωρισμού, όπως είναι η χειρόμορφη χρωματογραφία (CC), η χρωματογραφία λεπτής σπιβάδας (TLC), η αεριοχρωματογραφία (GC), και η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE) είναι κατάλληλες για την ανάπτυξη ενδεικτικών ή και ειδικών μεθόδων για μελέτες σταθερότητας. Μη χρωματογραφικές και φασματοσκοπικές τεχνικές όπως είναι η τιτλομετρία, η ατομική απορρόφηση, η φασματοφωτομετρία, και η φασματοσκοπία IR, αν και ακριβής δε θεωρούνται κατάλληλες για ανάπτυξη μεθόδων ενδεικτικών για μελέτες σταθερότητας.

## **2.2 Γενική επισκόπηση της πορείας ανάπτυξης μεθόδου για μελέτες σταθερότητας**

Η διαδικασία που ακολουθείται για την ανάπτυξη μεθόδου για μελέτες σταθερότητας μπορεί να απεικονιστεί με ένα γενικό πλαίσιο ώστε να προσδιοριστούν τα βήματα που απαιτούνται μέχρι το τελικό προϊόν. Η διαδικασία αυτή οδηγεί στην προτεινόμενη μελέτη σταθερότητας, σχήμα 2.1.



**Σχήμα 2.1.** Γενικό πλάνο ανάπτυξης μελέτη σταθερότητας

Η γνώση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των δραστικών συστατικών των φαρμακευτικών προϊόντων είναι ανεκτίμητης σημασίας κατά τη διαδικασία της ανάπτυξης της μεθόδου. Πληροφορίες για τις διάφορες ιδιότητες μπορεί να συλλεχθούν είτε μέσω ειδικού προγράμματος που παράγει τις κατάλληλες πληροφορίες κατά την ανάπτυξη του φαρμάκου-σύνθεση του φαρμάκου-ή μέσω βιβλιογραφικής έρευνας ή από το προφίλ των φαρμάκων από την εταιρεία παραγωγής, από βιβλιοθήκες φασμάτων ή αναφορές. Πληροφορίες σχετικές με τις σταθερές διάστασης, τους συντελεστές κατανομής, τον ενδογενή φθορισμό (αν υπάρχει), τη χρωματογραφική συμπεριφορά, τις φασματοφωτομετρικές ιδιότητες, τα δυναμικά οξειδοαναγωγής, τη διαλυτότητα και τις μελέτες σταθερότητας σκευάσματος, είναι χρήσιμες και μπορούν να επισπεύσουν την πορεία της ανάπτυξης της αναλυτικής μεθόδου. Η σταθερά διάστασης και οι συντελεστές κατανομής μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη αποδοτικών διαδικασιών υγρής/υγρής εκχύλισης, ενώ οι πληροφορίες σχετικές με φθορίζουσες, φασματοφωτομετρικές, χρωματογραφικές, και οξειδοαναγωγικές ιδιότητες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επιλογή της καλύτερης μεθόδου ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης του αναλύτη που μας ενδιαφέρει. Μελέτες σταθερότητας πραγματοποιούνται στη φαρμακευτική ουσία, σε διάλυμα και σε μίγμα με φαρμακευτικά έκδοχα ως μέρος των μελετών συμβατότητας. Χαρακτηριστικές ομάδες ταυτοποιούνται και διερευνάται η ευαισθησία του φαρμάκου στην

υδρόλυση, την οξείδωση, τη θερμική διάσπαση και σε άλλες συνθήκες. Οι μελέτες συμβατότητας πραγματοποιούνται για την αξιολόγηση της σταθερότητας των δραστικών συστατικών όταν αναμιγνύονται με κοινά έκδοχα καθώς επίσης και για τον προσδιορισμό πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του φαρμάκου και των πρώτων υλών.

Οι διαλυτότητες θα πρέπει να προσδιορίζονται σε έναν αριθμό διαλυτών που καλύπτουν μία κλίμακα πολικότητας και είναι οι πιο συνήθεις κατά την ανάπτυξη της μεθόδου. Οι διαλυτότητες πρέπει να προσδιορίζονται τόσο σε υδατικούς και όσο και σε οργανικούς διαλύτες.

Βιβλιοθήκες φασμάτων έχουν καθιερωθεί από τις οποίες μπορούν να σταχυολογηθούν χρήσιμες πληροφορίες για τις αρχικές συνθήκες σε έναν διαχωρισμό HPLC. Ωστόσο, οι πληροφορίες αυτές μπορεί να μην είναι γνωστές ή διαθέσιμες, οπότε ο αρχικός διαχωρισμός πρέπει να βασίζεται σε προηγούμενη εμπειρία ώστε να προσδιοριστεί το σύνολο των ενεργειών που απαιτούνται για την πειραματική πορεία που θα πρέπει να ακολουθηθεί.

Ιδανικά, η γνώση της φύσης των δραστικών συστατικών που σχετίζονται με τη πορεία της σύνθεσης και άλλες ιδιότητες θα μπορούσε να είναι ωφέλιμη. Για παράδειγμα, πληροφορίες που αφορούν τη συνθετική πορεία της ένωσης, θα μπορούσαν να βοηθήσουν την αναζήτηση συγγενών ουσιών, πιθανών προϊόντων διάσπασης και προσμίξεων. Η γνώση της χημικής δομής της ένωσης θα μπορούσε να αποκαλύψει πιθανά στερεοϊσομερή τα οποία με την σειρά τους να απαιτούν μία διαφορετική στρατηγική διαχωρισμού. Στον πίνακα 2.1, παρατίθενται τυπικές πληροφορίες που είναι χρήσιμες και αφορούν τη φύση της ένωσης. Όσο περισσότερες πληροφορίες είναι διαθέσιμες, τόσο λιγότερο εμπειρική θα είναι η προσέγγιση της ανάπτυξης αναλυτικής μεθόδου.

---

**Πίνακας 2.1** Χρήσιμες φυσικοχημικές πληροφορίες σχετικές με τον  
αναλύτη

---

Μήκος κύματος απορρόφησης ( $\lambda_{max}$ )

Ταυτότητα/Αριθμός ενώσεων που περιέχονται

(π.χ.στερεοϊσομερή/κέντρα ασυμμετρίας)

Χημική δομή /επαμφοτερίζουσες ιδιότητες

Μοριακό βάρος

$pK_a$  τιμές των ενώσεων

Μορφή άλατος της ένωσης

Διαλυτότητα της ένωσης

Καθαρότητα της ένωσης

---

### **2.3 Επιλογή της χρωματογραφικής μεθόδου**

Μία φαρμακευτική ένωση έχει συνήθως μοριακό βάρος μικρότερο από 1,000 dalton και είναι διαλυτή είτε στο νερό είτε σε κάποιο οργανικό διαλύτη. Τα υδατοδιαλυτά φάρμακα είναι ιοντικές ή μη ιοντικές ενώσεις, ενώ τα φάρμακα που διαλύονται σε οργανικούς διαλύτες είναι πολικές ή μη πολικές ενώσεις. Οι περισσότεροι διαχωρισμοί πραγματοποιούνται με την τεχνική της υγροχρωματογραφίας αντίστροφης φάσης (RP-HPLC). Σε μερικές περιπτώσεις, τα πολικά φάρμακα αναλύονται με κανονικής φάσης HPLC. Στις περιπτώσεις ουσιών με  $MB > 1000$  daltons, είναι αναγκαίο να χρησιμοποιηθούν άλλες χρωματογραφικές μέθοδοι για το διαχωρισμό τους.

#### **2.3.1 Υγροχρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως**

Στα πλεονεκτήματα της τεχνικής RP-HPLC υπάγονται η ευαισθησία των μεθόδων που αναπτύσσονται και η ικανότητα της τεχνικής να χρησιμοποιείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή σε σχετικά μέτριες θερμοκρασίες οπότε δεν ευνοείται η διάσπαση του αναλύτη.<sup>59</sup>

#### **2.3.2 Χειρόμορφη Χρωματογραφία**

Από τις αρχές της δεκαετίας του '90, ο οργανισμός FDA εκδίδει ένα έγγραφο σχετικά με την ανάπτυξη νέων εναντιομερών φαρμάκων, μέχρι τότε η πλειοψηφία των εναντιομερών συνθετικών ενώσεων θεωρούνταν ως ρακεμικά μίγματα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι, μέχρι πρόσφατα, δεν ήταν τεχνικά δυνατός αλλά και οικονομικά εφικτός ο διαχωρισμός ενός ρακεμικού μίγματος

στα επιμέρους εναντιομερή του. Η εμπειρία έχει δείξει ότι τα εναντιομερή επιδεικνύουν διαφορετικές θεραπευτικές ιδιότητες. Ωστόσο, με τις οδηγίες του διεθνούς οργανισμού FDA και την πρόσφατη τεχνολογική ανάπτυξη, νέες χημικές ενώσεις που διαθέτουν κέντρα ασυμμετρίας μπορούν να διαχωριστούν και επομένως τα φαρμακευτικά προϊόντα που είναι εναντιομερή χορηγούνται στη πλειονότητα τους με τη μορφή του δραστικού εναντιομερούς και όχι ως ρακεμικά μίγματα<sup>60</sup>. Όπως αναφέρετε στις οδηγίες του διεθνούς συνεδρίου εναρμόνισης (ICH, International Conference on Harmonization) που αφορούν τις προδιαγραφές των φαρμακευτικών ουσιών και φαρμακευτικών προϊόντων, θα πρέπει να ικανοποιούνται οι έλεγχοι που παρατίθενται στον πίνακα 2.2 για μία νέα φαρμακευτική ουσία που είναι οπτικά ενεργή.

**Πίνακας 2.2** Οδηγίες του ICH για τα φαρμακευτικά προϊόντα

<i>Φαρμακευτική Ουσία</i>	<i>Έλεγχοι/Προδιαγραφές απαιτήσεων</i>
Προσμίξεις	Παρεμφερείς με άλλες προσμίξεις
Ανάλυση	Εναντιοεκλεκτική διαδικασία ή μη χειρόμορφη μέθοδος με κατάλληλα μέσα για τον έλεγχο προσμίξεων εναντιομερών
Ταυτότητα	Οι έλεγχοι πρέπει να διακρίνουν τα εναντιομερή
<b>Φαρμακευτικό Προϊόν</b>	
Προϊόντα διάσπασης	Έλεγχος για άλλο εναντιομερές εάν αυτό αποτελεί προϊόν διάσπασης
Ανάλυση	Εάν το εναντιομερές δεν είναι προϊόν διάσπασης, μία μη εναντιοεκλεκτική μέθοδος είναι αποδεκτή, αλλά ή χειρόμορφη ανάλυση είναι προτιμότερη ή εναλλακτικά μη εναντιοεκλεκτική ανάλυση συμπεριλαμβανομένου τρόπου για τον έλεγχο της παρουσίας του εναντιομερούς
Ταυτότητα	Έλεγχος για την διακρίβωση του σωστού εναντιομερούς

### 2.3.3 Αεριοχρωματογραφία

Η αεριοχρωματογραφία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη μιας ενδεικτικής μεθόδου σταθερότητας, δεν είναι όμως τόσο εύχρηστη όσο η HPLC μέθοδος καθώς η φαρμακευτική ουσία μπορεί να μην είναι πτητική. Από

την άλλη πλευρά, η αύξηση της θερμοκρασίας πιθανόν να προκαλέσει διάσπαση της ουσίας ή και ρακεμοποίησή της, αν πρόκειται για χειρόμορφη ένωση. Υπάρχει μόνο ένας περιορισμένος αριθμός περιπτώσεων στις οποίες η τεχνική αυτή θα μπορούσε να είναι χρήσιμη καθώς μικρές και μη αρωματικές ενώσεις συνήθως διαχωρίζονται με τις τεχνικές της HPLC και της TLC.

#### **2.3.4 Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (Thin-Layer Chromatography)**

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) αποτελεί την πρώιμη χρωματογραφική τεχνική και είναι ακόμη ευρέως διαδεδομένη σε όλα τα στάδια της φαρμακευτικής βιομηχανίας, τόσο σε επίπεδο έρευνας όσο και στο εργαστήριο ποιοτικού ελέγχου. Χρησιμοποιείται κατά τη διαδικασία της ανάπτυξης ενός φαρμάκου, στον έλεγχο καθαρότητας ενός φαρμακευτικού υποστρώματος, στον έλεγχο των διαλυμάτων αναφοράς, και στα ενδιάμεσα προϊόντα. Χαρακτηρίζεται από σημαντικά πλεονεκτήματα όπως είναι η απλότητα, το χαμηλό κόστος, και ο σύντομος χρόνος ανάλυσης. Το σημαντικότερο μειονέκτημα της τεχνικής είναι η μεταβλητότητα. Ο Constanzo έχει προτείνει μία μέθοδο προσέγγισης τριών σημείων για την βελτιστοποίηση του διαχωρισμού και επομένως μείωση της μεταβλητότητας ελέγχοντας τη σύσταση της κινητής φάσης.<sup>61</sup>

#### **2.3.5 Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση (CE) και τριχοειδής ηλεκτροχρωματογραφία (CEC)**

Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση είναι μία τεχνική διαχωρισμού που βασίζεται στην κινητικότητα των ιόντων μέσω ενός ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχεται σε μία τριχοειδής στήλη υπό την επίδραση ηλεκτρικά φορτισμένου περιβάλλοντος. Αυτό παρέχει διαχωρισμό φορτισμένων σωματιδίων. Όταν η CE συνδεθεί με στατική φάση και εφαρμοστεί υψηλή πίεση, τότε είναι γνωστή ως CEC, στην οποία ο διαχωρισμός βασίζεται στην ηλεκτροφορητική μετανάστευση και χρωματογραφικό διαμερισμό (chromatographic partitioning) καθιστώντας εφικτό τον διαχωρισμό ουδέτερων μορίων.

Και οι δύο τεχνικές είναι περισσότερο εφαρμόσιμες σε βιολογικά συστήματα, στην βιοφαρμακευτική και σε άλλες R&D εφαρμογές και λιγότερο στην διασφάλιση ποιότητας. Είναι πολύ ευαίσθητες και κατάλληλες για διαχωρισμούς μικρών ποσοτήτων ακριβών βιοφαρμακευτικών ουσιών. Από

την άλλη πλευρά έχουν μικρή εφαρμογή στους ελέγχους για την απελευθέρωση του προϊόντος ή στις μελέτες σταθερότητας. Η χρησιμότητα τους οφείλεται στην ικανότητα των τεχνικών να επιτυγχάνουν υψηλή ευαισθησία και διαχωριστικότητα με υψηλές αποδόσεις ακόμη και στην περίπτωση κορυφών με χαμηλή διασπορά. Ο Moffat και οι συνεργάτες του<sup>62</sup>, έχει αναφέρει ασυνήθιστες υψηλές αποδόσεις της τάξης πάνω από 4.5 εκατομμύρια πλάκες/μέτρο στην περίπτωση της τριχοειδούς ηλεκτροχρωματογραφίας κατά την ανάλυση εν' μέρει ιονισμένων ανιοντικών-ουδέτερων ενώσεων της πυριμιδίνης χρησιμοποιώντας στήλη C18.

#### **2.4 Ο ρόλος των μελετών σταθερότητας σε συνθήκες επιταχυνόμενης διάσπασης**

Σύμφωνα με έκδοση του 1987 του οργανισμού FDA σχετικά με τις οδηγίες που αφορούν την μελέτη σταθερότητας ορίζεται σαφώς ότι τα φάρμακα πρέπει να υποβάλλονται σε έναν αριθμό έντονων συνθηκών αποικοδόμησης συμπεριλαμβανομένου όξινων, βασικών και οξειδωτικών συνθηκών. Σε αυτό το πρωτόκολλο ανάλυσης περιλαμβάνεται και κυκλικές σειρές μετρήσεων ελέγχοντας την επίδραση της θερμοκρασίας και του φωτός (φωτοσταθερότητα). Οι πρόσφατες οδηγίες του οργανισμού ICH (Q2A και Q2B) δεν προσδιορίζουν τον τρόπο διεξαγωγής των μελετών σταθερότητας αλλά αφήνεται στην κρίση των υπεύθυνων εταιριών. Η μελέτη των προϊόντων διάσπασης πρέπει να πραγματοποιείται κατά τα πρώτα στάδια της πορείας ανάπτυξης ώστε να διασφαλίζεται ότι η μέθοδος διαθέτει διαχωριστική ευαισθησία πριν ο χρόνος, η προσπάθεια και τα χρήματα δαπανηθούν για την παραγωγή του φαρμακευτικού σκευάσματος.

Στα έγγραφα των οδηγιών δεν αναφέρονται λεπτομερώς οι συνθήκες διεξαγωγής των πειραμάτων. Οι προτεινόμενες συνθήκες διάσπασης συνοψίζονται στον πίνακα 2.2.

Είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν κάποια προκαταρκτικά πειράματα για την εύρεση του κατάλληλου συνδυασμού συγκέντρωσης αντιδραστηρίου και χρόνου που επιδρά για την επίτευξη αποικοδόμησης σε ποσοστό κατά προτίμηση της τάξης 20-30%. Ανάλογα με τη δραστική ουσία του φαρμακευτικού προϊόντος, δεν προκαλούν όλα τα αντιδραστήρια αποικοδόμησης διάσπαση της ουσίας, ωστόσο, κάθε αντιδραστήριο θα

πρέπει να αξιολογηθεί ώστε να προσδιοριστεί το αποτέλεσμα της διάσπασης που προκαλεί. Μελετώνται οι εξής παράμετροι:

**Ικανοποιητικός παράγοντας χωρητικότητας  $k'$ .** Κατά την αρχική ανάπτυξη της μεθόδου θα πρέπει να επιτυγχάνεται κατάλληλα διαχωρισμένη κορυφή, με  $k'$  να κυμαίνεται μεταξύ της περιοχής 4 έως 10. Αυτή η κλίμακα επιτρέπει κατάλληλο διάστημα χρόνου στο χρωματογράφημα ώστε τα προϊόντα διάσπασης να εκλύονται πριν ή μετά την κύρια κορυφή του δραστικού προϊόντος. Καθώς η πολικότητα των προϊόντων αποικοδόμησης συγκρινόμενη με εκείνη της κύρια κορυφής δεν είναι γνωστή, η τιμή του  $k'$  της κύριας κορυφής στο μέσον του χρωματογραφήματος προσθέτει κάποια ασφάλεια ότι τα προϊόντα διάσπασης θα διαχωρισθούν ικανοποιητικά.

**Συνθήκες Αποικοδόμησης.** Τυπικές συνθήκες διάσπασης περιλαμβάνουν αντιδράσεις υδρόλυσης, φωτόλυσης, διάσπαση σε όξινες και βασικές συνθήκες, μελέτη επίδρασης της θερμοκρασίας. Στόχος είναι η επίτευξη διάσπασης σε ποσοστό 20-30% και όχι η πλήρης αποικοδόμηση της δραστικής ουσίας καθώς μια τέτοια διαδικασία θα προκαλούσε δευτερογενής αντιδράσεις διάσπασης των προϊόντων διάσπασης που είναι απίθανο να συμβούν κάτω από φυσιολογικές συνθήκες αποθήκευσης. Αναλόγως της φύσης του δραστικού φαρμακευτικού συστατικού, μεταβάλλονται και οι συνθήκες που οδηγούν στη διάσπαση της.

**Εσωτερικό Πρότυπο.** Εάν η αναλυτική μέθοδος απαιτεί τη χρήση εσωτερικού προτύπου, ενδείκνυται να μην διασπάται και η τιμή του  $k'$  να μην επηρεάζει καμία από τις πιθανά εκλυόμενες κορυφές. Διορθώνει τα σφάλματα που προκύπτουν από μεταβολές της θερμοκρασίας, πίεσης καθώς και της μη επαρκούς ανάκτησης κατά την κατεργασία του δείγματος.

Οι ιδιότητες του εσωτερικού προτύπου θα πρέπει να είναι:

- να μην περιέχεται στο υπό ανάλυση δείγμα
- η κορυφή του να είναι ευδιάκριτη ( $R_s > 1.5$ ) από άλλα συστατικά
- παρόμοια χημική δομή με την προσδιοριζόμενη ουσία
- να μην αντιδρά με τα συστατικά του δείγματος
- υψηλή καθαρότητα



Η αξιολόγηση του μίγματος που προκύπτει από τις μελέτες διάσπασης επιτυγχάνεται με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (PDA). Ο προσδιορισμός της καθαρότητας της κύριας κορυφής είναι πολύ σημαντικός και σχετίζεται με την πιθανή παρουσία ανομοιογενούς κορυφής μετά από τη διαδικασία της διάσπασης. Είναι απαραίτητο να επιβεβαιωθεί ότι δεν υπάρχει καμία κορυφή αποικοδόμησης 'κρυμμένη' ή ατελώς διαχωρισμένη από την κύρια κορυφή. Η χρησιμότητα ενός ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων έγκειται στο γεγονός ότι ο αναλυτής μπορεί να επιλέξει όλη την κλίμακα των μηκών κύματος δηλαδή από τα 200 έως τα 350 nm με εύρος σάρωσης περίπου 80 nm. Αντίθετα με ότι συμβαίνει σε ένα κλασσικό ανιχνευτή UV, όπου ανιχνεύονται μόνο οι ενώσεις που απορροφούν στο μήκος κύματος ανίχνευσης, με τον ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων υπάρχει η δυνατότητα να ανιχνευτούν όλες οι ενώσεις που απορροφούν σε όλη την περιοχή σάρωσης που έχει επιλεγεί για τη χρωματογραφική ανάλυση.

**Πίνακας 2.3** Προτεινόμενο σχεδιάγραμμα για την πραγματοποίηση μελετών αποικοδόμησης

Προϊόν	Διάσπαση	Συνθήκες Διάσπασης		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Οξινο Θειώδες νάτριο	Φωτοσταθερότητα	T (°C)
		Οξύ	Βάση				
Προϊόν	ναι	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Εικονικό φάρμακο (placebo)	ναι	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Πρώτες ύλες	ναι	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Εσωτερικό πρότυπο	όχι	-	-	-	-	-	-
<b>Έλεγχοι</b>							
Προϊόν	όχι	-	-	-	-	-	-
πρώτες ύλες	όχι	-	-	-	-	-	-
Τυφλό διάλυμα	όχι	-	-	-	-	-	-

## 2.5 Προετοιμασία δείγματος

Η προετοιμασία του δείγματος είναι κρίσιμο στάδιο σε μία χρωματογραφική ανάλυση καθώς ο τρόπος κατεργασίας μπορεί να επηρεάσει την ανάλυση. Το στάδιο επεξεργασίας του δείγματος περιλαμβάνει συνήθως διήθηση του δείγματος ή εκχύλιση και σε ορισμένες περιπτώσεις

αντιδράσεις σχηματισμού παραγώγων. Ο στόχος αυτού του βήματος είναι να προετοιμάσει το δείγμα ώστε ο αναλύτης να μπορεί να διαχωριστεί από τα υπόλοιπα συστατικά του υποστρώματος. Στο στάδιο της κατεργασίας του δείγματος απομακρύνονται οι ουσίες που παρεμποδίζουν την ανάλυση και καμιά φορά ενισχύεται η ανίχνευση της δραστικής ουσίας. Η διαδικασία κατεργασίας συνήθως προστατεύει και αυξάνει τον χρόνο ζωής της αναλυτικής στήλης.

Συνήθως εξετάζονται οι εξής παράγοντες: το είδος του υποστρώματος, η διαλυτοποίηση του αναλύτη πρέπει να είναι πλήρης στην κινητή φάση ή σε άλλον ασθενέστερο διαλύτη, η αναμιξιμότητα, εάν ο αναλύτης καταβυθίζεται στο χρησιμοποιούμενο ρυθμιστικό διάλυμα. Συνηθισμένοι τρόποι κατεργασίας του δείγματος είναι η διάλυση του, η κατεργασία με υπερήχους, η ανατάραξη, η διήθηση ή η υπερ-διήθηση, η τεχνική της υγρό-υγρό εκχύλισης ή της εκχύλισης στερεάς φάσης, η εξάτμιση, η ανασύσταση, ο σχηματισμός παραγώγων στις περιπτώσεις που απαιτείται ενίσχυση του σήματος και η θέρμανση/ψύξη. Σε σπάνιες περιπτώσεις, το φαρμακευτικό προϊόν, σε μορφή διαλύματος ενίεται χωρίς κατεργασία ή μετά από απλή αραιώση. Γενικά, για την κατεργασία των φαρμακευτικών προϊόντων που βρίσκονται σε στερεή μορφή (π.χ. δισκία, κάψουλες), η προκατεργασία μπορεί να περιλαμβάνει ένα επιπλέον στάδιο, αυτό της άλεσης ή του θρυμματισμού του δείγματος.

Για παράδειγμα, στα στάδια κατεργασίας μίας αλοιφής περιλαμβάνεται η εκχύλιση του δραστικού συστατικού με κατάλληλο διαλύτη και ακολουθούν τα στάδια της εξάτμισης, της ανασύστασης και της αραιώσης ή της θέρμανσης για την διάλυση του αναλύτη, ακολουθεί συνήθως ψύξη του διαλύματος και στο τέλος το δείγμα διηθείται πριν την ανάλυση του. Είναι πολύ σημαντικό το αναλυόμενο δείγμα να είναι ελεύθερο σωματιδίων, μέσω διήθησης ή φυγοκέντρωσης, και ο διαλύτης να είναι συμβατός με το σύστημα της HPLC. Εάν είναι ανεπαρκής η διαλυτότητα του δείγματος ή αν ο διαλύτης είναι πολύ πολικός, εμφανίζονται παραμορφωμένες χρωματογραφικές κορυφές (εμφάνιση ουράς, tailing).

## **2.6 Ανάπτυξη της μεθόδου διαχωρισμού- Επιλογή των πειραματικών συνθηκών**

Δύο επιλογές υπάρχουν πριν την έναρξη των πειραμάτων με στόχο την ανάπτυξη της επιθυμητής μεθοδολογίας για μια μελέτη σταθερότητας. Αρχικά

μπορεί να σταχυολογηθούν αρκετές πληροφορίες από άλλες μεθόδους ανάλυσης που είτε μπορεί να υπάρχουν στο εργαστήριο είτε έχουν δημοσιευθεί στη διεθνή βιβλιογραφία και αφορούν τη δραστική ουσία. Αρκετές φορές απαιτείται η ανάπτυξη και η επικύρωση μιας νέας μεθόδου για τις μελέτες<sup>63</sup>. Επιδιωκόμενοι στόχοι κατά την ανάπτυξη μιας μεθόδου ανάλυσης κατάλληλης για μελέτες σταθερότητας είναι να υπάρχει ικανοποιητικός διαχωρισμός των αναλυτών και ο χρόνος ανάλυσης να μην είναι ιδιαίτερα μεγάλος. Το επόμενο βήμα είναι ο προσδιορισμός της φύσης του δραστικού συστατικού.

Στον Πίνακα 2.4, αναφέρονται οι τυπικές χρωματογραφικές συνθήκες για την ανάλυση ουδέτερων, όξινων και βασικών αναλυτών.

<b>Πίνακας 2.4</b> Γενικές πειραματικές συνθήκες για μία μέθοδο HPLC			
Χρωματογραφικές Μεταβλητές	<b>Ουδέτερες Ενώσεις</b>	<b>Όξινες Ενώσεις (καρβοξυλικά οξέα)</b>	<b>Βασικές Ενώσεις (αμίνες)</b>
Διαστάσεις στήλης	250mm x 4,6 mm	250mm x 4,6 mm	250mm x 4,6 mm
Στατική φάση	C <sub>18</sub> ή C <sub>8</sub>	C <sub>18</sub> ή C <sub>8</sub>	C <sub>18</sub> ή C <sub>8</sub>
Μέγεθος σωματιδίων	10μm ή 5μm	10μm ή 5μm	10μm ή 5μm
Κινητή φάση			
Διαλύτες Α και Β	Ρυθμιστικό διάλυμα-ακετονιτρίλιο	Ρυθμιστικό διάλυμα – ακετονιτρίλιο	Ρυθμιστικό διάλυμα – ακετονιτρίλιο
Ισοκρατική έκλυση	50%	50%	50%
	20% - 80%	20% - 80%	20% - 80%
Βαθμιδωτή έκλυση	(οργανικός τροποποιητής)	(οργανικός τροποποιητής)	(οργανικός τροποποιητής)
Ρυθμιστικά διαλύματα			
Τύπος	Φωσφορικό άλας	Φωσφορικό άλας	Φωσφορικό άλας
Συγκέντρωση	50mM	50mM	50mM
pH	3,0	3,0 & 7,5	3,0 & 7,5
Τροποποιητής	10mM τριαιθυλαμίνη και 1% οξικού οξέος	1% οξικού οξέος	25mM τριαιθυλαμίνη
Ταχύτητα Ροής	1,5-2,0 mL min <sup>-1</sup>	1,5-2,0 mL min <sup>-1</sup>	1,5 – 2,0 mL min <sup>-1</sup>
Θερμοκρασία	θερμοκρασία 35°C	θερμοκρασία 35°C	θερμοκρασία 35°C
Μέγεθος Δείγματος			
Όγκος βρόχου	10 μL - 25μL	10 μL - 25μL	10 μL - 25μL
Μάζα	<100 μg	<100 μg	<100 μg

## 2.7 Βελτιστοποίηση του διαχωρισμού

Μέχρι τώρα, οι προσπάθειες για την ανάπτυξη μιας μεθόδου HPLC κατάλληλης για μελέτες σταθερότητας περιστρέφονται γύρω από την εξίσωση της διαχωριστικής ικανότητας. Για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου πρέπει να μεταβάλλεται μία από τις τρεις μεταβλητές της εξίσωσης. Ο παράγοντας χωρητικότητας,  $k'$ , μπορεί να μεταβληθεί με αλλαγή του διαλύτη. Ο παράγοντας αποδοτικότητας,  $N$ , μπορεί να τροποποιηθεί με μία αλλαγή στις διαστάσεις της στήλης, το μέγεθος των σωματιδίων την στατική φάση και την ταχύτητα ροής. Τέλος, ο παράγοντας διαχωρισμού,  $\alpha$ , μπορεί να βελτιωθεί με μια αλλαγή στον διαλύτη, το pH, την ιοντική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος, την στατική φάση, τα πρόσθετα κινητής φάσης και της θερμοκρασίας.

### Εμβαδόν κορυφής ή ύψος κορυφής για την ποσοτικοποίηση

Ο αναλυτής μπορεί να επιλέξει είτε το εμβαδόν της κορυφής είτε το ύψος της κορυφής για την ποσοτικοποίηση, υποθέτοντας ότι και οι δύο μέθοδοι έχουν κατάλληλα βαθμονομηθεί και αξιολογηθεί. Συνίσταται γενικά, ωστόσο, το εμβαδόν κορυφής να χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη της μεθόδου και το ύψος κορυφής για την σταθερότητα για τους λόγους που αναφέρονται στον ακόλουθο πίνακα.

**Πίνακας 2.5** Επιλογή της μεθόδου αξιολόγησης μιας κορυφής

<i>Ανάπτυξη-εμβαδόν κορυφής</i>	<i>Μελέτη σταθερότητας- ύψος κορυφής</i>
Κατάλληλη για απλά, καλώς διαχωρισμένα μίγματα	Περισσότερο ακριβής/ευαίσθητη από το εμβαδό κορυφής
Απαιτείται λιγότερο συχνά τιτλοδότηση	Απαιτεί λιγότερη διαχωριστική ικανότητα για τις ενώσεις
Γενικά καλύτερη όταν χρησιμοποιείται απλός εξοπλισμός	Επηρεάζεται περισσότερο από πιθανή αστάθεια του συστήματος
Κατάλληλη για μη συμμετρικές κορυφές	Κατάλληλη για περίπλοκα συστήματα Χρησιμοποιείται σε αναλύσεις ιχνοποσοτήτων

## 2.8 Επικύρωση Μεθόδου

Οι αναλυτικές μέθοδοι που περιλαμβάνουν χρωματογραφικές και μη-χρωματογραφικές τεχνικές συνήθως παράγουν αξιόπιστες και ακριβείς

πληροφορίες κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης ενός φαρμάκου και της προέγκρισης ενός φαρμακευτικού προϊόντος. Οι έλεγχοι, γενικά, περιλαμβάνουν την αποδοχή των πρώτων υλών, την αποδέσμευση της δραστικής ουσίας και του τελικού προϊόντος, έλεγχοι κατά την διάρκεια της παραγωγής και ανάλυση της σταθερότητας των δειγμάτων για την τεκμηρίωση της ημερομηνίας λήξης. Συνεπώς, μέθοδοι ελέγχου που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της ενδοτικότητας (compliance) φαρμακευτικών προϊόντων με εγκεκριμένα κριτήρια αποδοχής θα πρέπει να συμφωνούν με κατάλληλες cGMP τιμές αναφοράς σε ότι αφορά την ακρίβεια (accuracy) και την αξιοπιστία σύμφωνα με τις κανονιστικές αρχές (regulatory agencies)<sup>66,67</sup>.

Η διεύθυνση τροφίμων και φαρμάκων και η διεθνής συνδιάσκεψη εναρμόνισης (ICH) τεχνικών απαιτήσεων για το registration φαρμακευτικών προϊόντων έχει εκδώσει μία σειρά οδηγιών για την επικύρωση αναλυτικών διαδικασιών. Στη φαρμακοποιία των Ηνωμένων Πολιτειών (USP) 23/NF 18, έχει προσδιοριστεί ειδικό κεφάλαιο για την επικύρωση των μεθόδων σταθερότητας. Το κεφάλαιο αυτό περιγράφει λεπτομερώς πως πρέπει να γίνεται η αξιολόγηση συγκεκριμένων παραμέτρων απόδοσης. Γενικά, θεωρείται ότι το κεφάλαιο εφαρμόζεται κυρίως σε χρωματογραφικές μεθόδους ανάλυσης και για τις μη χρωματογραφικές διαδικασίες συνήθως χρησιμοποιούνται τροποποιημένες οδηγίες. Ωστόσο, στην USP 23/NF 18 δε γίνεται τέτοιος διαχωρισμός. Θα πρέπει όμως να δίνεται προσοχή στην επιλογή των παραμέτρων απόδοσης, επίσης, οι μέθοδοι που περιγράφονται στην παρούσα USP δεν είναι μέθοδοι εκ φύσεως προτεινόμενης σταθερότητας (stability indicating). Για το λόγο αυτό, για την παρακολούθηση μελετών σταθερότητας, οι οδηγίες που παρατίθενται στο γενικό κεφάλαιο της Αμερικανικής Φαρμακοποιίας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επικύρωση αυτών των μεθόδων.

Η επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου είναι η διαδικασία προσδιορισμού της καταλληλότητας μιας συγκεκριμένης μεθοδολογίας ώστε η υπό διερεύνηση μέθοδος να ικανοποιεί τις απαιτήσεις για τον σκοπό για τον οποίο προορίζεται. Η επικύρωση μιας μεθόδου δεν είναι απλά μία διαδικασία μετρήσεων αλλά μέτρηση της απόδοσης ολόκληρου του αναλυτικού συστήματος. Οι παράγραφοι 211.165 (c) και 211.194 (a) της cGMP για την επικύρωση μεθόδου καθορίζει ότι κάθε μέθοδος που υιοθετείται στο στάδιο της ανάπτυξης

ενός προϊόντος θα πρέπει να διακριβώνεται κάτω από πραγματικές συνθήκες χρήσης και οι επακόλουθες παράμετροι της υπάρχουσας μεθοδολογίας θα πρέπει να υπόκειται σε επικύρωση. Η Αμερικανική Φαρμακοποιία αναφέρει ότι επικύρωση είναι η διαδικασία τεκμηρίωσης ότι η μέθοδος κάνει αυτό για το οποίο έχει σχεδιαστεί, δηλαδή, η διαδικασία της μεθόδου επικύρωσης διασφαλίζει ότι η προτεινόμενη αναλυτική μεθοδολογία είναι ακριβής, ειδική, αναπαραγώγιμη και ανθεκτική για τον σκοπό για τον οποίο προορίζεται.

**Πρωτόκολλο Επικύρωσης.** Στις οδηγίες της ICH (Q2B) που αφορούν τη μεθοδολογία της επικύρωσης μεθόδου, ο αιτών καθίσταται υπεύθυνος για το κατάλληλο πρωτόκολλο επικύρωσης και τη διαδικασία για το προϊόν τους<sup>68</sup>. Για το λόγο αυτό πριν την έναρξη μιας μελέτης επικύρωσης απαιτείται ένα καλά σχεδιασμένο πρωτόκολλο επικύρωσης. Αυτό πρέπει να αποτελείται από πειραματικό σχεδιασμό και παραμέτρους προς επικύρωση της προτεινόμενης μεθόδου οι οποίες έχουν αξιολογηθεί για την επιστημονική αρτιότητα και πληρότητα από ποιοτικά στοιχεία και έχουν εγκριθεί από κατάλληλη διευθυντική αρχή. Το πρωτόκολλο επικύρωσης περιλαμβάνει τη διαδικασία ελέγχου, το βασικό πειραματικό σχεδιασμό, τα στοιχεία για επικύρωση, τα οριοθετημένα κριτήρια αποδοχής, τις βιβλιογραφικές αναφορές σχετικών μεθόδων και τη διευθυντική έγκριση.

Η διαδικασία ελέγχου είναι η περιγραφή της αναλυτικής μεθόδου που χρησιμοποιείται ως οδηγός κατά την επικύρωση της μεθόδου και αποτελεί τη βάση για την προετοιμασία της επικύρωσης του πρωτοκόλλου και περιλαμβάνει τα ακόλουθα:

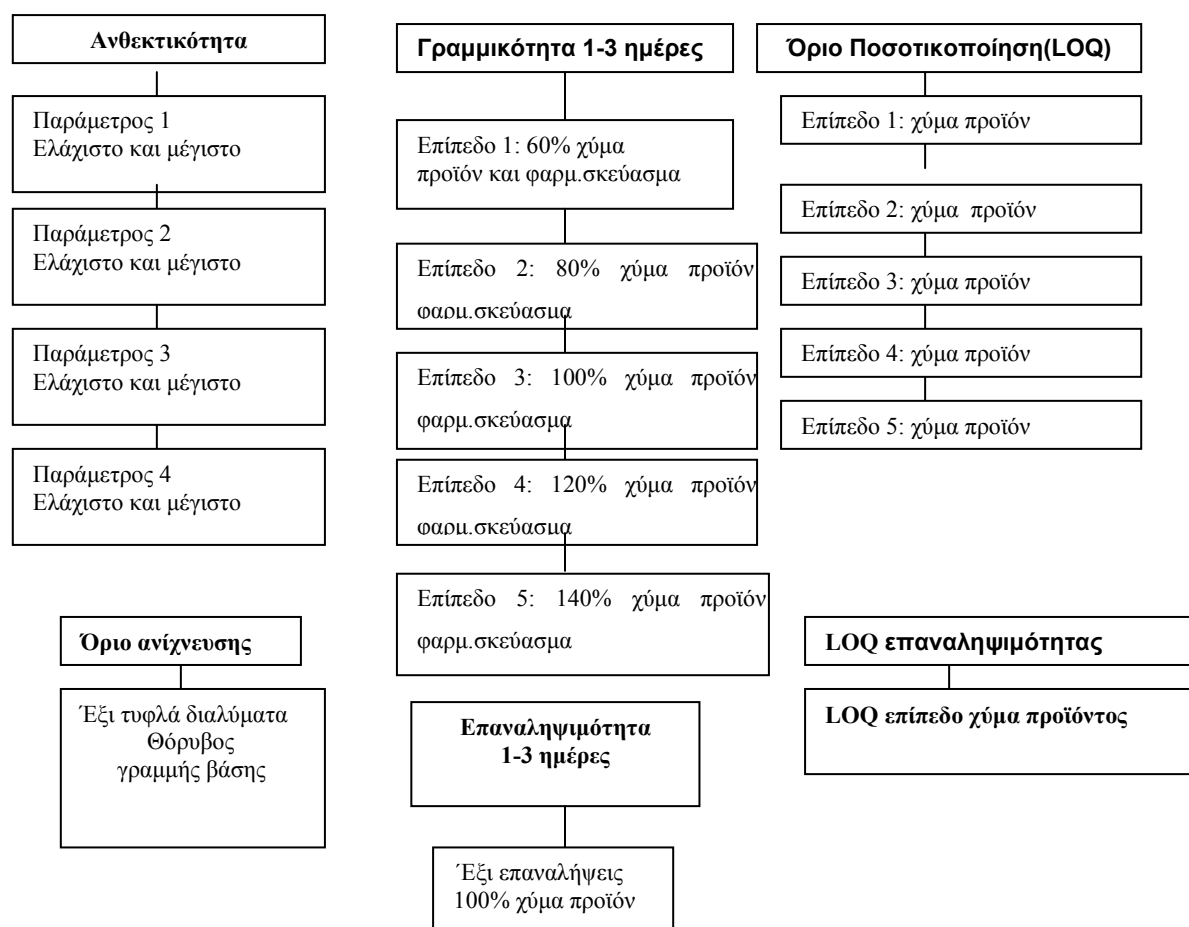
- Μια λίστα αντιδραστηρίων, διαλυτών, και άλλων προμηθειών
- Οδηγίες για την παρασκευή των διαλυμάτων αναφοράς και των δειγμάτων
- Λίστα του εξοπλισμού που θα χρησιμοποιηθεί
- Οργανολογικές παραμέτρους και χρωματογραφικές συνθήκες
- Απαιτήσεις για την καταλληλότητα του συστήματος
- Ανάλυση σειράς διαλυμάτων αναφοράς και δειγμάτων
- Παράγραφο που περιλαμβάνει υπολογισμούς και μορφοποίηση των αποτελεσμάτων

Πριν τη σχεδίαση του πειραματικού σχεδιασμού ή του πρωτοκόλλου, είναι σημαντικό να γίνονται μερικές βασικές υποθέσεις όπως προτείνεται από τους Swartz και Krull. Αυτές οι υποθέσεις περιλαμβάνουν:

- Η ειδικότητα ή εκλεκτικότητα της υπό ανάπτυξης μεθόδου έχει αποδειχθεί. (δηλαδή η διάσπαση σε ακραίες συνθήκες έχουν ήδη πραγματοποιηθεί)
- Η υπό ανάπτυξη μέθοδος έχει βελτιστοποιηθεί μέχρι το σημείο όπου η επένδυση χρόνου και προσπάθειας στην επικύρωση είναι δικαιολογημένη και εφικτή.
- Η αξιολόγηση των παραγόμενων πληροφοριών από την υπό ανάπτυξη μέθοδο πραγματοποιείται μέσω έγκυρων στατιστικών προσεγγίσεων ώστε να εξαλείφεται κάθε υποκειμενικότητα της επικύρωσης της μεθόδου.

Έχοντας υπόψη τις παραπάνω υποθέσεις, τις οδηγίες της παρούσας ICH μεθοδολογίας και τις απαιτήσεις για την επικύρωση που εξαρτώνται από τον τύπο της αναλυτικής μεθόδου μπορεί να σχεδιαστεί ένα βήμα προς βήμα πρωτόκολλο. Ένα χαρακτηριστικό πρωτόκολλο που έχει σχεδιαστεί από τους Swartz και Krull <sup>65</sup>απεικονίζεται στο σχήμα 14. Η πρώτη παράμετρος που αξιολογείται είναι η αντοχή της μεθόδου. Αυτή η παράμετρος συνήθως αξιολογείται κατά το στάδιο της ανάπτυξης της μεθόδου, όταν μελετώνται διαφορετικές παράμετροι στην εκλεκτικότητα της μεθόδου. Η αντοχή της μεθόδου μπορεί να αξιολογηθεί με μια σταδιακή μονοπαραμετρική προσέγγιση ή ως τμήμα ενός πειραματικού σχεδιασμού ενσωματώνοντας πολυπαραμετρικές παραμέτρους. Στη συνέχεια πραγματοποιείται έλεγχος της γραμμικότητας σε πέντε επιπέδων συγκεντρώσεων για την δραστική ουσία και για το φαρμακευτικό προϊόν. Σύγκριση των αποτελεσμάτων των παραπάνω μετρήσεων πραγματώνει τις απαιτήσεις για την ακρίβεια. Ένα ελάχιστο τριών μετρήσεων σε κάθε επίπεδο θα πρέπει να γίνεται. Στο τέλος της πρώτης ημέρας, θα πρέπει να γίνεται-τουλάχιστον- έξι επαναλήψεις στο 100% της συγκέντρωσης της δραστικής ουσίας για την επαναληψιμότητα του συστήματος. Τα βήματα 1 και 2 επαναλαμβάνονται για τον έλεγχο της ενδιάμεσης ακρίβειας (intermediate precision). Το όριο ανίχνευσης (DL) και το όριο ποσοτικοποίησης (QL) μπορούν να προσδιοριστούν εάν απαιτείται. Για τους υπολογισμούς των παραπάνω χαρακτηριστικών απόδοσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν κριτήρια σύμφωνα με την USP ή τις οδηγίες ICH (Q2B). Θα πρέπει να αναφερθεί ότι το πρωτόκολλο του σχήματος 2.3 είναι μόνο ένα

γενικό παράδειγμα και ειδικά πρωτόκολλα ή SOPs θα πρέπει να τεκμηριώνονται και να ακολουθούνται για την συγκεκριμένη μέθοδο και για το σκοπό για τον οποίο προορίζεται.



**Σχήμα 2.3.** Πρωτόκολλο επικύρωσης μεθόδου δειγμάτων

### 2.8.1 Παράμετροι επικύρωσης

Πριν τη διεξαγωγή μελετών επικύρωσης, είναι επιβεβλημένο να προσδιοριστεί ποιες παράμετροι απαιτείται να μελετηθούν. Αυτές οι παράμετροι καλούνται “αναλυτικά χαρακτηριστικά απόδοσης”. Τα περισσότερα από αυτά χρησιμοποιούνται καθημερινά σε ένα εργαστήριο, ωστόσο, μπορεί να ερμηνεύονται διαφορετικά σε διαφορετικές εργαστηριακές ομάδες. Επομένως, είναι σημαντική η πλήρης κατανόηση της ορολογίας και του προσδιορισμού αυτών των χαρακτηριστικών.

Η επιλογή των επιθυμητών χαρακτηριστικών απόδοσης εξαρτάται από τον τύπο της αναλυτικής μεθόδου και από τον σκοπό για τον οποίο προορίζεται. Για παράδειγμα, μια μέθοδος που έχει σχεδιαστεί για τον προσδιορισμό της αποδέσμευσης του τελικού προϊόντος δεν θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί για τον



προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης ή ποσοτικοποίησης του δραστικού προϊόντος. Ωστόσο, εάν η μέθοδος έχει σχεδιαστεί για την παρακολούθηση ιχνοποσοτήτων του δραστικού συστατικού, τότε γνώση των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης είναι απαραίτητα.

Η επιλογή των παραμέτρων προς επικύρωση για κάθε προσδιορισμό ή μέθοδο ελέγχου ποικίλει ανάλογα με την περίπτωση ώστε να εξασφαλίζεται ότι οι παράμετροι είναι κατάλληλες για τον σκοπό για τον οποίο προορίζονται. Αυτό είναι ακόμη πιο σημαντικό για την επικύρωση ενδεικτικών μεθόδων σταθερότητας διότι η επικύρωση σε αυτές τις περιπτώσεις είναι περίπλοκη καθώς συμπεριλαμβάνουν μελέτες διάσπασης σε ακραίες συνθήκες, εμβολιασμό των δειγμάτων με γνωστές προσμίξεις και βιβλιογραφική έρευνα.

### **2.8.2 Επικύρωση μεθόδων κατά την Αμερικανική Φαρμακοποιία**

Τα τυπικά αναλυτικά χαρακτηριστικά απόδοσης πώς προσδιορίζονται, και τι πληροφορίες απαιτούνται για την απόδειξη της επικύρωσής τους με βάση τον σκοπό για τον οποίο προορίζονται περιγράφονται αναλυτικά στην Αμερικανική Φαρμακοποιία. Τα χαρακτηριστικά απόδοσης περιγράφονται σε 8 βήματα που απαιτούνται για την επικύρωση μεθόδου και περιλαμβάνουν: την ακρίβεια, την επαναληψιμότητα, την ειδικότητα, το όριο ανίχνευσης (DL), το όριο ποσοτικοποίησης (QL), τη γραμμικότητα και το εύρος συγκεντρώσεων καθώς και την ενδοεργαστηριακή (robustness) και διεργαστηριακή (ruggedness) αναπαραγωγιμότητα. Οι περισσότεροι συνηθισμένοι έλεγχοι και προσδιορισμοί έχουν διαιρεθεί σε τέσσερις κατηγορίες ώστε να υπάρχει εναρμόνιση με τις οδηγίες του Διεθνούς Οργανισμού Εναρμόνισης (ICH):

Κατηγορία I: Αναλυτικές μέθοδοι για τον ποσοτικό προσδιορισμό των κύριων συστατικών μη συσκευασμένου φαρμακευτικού προϊόντος ή δραστικών συστατικών (συμπεριλαμβανομένου και των συντηρητικών) σε τελικό προϊόν.

Κατηγορία II: Αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό προσμίξεων μη συσκευασμένου φαρμακευτικού προϊόντος ή προϊόντων διάσπασης σε τελικό προϊόν, συμπεριλαμβανομένου ποσοτικών προσδιορισμών και των ελέγχων ορίων.

Κατηγορία III: Αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών απόδοσης όπως είναι η αποδέσμευση του φαρμάκου, η διαλυτότητα κ.α.

Κατηγορία IV: Έλεγχοι ταυτότητας

Οι αναλυτικές παράμετροι που συνήθως απαιτούνται για την επικύρωση της μεθόδου σε κάθε μία από τις παραπάνω περιπτώσεις παρατίθενται στον πίνακα 2.6.

**Πίνακας 2.6** Διαδικασίες που απαιτούνται για την επικύρωση αναλυτικών μεθόδων σύμφωνα με τις προδιαγραφές της USP

Αναλυτικές παράμετροι	Προσδιορισμοί κατηγορίας II				
	Προσδιορισμοί κατηγορίας I	Ποσοτικοί προσδιορισμοί	Έλεγχοι ορίων	Προσδιορισμοί κατηγορίας III	Προσδιορισμοί κατηγορίας IV
Ακρίβεια	ναι	ναι	*	*	όχι
Επαναληψιμότητα	ναι	ναι	όχι	ναι	όχι
Ειδικότητα	ναι	ναι	ναι	*	ναι
Όριο ανίχνευσης	όχι	όχι	ναι	*	όχι
Όριο ποσοτικοποίησης	όχι	ναι	όχι	*	όχι
Έλεγχος γραμμικότητας	ναι	ναι	όχι	*	όχι
Εύρος συγκεντρώσεων	ναι	ναι	*	*	όχι

\*Πιθανότητα να εξαρτάται από τη φύση του συγκεκριμένου ελέγχου

### 2.8.3 Οδηγίες του διεθνούς οργανισμού εναρμόνισης (ICH) για την επικύρωση αναλυτικής μεθόδου

Οι οδηγίες του διεθνούς οργανισμού εναρμόνισης ICH για την επικύρωση αναλυτικών μεθόδων αναπτύχθηκαν από μία ειδική ομάδα για τις απαιτήσεις της καταχώρισης, αξιολόγησης και αδειοδότησης φαρμακευτικών προϊόντων (registration). Αυτά τα έγγραφα παρουσιάζουν τα υπό εξέταση χαρακτηριστικά κατά την επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων που περιλαμβάνονται ως μέρος των αιτήσεων για το registration φαρμακευτικών προϊόντων που έχουν υποβληθεί για την Ευρωπαϊκή Ένωση, την Ιαπωνία, και τις Ηνωμένες Πολιτείες. Η μεθοδολογία της επικύρωσης μιας αναλυτικής πορείας έχει διαιρεθεί σε τρεις κατηγορίες: έλεγχοι ταυτότητας, έλεγχοι ποσοτικών προσδιορισμών προσμίξεων και έλεγχοι ορίων προσμίξεων, έλεγχοι ποσοτικών προσδιορισμών του φαρμακευτικού υποστρώματος ή του τελικού προϊόντος ή άλλων επιλεγμένων συστατικών του φαρμακευτικού προϊόντος. Σύμφωνα με τις οδηγίες του ICH, ο αντικειμενικός σκοπός μιας αναλυτικής πορείας απαιτείται να καθορίζεται με σαφήνεια καθώς αυτό καθορίζει τα υπό

επικύρωση χαρακτηριστικά που χρειάζονται αξιολόγηση. Οι αναλυτικές παράμετροι που συνήθως απαιτούνται για την επικύρωση μιας μεθόδου συνοψίζονται στον πίνακα 2.7

**Πίνακας 2.7** Διαδικασίες που απαιτούνται για την επικύρωση αναλυτικών μεθόδων σύμφωνα με τις προδιαγραφές του διεθνούς οργανισμού εναρμόνισης (ICH)

Τύπος αναλυτικής διαδικασίας	Έλεγχος Προσμίξεων			
	Ταυτοποίηση	Ποσοτικοποίηση	Έλεγχος Ορίων	Προσδιορισμός
Ακρίβεια	όχι	ναι	όχι	ναι
Πιστότητα	όχι	ναι	όχι	ναι
Επαναληψιμότητα	όχι	ναι	όχι	ναι
Ενδιάμεση πιστότητα	όχι	ναι	όχι	ναι
Εκλεκτικότητα	ναι	ναι	ναι	ναι
Όριο ανίχνευσης	όχι	ναι	ναι	όχι
Όριο ποσοτικοποίησης	όχι	ναι	όχι	όχι
Γραμμικότητα	όχι	ναι	όχι	ναι
Εύρος συγκεντρώσεων	όχι	ναι	όχι	ναι

Οι διαφορές στην USP και ICH ορολογία είναι γενικά ασήμαντες. Ο οργανισμός FDA ήδη εφαρμόζει τις οδηγίες ICH και αναμένεται ότι οι ορισμοί και η ορολογία της ICH θα γίνει μέρος της USP στο κεφάλαιο της επικύρωσης. Είναι πιθανό ότι οι κατηγορίες I και II της USP να ταυτιστεί με τις ICH κατηγορίες που αφορούν τον έλεγχο προσδιορισμού και τον έλεγχο προσμίξεων, αντίστοιχα. Η ICH δεν απευθύνεται μέχρι τώρα σε μεθόδους για χαρακτηριστικά απόδοσης, αλλά περιλαμβάνει αναλυτικές μεθόδους για ταυτοποίηση ενώσεων. Σε αυτήν την ICH κατηγορία, είναι σημαντικό να αποδειχθεί ότι η μέθοδος είναι ειδική για την ένωση που ταυτοποιείται.

#### 2.8.4. Ορισμοί

Στη βιβλιογραφία, υπάρχουν πολλά άρθρα που αφορούν τον ορισμό και τη μετάφραση των παραμέτρων επικύρωσης που απαιτούνται για την επικύρωση ενός προσδιορισμού. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική για την οποία υποβάλλονται αιτήσεις registration φαρμακευτικών προϊόντων είναι η HPLC αντιστρόφου φάσης σε συνδυασμό με ανίχνευση UV. Ως εκ' τούτου, επιλέχθηκε η παραπάνω μέθοδος ως παράδειγμα για την επικύρωση παραμέτρων ανάλυσης. Τα κριτήρια για την επικύρωση της παραπάνω

μεθόδου μπορεί να χρησιμοποιηθούν κατά προσέγγιση και σε άλλες μεθόδους ανίχνευσης και χρωματογραφικές τεχνικές. Για αποδοχή στους ελέγχους αποδέσμευσης ή σταθερότητας η ακρίβεια (accuracy) θα πρέπει να βελτιστοποιείται καθώς η ανάγκη για απόδειξη απόκλισης από την αληθή τιμή είναι μεγάλης σημασίας.

### **Ακρίβεια**

Η ακρίβεια είναι η μέτρηση που αποδεικνύει πόσο κοντά είναι η πειραματική τιμή από την αληθή τιμή. Υπολογίζεται ως το ποσοστό του αναλύτη που έχει ανακτηθεί κατά τον προσδιορισμό ή από εμβολιασμένα δείγματα. Για το φαρμακευτικό προϊόν, αυτό πραγματοποιείται αναλύοντας συνθετικά μίγματα (placebos) εμβολιασμένα με γνωστές ποσότητες του φαρμάκου. Η ακρίβεια θα πρέπει να τεκμηριώνεται σε μία συγκεκριμένη περιοχή συγκεντρώσεων της αναλυτικής πορείας. Για τον προσδιορισμό του φαρμακευτικού υποστρώματος, ωστόσο, οι μετρήσεις της ακρίβειας γίνονται με σύγκριση των αποτελεσμάτων με την ανάλυση ενός διαλύματος αναφοράς ή με σύγκριση των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με εκείνα που προέρχονται από μία δεύτερη καλώς χαρακτηρισμένη ανεξάρτητη διαδικασία, η ακρίβεια της οποίας αναφέρεται ή ορίζεται. Για ποσοτικοποίηση προσμίξεων, η ακρίβεια προσδιορίζεται με εμβολιασμό της φαρμακευτικής ουσίας ή του φαρμακευτικού προϊόντος με γνωστές ποσότητες διαθέσιμων προσμίξεων. Σε περίπτωση που δεν είναι δυνατή η προμήθεια των προσμίξεων ή των προϊόντων διάσπασης γίνεται σύγκριση των αποτελεσμάτων με μια δεύτερη καλώς χαρακτηρισμένη ανεξάρτητη μέθοδο. Ο παράγοντας απόκρισης της φαρμακευτικής ουσίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Άλλη προσέγγιση είναι η πραγματοποίηση ειδικών μελετών διάσπασης σε ακραίες συνθήκες. Επίσης, θα πρέπει να προσδιορίζεται πως η ανεξάρτητη ή το σύνολο των προσμίξεων θα αναφέρονται, για παράδειγμα ως % ποσοστό βάρους/ ποσοστό βάρους ή εμβαδού, σε κάθε περίπτωση ο προσδιορισμός γίνεται με αναφορά τον κύριο αναλύτη.

Ο FDA προτείνει ότι η ανάκτηση θα πρέπει να γίνεται σε συγκεντρώσεις που αντιστοιχούν στο 80%, στο 100% και στο 120% της δηλωμένης ποσότητας όπως αναφέρεται στις οδηγίες για υποβολή δειγμάτων και αναλυτικών αποτελεσμάτων για επικύρωση μεθόδου. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανάκτησης θα πρέπει να γίνονται εις τριπλούν σε κάθε επίπεδο

συγκεντρώσεων 80%, 100% και 120% . Τα αποτελέσματα θα πρέπει να υπολογίζονται ως ποσοστό επί της δηλωμένης ποσότητας και ο μέσος όρος των μετρήσεων μαζί με το % RSD για κάθε επίπεδο συγκεντρώσεων αναφέρεται για την απόδειξη της ακρίβειας και της πιστότητας (precision) της ανάλυσης των δειγμάτων.

Οι οδηγίες κατά ICH, προτείνουν αξιολόγηση της ακρίβειας σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων σε συγκεκριμένη περιοχή, τρία επίπεδα συγκεντρώσεων και τρεις επαναλήψεις σε κάθε επίπεδο του συνόλου της αναλυτικής πορείας. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να αναφέρονται ως ποσοστό ανάκτησης του γνωστού προστιθέμενου ποσού ή ως η διαφορά μεταξύ της μέσης και της αληθούς τιμής με αναφορά σε διαστήματα εμπιστοσύνης.

### **Πιστότητα (precision)**

Η πιστότητα είναι η μέτρηση που αποδεικνύει την εγγύτητα των αποτελεσμάτων για έναν αριθμό μετρήσεων κάτω από τις ίδιες αναλυτικές συνθήκες. Ουσιαστικά η πιστότητα αναφέρεται στην κατανομή των αποτελεσμάτων ανεξάρτητων μετρήσεων γύρω από την μέση τιμή. Η πιστότητα συνήθως εκφράζεται ως ποσοστό σχετικής τυπικής απόκλισης (% RSD) για στατιστικά σημαντικό αριθμό δειγμάτων. Ο FDA αλλά και ο ICH προτείνουν ότι η πιστότητα θα πρέπει να μετρείται σε τρία διαφορετικά επίπεδα. Δεν υπάρχει ανάλογη αναφορά στην USP.

### **Επαναληψιμότητα (repeatability)**

Η επαναληψιμότητα εκφράζει τα αποτελέσματα που λαμβάνονται κατά την εφαρμογή της μεθόδου σε μικρό χρονικό διάστημα κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Η επαναληψιμότητα επίσης ορίζεται ως εντός της ημέρας πιστότητα. Σύμφωνα με τον οργανισμό FDA, η επαναληψιμότητα εκτιμάται για την απόδοση του βρόχου εισαγωγής δείγματος και για την ανάλυση των δειγμάτων. Για την επαναληψιμότητα του βρόχου, θα πρέπει να γίνονται τουλάχιστον 10 ενέσεις με RSD όχι περισσότερο από  $\pm 1\%$ . Ομοίως, για τις μεθόδους που αφορούν την αποδέσμευση του δραστικού συστατικού και τις μελέτες σταθερότητας, η τιμή του RSD δεν μπορεί να είναι μεγαλύτερος από  $\pm 1\%$  για τουλάχιστον πέντε ενέσεις δείγματος. Για χαμηλό επίπεδο συγκέντρωσης προσμίξεων, μεγαλύτερες διακυμάνσεις στην τιμή του RSD είναι αποδεκτή. Για ανάλυση επαναληψιμότητας, ο προσδιορισμός γίνεται με πολλαπλές μετρήσεις του δείγματος για τον ίδιο αναλύτη κάτω από τις ίδιες αναλυτικές

συνθήκες. Ο FDA προτείνει ότι η παραπάνω μελέτη θα πρέπει να γίνεται σε συνδυασμό με την ακρίβεια. Ο ICH προτείνει ότι η επαναληψιμότητα θα πρέπει να προσδιορίζεται από την μέτρηση τουλάχιστον εννέα μετρήσεων που καλύπτουν ένα συγκεκριμένο εύρος συγκεντρώσεων δηλαδή τρία επίπεδα, τρεις επαναλήψεις για κάθε ένα ή από τουλάχιστον έξι μετρήσεις στο 100% της επιθυμητής συγκέντρωσης.

### **Ενδιάμεση πιστότητα (intermediate precision)**

Η ενδιάμεση ακρίβεια εκφράζει τις ενδοεργαστηριακές μεταβλητές. Αυτό αρχικά αποδόθηκε ως μέρος της ανθεκτικότητας μιας μεθόδου (ruggedness). Αυτή η παράμετρος αξιολογεί την αξιοπιστία μιας μεθόδου σε ένα περιβάλλον διαφορετικό από αυτό που χρησιμοποιήθηκε στο στάδιο της ανάπτυξης της μεθόδου. Εξαρτώμενη από το χρόνο και τις πρώτες ύλες, η μέθοδος μπορεί να αξιολογηθεί σε διαφορετικές ημέρες, από διαφορετικούς αναλυτές και εξοπλισμό κ.α. Ο FDA προτείνει προσδιορισμό της ακρίβειας σε δύο διαφορετικές περιπτώσεις για την απόδειξη της ενδιάμεσης ακρίβειας της μεθόδου. Ο ICH προτείνει την χρήση ενός πειραματικού σχεδιασμού ώστε οι επιδράσεις, εάν υπάρχουν, των ανεξάρτητων μεταβλητών της αναλυτικής πορείας να μπορούν να παρακολουθηθούν.

### **Αναπαραγωγιμότητα (reproducibility)**

Η αναπαραγωγιμότητα αποτιμάται με την διεξαγωγή κοινών μελετών μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων. Σύμφωνα με τον οργανισμό FDA, η αναπαραγωγιμότητα δεν απαιτείται εάν έχει επιτευχθεί η ενδιάμεση ακρίβεια. Ο ICH προτείνει ότι πρέπει να γίνονται μελέτες για την αναπαραγωγιμότητα όταν είναι επιθυμητή η προτυποποίηση της αναλυτικής πορείας, για παράδειγμα, για την συμπερίληψη πειραματικών πορειών στις φαρμακοποιίες. Ο ICH προτείνει επίσης τα έγγραφα που αποδεικνύουν οποιονδήποτε τύπο πιστότητας θα πρέπει να περιλαμβάνει την τυπική απόκλιση (S), την % RSD, τον συντελεστή μεταβλητότητας και το διάστημα εμπιστοσύνης.

### **Ειδικότητα/Εκλεκτικότητα (Specificity/Selectivity)**

Οι παραπάνω όροι συχνά χρησιμοποιούνται ισοδύναμα. Η ειδικότητα, γενικά χρησιμοποιείται για να εκφράσει την απόκριση της μεθόδου σε έναν αναλύτη, ενώ ο όρος εκλεκτικότητα δηλώνει το βαθμό στον οποίο η μέθοδος μπορεί να προσδιορίσει μια συγκεκριμένη ένωση στο υπό ανάλυση μίγμα χωρίς την παρεμπόδιση των άλλων συστατικών της μήτρας. Η USP ορίζει ως

ειδικότητα την ικανότητα μέτρησης ενός συγκεκριμένου αναλύτη με ακρίβεια υπό την παρουσία και άλλων συστατικών του μίγματος τα οποία θα μπορούσαν να είναι άλλα δραστικά συστατικά, έκδοχα, προσμίξεις και προϊόντα διάσπασης. Σύμφωνα με τον ICH, η πορεία επικύρωσης θα πρέπει να αποδεικνύει την ικανότητα της μεθόδου ότι μπορεί να αποτιμώ με σαφήνεια τον αναλύτη υπό την παρουσία και άλλων προσμίξεων, συστατικών της μήτρας και προϊόντων διάσπασης. Σε περίπτωση που η μέθοδος δεν παρουσιάζει ειδικότητα, το μειονέκτημα αυτό μπορεί να αντισταθμιστεί με άλλες υποστηρικτικές τεχνικές όπως είναι η TLC.

Η ειδικότητα, σύμφωνα με τον ICH, μπορεί να διαιρεθεί σε δύο κατηγορίες:

A. Έλεγχοι ταυτότητας. Η ειδικότητα αποδεικνύεται με την ικανότητα της μεθόδου να διακρίνει μεταξύ ενώσεων που εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα στη δομή τους, και είναι πιθανή η παρουσία τους στο μίγμα. Μία άλλη προσέγγιση γίνεται με σύγκριση των αποτελεσμάτων με ενώσεις αναφοράς.

B. Έλεγχοι προσδιορισμού και προσμίξεων. Για ελέγχους προσδιορισμού και προσμίξεων, η ειδικότητα μπορεί να αποδειχθεί με διαχωρισμό δύο ενώσεων οι οποίες εκλούνται πολύ κοντά. Για μη ειδικούς προσδιορισμούς, η συνολική ειδικότητα αποδεικνύεται με τη χρήση άλλων αναλυτικών πορειών. Για παράδειγμα, όταν μια ογκομέτρηση υιοθετείται για τον προσδιορισμό της αποδέσμευσης μιας φαρμακευτικής ουσίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένας συνδυασμός ελέγχων προσδιορισμού και κατάλληλου ελέγχου προσμίξεων.

Η ICH απευθύνεται επίσης σε θέματα ειδικότητας μεθόδων για τον προσδιορισμό προσμίξεων. Η προσέγγιση είναι ανάλογη με εκείνη που εφαρμόζεται στις περιπτώσεις των μεθόδων προσμίξεων και προσδιορισμού. Εάν οι προσμίξεις είναι εμπορικώς διαθέσιμες, τότε θα πρέπει να αποδεικνύεται ότι ο προσδιορισμός είναι ανεπηρέαστος από την παρουσία εμβολιασμένων υλικών όπως είναι έκδοχα ή/και προσμίξεων. Για έναν έλεγχο προσμίξεων, ο διαχωρισμός μπορεί να αποδειχθεί με εμβολιασμό δραστικής ουσίας ή φαρμακευτικού προϊόντος με κατάλληλα επίπεδα συγκεντρώσεων των προσμίξεων και αποδεικνύοντας των διαχωρισμό των προσμίξεων της κάθε μίας ανεξάρτητα ή/και από άλλα συστατικά της μήτρας του δείγματος.

Εάν δεν είναι εμπορικώς διαθέσιμες προσμίξεις ή προϊόντα διάσπασης, η ειδικότητα σε αυτήν την περίπτωση μπορεί να αποδειχθεί με σύγκριση των αποτελεσμάτων των ελέγχων με μια δεύτερη καλώς χαρακτηρισμένη

επικυρωμένη πορεία της φαρμακοποιίας ή άλλη ανεξάρτητη μέθοδο. Για ελέγχους προσδιορισμών, τα αποτελέσματα θα πρέπει να είναι συγκρίσιμα. Για ελέγχους προσμίξεων, το χρωματογραφικό προφίλ θα πρέπει να συγκριθεί κορυφή προς κορυφή.

Στην περίπτωση των προσδιορισμών που προτείνονται ως ενδεικτικοί για σταθερότητα (stability-indicating assays) όπου η δραστικότητα ενός φαρμάκου και οι προσμίξεις προσδιορίζονται άμεσα, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η ισορροπία μαζών. Κάθε μείωση στη δραστικότητα μπορεί να ερμηνευτεί από την εξίσωση μάζας.

Σύμφωνα με τη Διεύθυνση Ελέγχου Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA Reviewer Guidance), η ειδικότητα/εκλεκτικότητα τεκμηριώνεται αποδεικνύοντας ότι ο αναλύτης δεν παρεμποδίζεται από εξωγενή συστατικά και διαχωρίζεται σαφώς από αυτά. Ένα αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα που αποδεικνύει το διαχωρισμό εξωγενών κορυφών από την κύρια κορυφή είναι αναγκαίο για την υποβολή αίτησης για την επικύρωση της μεθόδου. Η προέλευση των εξωγενών κορυφών οφείλονται συνήθως στην συνθετική πορεία και ενδεχομένως να είναι υπολείμματα διαλυτών ή άλλα συστατικά που εκχυλίζονται από το φυσικό προϊόν. Για το φαρμακευτικό προϊόν, οι πηγές των εξωγενών κορυφών περιλαμβάνουν κάθε είδους προσμίξεις, προϊόντα διάσπασης, αλληλεπιδράσεις της δραστικής ουσίας με τα έκδοχα, υπολείμματα διαλυτών κ.α.

### **Μελέτες σταθερότητας σε συνθήκες επιταχυνόμενης διάσπασης (forced degradation)**

Το ερώτημα που εγείρεται είναι το εξής: αν καμία εξωγενής κορυφή δεν παρατηρείται, πια προσέγγιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απόδειξη της ειδικότητας/εκλεκτικότητας και τη φύση ενδεικτικής σταθερότητας της προτεινόμενης μεθόδου; Ο FDA αλλά και ο ICH προτείνουν μελέτες ή ελέγχους διάσπασης της δραστικής ουσίας και του φαρμακευτικού προϊόντος. Για τις μελέτες αυτές προτείνονται, όξινη και βασική υδρόλυση, επίδραση της θερμοκρασίας, φωτόλυση και οξειδωση. Τόσο ο ICH όσο και ο FDA guidance δεν προσδιορίζουν πως θα πρέπει να διεξαχθούν οι παραπάνω μελέτες. Οι πειραματικές συνθήκες και ο σχεδιασμός αυτών των μελετών αφήνεται στην κρίση των φαρμακευτικών εταιρειών. Για την απόδειξη ότι η χρωματογραφική κορυφή του αναλύτη προήλθε από την κατεργασία σε βίαιες συνθήκες



προτείνονται από τους ICH και FDA να γίνονται έλεγχοι καθαρότητας της κορυφής, στην περίπτωση αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων. Γενικά, προτείνεται ότι θα πρέπει να επιτυγχάνεται το 20-30% της αποικοδόμησης ενός αναλύτη σε ένα μέσον.

### **Όριο ανίχνευσης (DL)**

Το όριο ανίχνευσης (DL) είναι η μικρότερη συγκέντρωση του αναλύτη που μπορεί να ανιχνευθεί, αλλά όχι απαραίτητα να ποσοτικοποιηθεί, υπό τις επίσημες πειραματικές συνθήκες της μεθόδου. Είναι μία παράμετρος ελέγχου ορίου και προσδιορίζει εάν ένας αναλύτης είναι πάνω ή κάτω από ένα ορισμένο όριο.

Για ενόργανες μεθόδους, μπορεί να προσδιοριστεί ο λόγος σήμα προς θόρυβο και συγκρίνοντας τα αποτελέσματα του ελέγχου των δειγμάτων σε γνωστές συγκεντρώσεις του αναλύτη με τα αποτελέσματα που προέρχονται από ανάλυση τυφλών δειγμάτων και προσδιορισμό της μικρότερης συγκέντρωσης του αναλύτη που μπορεί να προσδιοριστεί αξιόπιστα. Η αναλογία σήματος προς θόρυβο θα πρέπει να είναι 2:1 ή 3:1. Μία άλλη προσέγγιση προσδιορισμού είναι ο υπολογισμός της τυπικής απόκλισης για την ανάλυση ενός αριθμού τυφλών δειγμάτων. Η τυπική απόκλιση πολλαπλασιαζόμενη με έναν παράγοντα, συνήθως 2 ή 3, δίνει μία εκτίμηση του ορίου ανίχνευσης. Για μη ενόργανες μεθόδους, το όριο ανίχνευσης προσδιορίζεται με την ανάλυση δειγμάτων με γνωστές συγκεντρώσεις του αναλύτη. Η ελάχιστη συγκέντρωση στην οποία ο αναλύτης μπορεί να ανιχνευθεί αξιόπιστα είναι το όριο ανίχνευσης.

### **Όριο ποσοτικοποίησης (QL)**

Το όριο ποσοτικοποίησης είναι η ελάχιστη συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα που μπορεί να προσδιοριστεί με αποδεκτή πιστότητα (precision) και ακρίβεια (accuracy) υπό τις επίσημες πειραματικές συνθήκες της μεθόδου. Είναι μια παράμετρος ποσοτικών προσδιορισμών για χαμηλές συγκεντρώσεις ενώσεων σε δείγμα που περιέχει προσμίξεις σε μη συσκευασμένο προϊόν και προϊόντα διάσπασης σε έτοιμα προϊόντα.

Το QL εξαρτάται από τον τύπο της αναλυτικής πορείας δηλ εάν είναι ενόργανη ή μη ενόργανη. Για ενόργανες μεθόδους, μερικές φορές χρησιμοποιείται ο λόγος σήματος προς θόρυβο ίσος προς 10:1 ως QL. Ωστόσο, θα πρέπει να αναφερθεί ότι ο προσδιορισμός του QL βασιζόμενος

στο κριτήριο του λόγου σήματος προς θόρυβο είναι ένας συμβιβασμός μεταξύ της συγκέντρωσης και της απαιτούμενης ακρίβειας και της πιστότητας. Δηλαδή, όταν το QL επίπεδο συγκέντρωσης μειώνεται, η πιστότητα αυξάνεται. Για καλύτερη πιστότητα, θα πρέπει να αναφέρεται μεγαλύτερη συγκέντρωση ως QL. Αυτός ο συμβιβασμός είναι εξαρτώμενος από την αναλυτική μέθοδο και από τον σκοπό για τον οποίο προορίζεται. Όπως και στην περίπτωση του ορίου ανίχνευσης, ο ICH για ποσοτικοποίηση χρησιμοποιεί τον λόγο σήμα προς θόρυβο 10:1. Ωστόσο, αυτή η προσέγγιση μπορεί να εφαρμοστεί μόνον σε αναλυτικές πορείες που εμφανίζουν θόρυβο γραμμής βάσης. Όπως και στην περίπτωση του DL, ο ICH προτείνει τις ίδιες επιλογές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό του QL. Είναι η οπτική αξιολόγηση για μη ενόργανες και ενόργανες μεθόδους. Στην δεύτερη περίπτωση βασίζεται στην τυπική απόκλιση της απόκρισης και στην κλίση. Ο τύπος που χρησιμοποιείται είναι :  $QL = 10 \times SD / \text{κλίση}$

Τα όρια DL και QL δεν θα πρέπει να συγχέονται με την ευαισθησία. Η ευαισθησία ορίζεται από την κλίση της καμπύλης αναφοράς, και επομένως δεν αντιστοιχεί στο ακριβές όριο ανίχνευσης ή ποσοτικοποίησης.

### **Γραμμικότητα**

Η γραμμικότητα μιας αναλυτικής πορείας είναι η ικανότητα μιας μεθόδου να δίνει αποτελέσματα τα οποία είναι ανάλογα της συγκέντρωσης του αναλύτη στο δείγμα εντός μιας δεδομένης κλίμακας συγκεντρώσεων. Η γραμμικότητα γενικά αναφέρεται ως διακύμανση της εξίσωσης παλινδρόμησης υπολογισμένη σύμφωνα με μια τεκμηριωμένη μαθηματική σχέση από τα αποτελέσματα του ελέγχου που προκύπτουν από την ανάλυση δειγμάτων με ποικίλες συγκεντρώσεις του αναλύτη. Το γραμμικό εύρος της ανίχνευσης ακολουθεί το νόμο των Beer&Lambert και είναι εξαρτώμενο από τον αναλύτη και από τον τύπο του χρησιμοποιούμενου ανιχνευτή. Η μέθοδος των ελαχίστων τετραγώνων προτείνεται για την αξιολόγηση της εξίσωσης παλινδρόμησης. Ο συντελεστής συσχέτισης, ο σταθερός όρος  $\gamma$  της καμπύλης παλινδρόμησης και το άθροισμα των τετραγώνων των υπολοίπων θα πρέπει να αναφέρονται. Σύμφωνα με τον FDA το εύρος της γραμμικότητας εξαρτάται από τον σκοπό για τον οποίο προορίζεται η μέθοδος ελέγχου. Για προσδιορισμό περιεκτικότητας, η γραμμικότητα θα πρέπει να βρίσκεται στην περιοχή του 80% έως 100% της συγκέντρωσης στόχου. Το εύρος γραμμικότητας για

προσδιορισμό προσμίξεων βασισμένο στο εμβαδό ως ποσοστό δεν θα πρέπει να είναι μεγαλύτερο από 20% της συγκέντρωσης στόχου. Ο συντελεστής συσχέτισης ( $r^2$ ), ο σταθερός όρος και η κλίση της καμπύλης θα πρέπει να αναφέρονται.

### **Εύρος**

Το εύρος μιας αναλυτικής μεθόδου είναι το διάστημα του ανώτερου και του κατώτερου επιπέδου συγκεντρώσεων του αναλύτη στο οποίο η υπό εξέταση μέθοδος είναι γραμμική, ακριβής και εμφανίζει πιστότητα των αποτελεσμάτων. Το εύρος συνήθως εκφράζεται στις ίδιες μονάδες με εκείνες που λαμβάνονται τα αποτελέσματα της αναλυτικής μεθόδου. Το εύρος της μεθόδου επικυρώνεται με επαλήθευση της αποδεκτής ακρίβειας και πιστότητας που προκύπτουν από την αναλυτική μέθοδο όταν ανάλυση των δειγμάτων που περιέχουν τον αναλύτη πραγματοποιείται εντός των διαστημάτων του εύρους.

### **Ανθεκτικότητα (robustness)**

Η ανθεκτικότητα μιας αναλυτικής πορείας είναι η εκτίμηση της ικανότητας της μεθόδου να παραμένει ανεπηρέαστη από μικρές αλλά σκοπούμενες μεταβολές σε μερικές παραμέτρους παρέχοντας την βεβαιότητα για την αξιοπιστία της μεθόδου κατά την διάρκεια εφαρμογής της. Η ανθεκτικότητα μιας μεθόδου ερευνάται μεταβάλλοντας κάποιες ή όλες τις συνθήκες της μεθόδου, για παράδειγμα, τη σύσταση του οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση, το pH, την ιοντική ισχύ, την θερμοκρασία της στήλης, τον χρόνο ζωής και τον τύπο της στήλης. Ο ICH προτείνει ότι οι μελέτες που αφορούν την ανθεκτικότητα θα πρέπει να διεξάγονται κατά τη διάρκεια της φάσης ανάπτυξης της μεθόδου. Επίσης, εάν οι μετρήσεις επηρεάζονται από τις μεταβολές των αναλυτικών συνθηκών, τότε οι συνθήκες της μεθόδου θα πρέπει να ελέγχονται κατάλληλα ή προληπτικές αναφορές θα πρέπει να περιλαμβάνονται στην μέθοδο ελέγχου. Η ανθεκτικότητα μπορεί επίσης να διασφαλίζεται από τις προδιαγραφές για την καταλληλότητα του συστήματος.

### **Σταθερότητα διαλυμάτων δείγματος και προτύπου**

Ο FDA προτείνει ότι η σταθερότητα του διαλύματος της δραστικής ουσίας που χρησιμοποιείται ως διάλυμα αναφοράς ή του φαρμακευτικού προϊόντος κατόπιν της προετοιμασίας να γίνεται σύμφωνα με την μέθοδο

ελέγχου και να αξιολογείται κατάλληλα. Αυτό θεωρείται σημαντικό καθώς οι περισσότερες HPLC αναλύσεις είναι αυτοματοποιημένες. Κατά τη διάρκεια μιας αναλυτικής μέτρησης, το διάλυμα του δείγματος ή του προτύπου παραμένουν για ώρες στο περιβάλλον του εργαστηρίου πριν τον πλήρη έλεγχο όλων των δειγμάτων. Επομένως, η παρακολούθηση της σταθερότητας του δείγματος ή του προτύπου θα εξασφαλίζει ότι δεν συμβαίνει διάσπαση λόγω υδρόλυσης, φωτόλυσης, ή σύμφυσης στο υάλινο σκεύος κατά την διάρκεια του χρόνου ανάλυσης. Ο FDA προτείνει ότι δεδομένα που υποστηρίζουν την σταθερότητα των διαλυμάτων του δείγματος ή του προτύπου κάτω από κανονικές εργαστηριακές συνθήκες, για ελάχιστο χρόνο 24 ώρες, θα πρέπει να μελετώνται.

### **Προδιαγραφές καταλληλότητας συστήματος**

Η ακρίβεια και η πιστότητα HPLC δεδομένων συλλέγονται από ένα καλώς-συμπεριφερόμενο χρωματογραφικό σύστημα. Οι προδιαγραφές του συστήματος καταλληλότητας και ελέγχων είναι παράμετροι που παρέχουν βοήθεια στην επίτευξη αυτού του στόχου. Σύμφωνα με τον ICH και την USP, ο έλεγχος της καταλληλότητας ενός συστήματος είναι ένα σημαντικό κομμάτι της αναλυτικής πορείας και απαιτείται για την αρτιότητα της μεθόδου. Οι έλεγχοι που πραγματοποιούνται γίνονται για τον προσδιορισμό του διαχωρισμού και της αναπαραγωγιμότητας του συστήματος και θα πρέπει να είναι επαρκής για την ανάλυση που διεξάγεται. Η βάση αυτών των ελέγχων είναι ότι ο εξοπλισμός, οι αναλυτικές λειτουργίες και τα δείγματα που αναλύονται συνιστούν ένα πλήρες σύστημα που μπορεί να αξιολογηθεί συνολικά. Οι παράμετροι του συστήματος καταλληλότητας που πρέπει να αξιολογηθούν για μία συγκεκριμένη διαδικασία εξαρτάται από τον τύπο της πορείας που πρόκειται να επικυρωθεί. Για τη μελέτη αυτών των παραμέτρων όπως για παράδειγμα του αριθμού των θεωρητικών πλακών, του παράγοντα εμφάνισης ουράς και του διαχωρισμού, χρησιμοποιούνται εάν είναι διαθέσιμα τα πρότυπα παραπροϊόντων ή προσμίξεων, σε άλλη περίπτωση θα πρέπει να χρησιμοποιείται χρωματογράφημα από τις μελέτες διάσπασης σε έντονες συνθήκες. Η αναπαραγωγιμότητα εκφράζεται ως η % σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) πέντε ή έξι επαναλαμβανόμενων μετρήσεων και πρέπει να μετρείται και να συγκρίνεται με τα όρια προκαθορισμένων προδιαγραφών. Οι έλεγχοι για την καταλληλότητα του συστήματος πραγματοποιούνται πριν την ανάλυση

των δειγμάτων. Οι παράμετροι για τον έλεγχο της καταλληλότητας του συστήματος μελετώνται με την ανάλυση κατάλληλου δείγματος που αποτελείται από μείγμα της δραστικής ουσίας με τα αναμενόμενα παραπροϊόντα ή γνωστές προσμίξεις.

-

## **Κεφάλαιο 3: Υπέρταση- φάρμακα για τη Θεραπευτική αντιμετώπιση της υπέρτασης: Rasilez HCT**

### **3.1 Υπέρταση**

Αρτηριακή πίεση είναι η δύναμη με την οποία το αίμα πιέζει τα τοιχώματα των αρτηριών μέσα στις οποίες κυκλοφορεί.<sup>67</sup> Η πίεση δεν παραμένει ποτέ σταθερή αλλά έχει διακυμάνσεις κατά την διάρκεια της ημέρας. Όταν οι τιμές της αρτηριακής πίεσης παραμένουν υψηλές για μεγάλο χρονικό διάστημα σημαίνει ότι ο οργανισμός πάσχει από υψηλή αρτηριακή πίεση. Η αρτηριακή πίεση καταγράφεται με δύο αριθμούς που αντιστοιχούν: α) στη συστολική πίεση (κατά την διάρκεια της συστολής της καρδιάς) , β) την διαστολική πίεση (κατά την διαστολή της καρδιάς).

Η υπέρταση είναι μία κατάσταση , στην οποία η αρτηριακή πίεση είναι αυξημένη. Συνήθως δεν έχει συμπτώματα και συχνά την ανακαλύπτουμε μετά από τυχαίες μετρήσεις.

Ένα άτομο θεωρείται υπερτασικό όταν η συστολική του πίεση είναι πάνω από 140mm Hg και η διαστολική του πίεση είναι πάνω από 90mm Hg. Όταν η συστολική πίεση κυμαίνεται σε επίπεδα άνω των 120mm Hg έως 140mm Hg και η διαστολική στα επίπεδα των 80mm Hg με 90mm Hg, το άτομο ανήκει σε προ-υπερτασικό στάδιο. Κάτω από τα προηγούμενα επίπεδα η αρτηριακή πίεση είναι φυσιολογική. Ωστόσο, δεδομένου ότι η αρτηριακή πίεση παρουσιάζει αξιόλογες διακυμάνσεις, πριν το χαρακτηρισμό ενός ατόμου ως υπερτασικού και την έναρξη θεραπείας , πρέπει να γίνουν επανειλημμένες μετρήσεις μέσα σε μία μεγάλη περίοδο, ώστε να επιβεβαιωθεί η αυξημένη τιμή της αρτηριακής πίεσης.

Η διαγνωστική αντιμετώπιση του ασθενούς πρέπει να στοχεύει:

- α) Στην επιβεβαίωση αυξημένων επιπέδων αρτηριακής πίεσεως σε επανειλημμένες μετρήσεις.
- β) Στην εκτίμηση του συνολικού καρδιαγγειακού κινδύνου συνύπαρξη δηλ. και άλλων προδιαθεσικών παραγόντων όπως καπνίσματος, υπερλιπιδαιμίας, παχυσαρκίας, υπερβολικού stress, κληρονομικότητας, έλλειψης σωματικής άσκησης.
- γ) Στην εκτίμηση της πιθανής βλάβης σε όργανα στόχους που η παρατεταμένη αύξηση της πίεσεως προκαλεί.
- δ) Στην ανεύρεση της πιθανής αιτίας που προκαλεί την υπέρταση.

### 3.2 Θεραπευτική αντιμετώπιση

Η υπέρταση είναι ένα πολυσήμαντο πρόβλημα που ανάγεται τόσο σε κοινωνικο-οικονομικό επίπεδο όσο και σε ατομικό επίπεδο.<sup>68</sup> Στο κοινωνικό επίπεδο, σημαντικό ρόλο παίζει η ενημέρωση του πληθυσμού, η προτροπή σε αλλαγή του τρόπου και των συνηθειών της καθημερινότητας, η προτροπή σε προληπτική φροντίδα με τη βοήθεια και καλή εκπαίδευση του κατάλληλου υγειονομικού προσωπικού. Σε ατομικό επίπεδο η αντιμετώπιση της υπέρτασης διακρίνεται σε φαρμακευτική και μη φαρμακευτική.

Η απόφαση για την έναρξη της φαρμακευτικής αγωγής πρέπει να στηρίζεται στο επίπεδο της διακύμανσης της συστολικής και της διαστολικής πίεσης και στην εκτίμηση του συνολικού καρδιαγγειακού κινδύνου. Σε περίπτωση μέτριας και σοβαρής υπέρτασης όπως έχουν ταξινομηθεί από την Παγκόσμια Επιτροπή Υπέρτασης υπάρχει ομοφωνία για την άμεση έναρξη φαρμακευτικής αγωγής ακόμα και σε απουσία άλλων παραγόντων κινδύνου.

Στην πρώτη γραμμή της φαρμακευτικής αντιμετώπισης της υπέρτασης βρίσκονται φάρμακα που ανήκουν στις εξής κατηγορίες:

1. διουρητικά,
2. β-αναστολείς,
3. αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου (α-MEA)
4. ανταγωνιστές ασβεστίου
5. α-αναστολείς

Άλλες ομάδες φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στην υπέρταση είναι τα κεντρικώς δρώντα (με κύριο εκπρόσωπο την κλονιδίνη) και τα περιφερικώς δρώντα συμπαθητικολυτικά (με κύριο εκπρόσωπο τη ρεζερπίνη αλκαλοειδές παράγωγο του φυτού *Rauwolfia serpentina*).

Κατά την εφαρμογή της φαρμακευτικής αγωγής θα πρέπει να δοθεί έμφαση στη χρονιότητα της νόσου και επομένως στη συνέπεια της δια βίου λήψης των φαρμάκων από την πλευρά του ασθενούς. Ο προβληματισμός που δημιουργείται αφορά τη φαρμακευτική ή μη αντιμετώπιση ενός μεγάλου ποσοστού πληθυσμού με ήπια υπέρταση. Και ο προβληματισμός αυτός έχει τόσο ατομικές όσο και κοινωνικοοικονομικές προεκτάσεις. Στην Αμερική

ακολουθούν συνήθως επιθετική αντιμετώπιση με χρόνια χορήγηση φαρμάκων, ακόμα και για την ήπια υπέρταση αυτό οδήγησε στην αύξηση του των ασυμπτωματικών ασθενών με αποτέλεσμα η υπέρταση να αναδειχθεί ως η πιο πολυέξοδη ασθένεια. Μεγάλες πολυκεντρικές μελέτες καταδεικνύουν ότι η υπερκατανάλωση φαρμάκων μπορεί να προκαλέσει θανατηφόρες ή σοβαρές επιπλοκές (όπως η αλόγιστη χρήση διουρητικών μπορεί να οδηγήσει σε θανατηφόρες καρδιακές αρρυθμίες), με αποτέλεσμα να ανατραπεί το όφελος της μείωσης του καρδιαγγειακού θανάτου. Οι επικριτές αυτής της επιθετικής πολιτικής για την ήπια, στηριζόμενοι στα προβλήματα που αναφέρθηκαν θεωρούν ότι το όριο της διάγνωσης δε σηματοδοτεί κατ' ανάγκη και το όριο για τη θεραπεία, ούτε είναι φρόνιμο να πυροβολούμε ό,τι αποκλίνει ελαφρά από τα φυσιολογικά όρια. Αντί των φαρμάκων προτείνουν μια μη φαρμακευτική αντιμετώπιση που στοχεύει στην προτροπή του ατόμου στη μείωση του σωματικού βάρους κυρίως σε συνδυασμό με άσκηση, στον περιορισμό της λήψης αλατιού, στην αλλαγή διαιτητικών συνηθειών στην κατανάλωση τροφών απαλλαγμένων από συντηρητικά, λίπη καθώς και στον τρόπο παρασκευής τους, στη μείωση του άγχους και στην αποφυγή της αλόγιστης κατανάλωσης αλκόολ. Ευνοϊκή επίδραση μπορεί να έχουν τα φυτικά παρασκευάσματα καλίου, μαγνησίου, το λάδι ψαριών και το σκόρδο.

Η πολιτική αυτή της μη φαρμακευτικής αγωγής έχει το πλεονέκτημα :

- Να μην αισθάνεται το άτομο ότι νοσεί
- Να στρέψει την προσοχή του ατόμου στην υγιεινή φροντίδα του εαυτού του ενάντια στις αρνητικές για την υγεία του συνθήκες της εποχής του
- Τέλος, έχει το πλεονέκτημα μιας πιο οικολογικής απάντησης σε μια νόσο, η οποία έχει συντηρήσει τεράστιες φαρμακευτικές βιομηχανίες με συνέπεια την επιβάρυνση σε οικονομικό κόστος και τη ρύπανση του περιβάλλοντος.

### **3.3 Αλισκιρένη και υδροχλωροθειαζίδιο**

#### **Μηχανισμός Δράσης**

Η αλισκιρένη είναι ένας από του στόματος δραστικός, ισχυρός και άμεσος αναστολέας της ρενίνης. Με την αναστολή του ενζύμου της ρενίνης, η αλισκιρένη αναστέλλει το σύστημα ρενίνης-αγγειοτασίνης στο σημείο ενεργοποίησης, εμποδίζοντας τη μετατροπή του αγγειοτασινογόνου σε αγγειοτασίνη I και μειώνοντας τα επίπεδα της αγγειοτασίνης I και της



αγγειοτασίνης II. Ενώ άλλοι παράγοντες οι οποίοι αναστέλλουν το σύστημα ρενίνης-αγγειοτασίνης (αναστολείς ΜΕΑ και αποκλειστές των υποδοχέων της αγγειοτασίνης II), προκαλούν αντισταθμιστική αύξηση στη δραστηριότητα της ρενίνης του πλάσματος, η θεραπεία με αλισκιρένη μειώνει τα επίπεδα της ρενίνης του πλάσματος (PRA) σε υπερτασικούς ασθενείς περίπου κατά 50 με 80%. Παρόμοιες μειώσεις παρατηρήθηκαν όταν η αλισκιρένη συνδυάστηκε με άλλα αντιυπερτασικά. Η αλισκιρένη έχει πιθανή συνεργική δράση όταν συνδυαστεί με θειαζιδικά διουρητικά, αναστολείς του ΜΕΑ ή ανταγωνιστές του ασβεστίου.

Το υδροχλωροθειαζίδιο υπάγεται στην κατηγορία των θειαζιδικών διουρητικών. Μειώνει την επαναπορρόφηση των ηλεκτρολυτών από τα νεφρικά σωληνάκια. Αυτό οδηγεί σε αυξημένη έκκριση νερού και ηλεκτρολυτών, όπως νάτριο, κάλιο, χλώριο και μαγνήσιο. Έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία διαφόρων διαταραχών, συμπεριλαμβανομένων οίδημα, υπέρταση, άπυος διαβήτη και υποπαραθυροειδισμός.

#### **Ενδείξεις – Δοσολογία**

Ο συνδυασμός της αλισκιρένης με το υδροχλωροθειαζίδιο ενδείκνυται σε ασθενείς των οποίων η αρτηριακή πίεση δεν ρυθμίζεται επαρκώς με μόνο αλισκιρένη ή μόνο το υδροχλωροθειαζίδιο. Η αντιυπερτασική δράση εκδηλώνεται σε μεγάλο βαθμό μέσα σε μια εβδομάδα και το μέγιστο αποτέλεσμα διαπιστώνεται μέσα σε 4 εβδομάδες. Η δόση θα πρέπει να εξατομικεύεται και να προσαρμόζεται σύμφωνα με την κλινική ανταπόκριση του ασθενούς. Ενδέχεται να συνιστάται η εξατομικευμένη τιτλοποίηση της δόσης με κάθε μία από τις δύο ουσίες πριν την μετάβαση στο σταθερό συνδυασμό. Όταν ενδείκνυται κλινικά, μπορεί να εξεταστεί το ενδεχόμενο της απευθείας μετάβασης από τη μονοθεραπεία στο σταθερό συνδυασμό.<sup>68</sup>

Σε περιπτώσεις ασθενών με ήπια έως μέτρια νεφρική δυσλειτουργία δεν απαιτείται προσαρμογή της αρχικής δόσης. Ο συνδυασμός της αλισκιρένης με το υδροχλωροθειαζίδιο αντενδείκνυται σε ασθενείς με σοβαρή νεφρική δυσλειτουργία, ενώ πρέπει να χρησιμοποιείται με προσοχή σε ασθενείς με διαταραχή της ηπατικής λειτουργίας. Δεν απαιτείται προσαρμογή της αρχικής δόσης για ασθενείς με ήπια έως μέτρια ηπατική δυσλειτουργία.

### **Φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά: απορρόφηση, κατανομή, μεταβολισμός, κάθαρση**

Οι μέγιστες συγκεντρώσεις της αλισκιρένης στο πλάσμα επιτυγχάνονται σε 1 έως 3 ώρες από την *per os* λήψη του φαρμάκου. Η απόλυτη βιοδιαθεσιμότητά της είναι περίπου 2 έως 3%. Γεύματα με υψηλό περιεχόμενο λιπαρών μειώνουν τη  $C_{max}$  κατά 85% και τη AUC κατά 70%. Σταθερά επίπεδα συγκέντρωσης στο πλάσμα επιτυγχάνονται μέσα σε 5 έως 7 ημέρες με χορήγηση άπαξ ημερησίως.

Η δέσμευση της αλισκιρένης με τις πρωτεΐνες του πλάσματος είναι μέτρια (47-51%) και ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση. Ο χρόνος ημίσειας ζωής είναι 40 ώρες (εύρος 34-41 ώρες). Περίπου το 1,4% της συνολικής δόσης από το στόμα μεταβολίζεται στο ήπαρ μέσω του ηπατικού μικροσωμικού συστήματος, το 0,6 % της δόσης εντοπίζεται στα ούρα και το 78% απεκκρίνεται κυρίως ως αμετάβλητη ουσία στα κόπρανα.

### **Ανεπιθύμητες ενέργειες**

Η αλισκιρένη δεν παρουσιάζει αλληλεπιδράσεις με κλινική σημασία με φαρμακευτικά προϊόντα τα οποία χρησιμοποιούνται συνήθως για τη θεραπεία της υπέρτασης ή του διαβήτη.

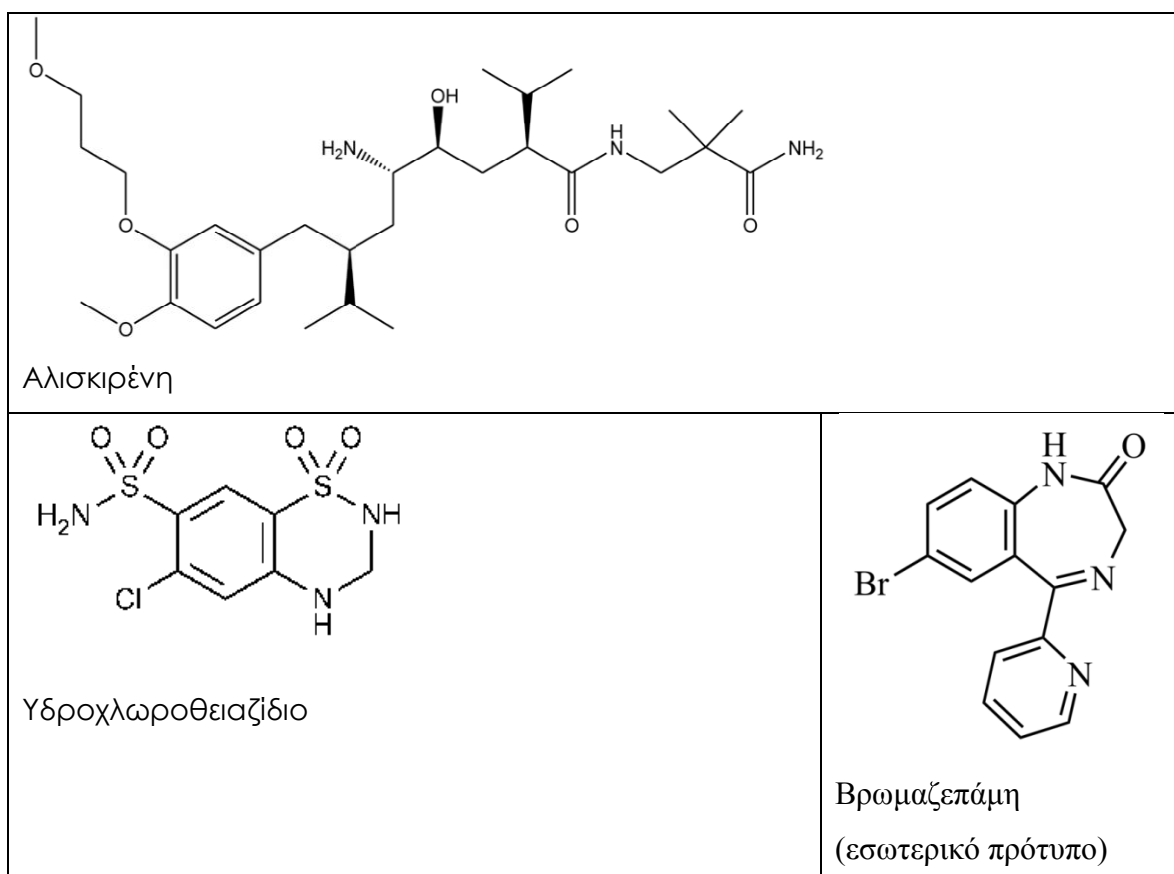
Οι ανεπιθύμητες ενέργειες από τη χορήγηση αλισκιρένης είναι γενικά ήπιες και παροδικές. Η πιο συχνή ανεπιθύμητη ενέργεια του φαρμάκου είναι η διάρροια. Σε περίπτωση εμφάνισης σημείων που υποδηλώνουν αντίδραση υπερευαισθησίας/ αγγειοοίδημα (ιδιαίτερα δυσκολία στην αναπνοή ή στην κατάποση, εξάνθημα, κνησμός, κνίδωση ή οίδημα στο πρόσωπο, στα άκρα, στα μάτια, στα χείλη και/ή στη γλώσσα, ζάλη) οι ασθενείς θα πρέπει να διακόψουν τη θεραπεία και να επικοινωνήσουν με τον γιατρό τους. Κατά την εμπειρία μετά την κυκλοφορία του φαρμάκου έχει παρατηρηθεί αρθραλγία. Σε ορισμένες περιπτώσεις αυτό συνέβη ως συνέπεια της αντίδρασης υπερευαισθησίας.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### Ανάπτυξη και Επικύρωση Μεθόδου Υγροχρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης για τον Ποσοτικό Προσδιορισμό της Αλισκιρένης και του υδροχλωροθειαζιδίου.

#### 4.1 Εισαγωγή

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι η ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αλισκιρένης και του υδροχλωροθειαζιδίου σε δισκία. Ο συνδυασμός της αλισκιρένης με το υδροχλωροθειαζίδιο χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ιδιοπαθούς υπέρτασης σε ασθενείς των οποίων η αρτηριακή πίεση δεν ρυθμίζεται επαρκώς όταν η αλισκιρένη ή το υδροχλωροθειαζίδιο λαμβάνονται ως μονοθεραπεία. Οι χημικές δομές των αναλυτών και της βρωμαζεπάμης (εσωτερικό πρότυπο) παρουσιάζονται στο σχήμα 4.1



**Σχήμα 4.1:** Χημικές δομές των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου

Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα ελάχιστες μέθοδοι σχετικές με τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό της αλισκιρένης και του

υδροχλωροθειαζιδίου. Πρόσφατα, ο ποσοτικός προσδιορισμός της αλισκιρένης σε δισκία επιτεύχθηκε με τη μέθοδο της φασματοφωτομετρίας ορατού-υπεριώδους και της αντίστροφης φάσης υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (RP-HPLC). Έχει επίσης δημοσιευθεί μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της αλισκιρένης, του υδροχλωροθειαζιδίου και της βαλσαρτάνης σε βιολογικά υγρά με την τεχνική της RP-HPLC και ανιχνευτή UV-Vis με μήκος κύματος ανίχνευσης τα 215 nm.<sup>69</sup> Μια ενδιαφέρουσα δημοσίευση είναι η ανάπτυξη και ο ποσοτικός προσδιορισμός της αλισκιρένης με την τεχνική του σχηματισμού φθορισμοφόρων παραγώγων με RP-HPLC. Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκε ως στατική φάση η στήλη Lichrospher 100 RP-8 και ως κινητή φάση ACN: 0.01M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (65:35 v/v). Η ροή που επιλέχθηκε ήταν 0,8 mL min<sup>-1</sup> και με λ<sub>ex</sub> 280 nm και λ<sub>em</sub> 300 nm. <sup>69</sup>

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει αναφορά στη βιβλιογραφία σχετική με τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό της αλισκιρένης και του υδροχλωροθειαζιδίου σε δισκία. Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη και η επικύρωση μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού της αλισκιρένης και του υδροχλωροθειαζιδίου παρουσία των προϊόντων διάσπασης της και η εφαρμογή της αναπτυχθείσας μεθοδολογίας σε αναλύσεις φαρμακευτικών σκευασμάτων. Η προτεινόμενη μέθοδος αξιολογήθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας της και πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες σταθερότητας των αναλυτών σε συνθήκες επιταχυνόμενης διάσπασης.

## **4.2 Αρχή μεθόδου**

Η αλισκιρένη και το υδροχλωροθειαζίδιο προσδιορίζεται σε φαρμακευτικά σκευάσματα που φέρονται στο εμπόριο με την ονομασία Rasilez/Hct. Η αναλυτική μέθοδος περιλαμβάνει σύστημα αντιστρόφου φάσης υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (RP-HPLC) με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού (UV/Vis) σε μήκος κύματος 280nm. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε χρωματογραφική στήλη Phenyl 150 x 2.1mm. Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιείται η βρωμαζεπάμη. Για την ποσοτικοποίηση των αναλυτών στα δισκία εφαρμόζεται η τεχνική του ενός σημείου.

### 4.3 Εξοπλισμός-Οργανολογία

Το σύστημα υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από αντλία ισοκρατικής έκλουσης SpetraSeries της εταιρείας SP ThermoSeparation products και από ένα σύστημα εισαγωγής δείγματος Rheodyne με βρόχο εισαγωγής δείγματος 20  $\mu$ L. Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι Phenyl με διαστάσεις 150 x 2.1 mm και διάμετρο σωματιδίων 5 $\mu$ m της εταιρείας Fortis. Το σύστημα είναι συνδεδεμένο με ανιχνευτή υπεριώδους – ορατού ( UV – Vis ) της εταιρείας Waters μοντέλου 486 ρυθμισμένο σε μήκος κύματος 280nm.

Η κινητή φάση, απαερώθηκε σε συσκευή απαέρωσης Millipore της εταιρείας Waters με διήθηση υπό κενό με φίλτρα νάυλον, της εταιρείας GelmanSciences Ltd., που είχαν μέγεθος πόρων 0,45 $\mu$ m.

Η διαλυτοποίηση των ουσιών σε κατάλληλο διαλύτη για την παρασκευή διαλυμάτων έγινε σε λουτρό υπερήχων της εταιρείας Elma μοντέλου Transonic 460, ενώ η ανάδευση σε Vortex.

Για την παρασκευή των διαλυμάτων, χρησιμοποιήθηκαν μικροπιπέτες Gilson των 200  $\mu$ L και 1000  $\mu$ L.

### 4.4 Αντιδραστήρια

Οι διαλύτες HPLC που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας της εταιρείας Merck. Το οξικό αμμώνιο ήταν αναλυτικής καθαρότητας της εταιρείας Merck. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε ήταν υπερκάθαρο και περαιτέρω απιοντισμένο με χρήση της συσκευής Milli-Q Plus, Millipore SA.

Το υδροχλωροθειαζίδιο και η αλισκιρένη, ήταν φαρμακευτικού βαθμού καθαρότητας και προσφέρθηκαν από την εταιρία Novartis. Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε η βρωμαζεπάμη και ήταν φαρμακευτικού βαθμού καθαρότητας.

Η εφαρμογή της μεθόδου πραγματοποιήθηκε με ανάλυση δισκίων της εταιρείας Novartis που κυκλοφορούν με την εμπορική ονομασία Ralisez/Hct με περιεκτικότητα ανά δισκίο 150 mg αλισκιρένης και 12.5 mg υδροχλωροθειαζιδίου. Τα έκδοχα που περιέχονται σε κάθε δισκίο είναι: μικροκρυσταλλική κυτταρίνη, ποβιδόνη, crosponidone, μονοϋδρική λακτόζη,

άμυλο σίτου, στεατικό μαγνήσιο, άνυδρο κολλοειδές πυρίτιο, τάλκης, υπρομελλόζη, πολυαιθυλενογλυκόλη,  $\text{TiO}_2$  (E171).

#### **4.5 Διαλύματα παρακαταθήκης και εργασίας**

**Διάλυμα παρακαταθήκης Α:** Ζυγίζονται με ακρίβεια 5 mg υδροχλωροθειαζιδίου και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL. Ακολουθεί διάλυση με 50 % v/v ACN:H<sub>2</sub>O σε λουτρό υπερήχων και αραιώση μέχρι χαραγής με τον ίδιο διαλύτη. Παρασκευάζεται έτσι πρότυπο διάλυμα υδροχλωροθειαζιδίου συγκέντρωσης 500 μg/mL.

**Διάλυμα παρακαταθήκης Β:** Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 33.15 mg υδροχλωρικής αλισκιρένης (ισοδύναμη ποσότητα με 30 mg αλισκιρένης) και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των των 25 mL. Στην ίδια ογκομετρική φιάλη προστίθενται ακριβώς 5 mL από το διάλυμα παρακαταθήκης Α ακολουθεί αραιώση μέχρι χαραγής με 50% v/v ACN:H<sub>2</sub>O. Παρασκευάζεται έτσι πρότυπο μεικτό διάλυμα αλισκιρένης και υδροχλωροθειαζιδίου συγκέντρωσης 1200 μg/mL και 100 μg/mL, αντίστοιχα.

**Διάλυμα παρακαταθήκης Γ:** Ζυγίζονται με ακρίβεια 5 mg βρωμαζεπάμης και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 10mL. Ακολουθεί διάλυση με 50% v/v ACN:H<sub>2</sub>O σε λουτρό υπερήχων και αραιώση μέχρι χαραγής με τον ίδιο διαλύτη. Παρασκευάζεται έτσι πρότυπο διάλυμα βρωμαζεπάμης 500 μg/mL.

**Πρότυπο διάλυμα εργασίας Δ:** Ακριβώς 200 μL από το διάλυμα παρακαταθήκης Γ της βρωμαζεπάμης αραιώνονται στα 10 mL οπότε παρασκευάζεται έτσι πρότυπο διάλυμα εργασίας βρωμαζεπάμης 10 μg/mL.

Τα διαλύματα παρακαταθήκης και τα πρότυπα διαλύματα εργασίας φυλάσσονται στο ψυγείο, σε θερμοκρασία 4°C, όπου παραμένουν σταθερά για αρκετές εβδομάδες.

Για την κατασκευή των καμπυλών αναφοράς παρασκευάζονται κάθε φορά μεικτά διαλύματα εργασίας αλισκιρένης και υδροχλωροθειαζιδίου σε συγκεντρώσεις 1,5, 2,1, 3,0, 3,6, 3,9 και 4,5 μg mL<sup>-1</sup> για την αλισκιρένη και 0,125, 0,175, 0,250, 0,300, 0,325 και 0,375 μg mL<sup>-1</sup> για το υδροχλωροθειαζίδιο, αντίστοιχα. Σε κάθε διάλυμα η συγκέντρωση της βρωμαζεπάμης (εσωτερικό πρότυπο) είναι 1,0 μg mL<sup>-1</sup>.

Το ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  30mM) παρασκευάζεται ως εξής : 2.31g  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  ( $M_r = 77$ ) διαλύονται με ανάδευση σε ογκομετρική φιάλη των 1000mL με νερό, ώστε να ληφθεί διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  30,0 mmol mL<sup>-1</sup>.

#### **4.6 Καθορισμός των βέλτιστων χρωματογραφικών συνθηκών**

Για την επιλογή της κατάλληλης κινητής φάσης πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες μελέτες:

- Μελέτη της επίδρασης του ποσοστού του οργανικού τροποποιητή στο χρόνο συγκράτησης της αλίσκιρένης, του υδροχλωροθειαζιδίου και της βρωμαζεπάμης(εσωτερικό πρότυπο)
- Μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος στο χρόνο συγκράτησης και τον παράγοντα χωρητικότητας.

##### **4.6.1 Μελέτη της επίδρασης του ποσοστού του οργανικού τροποποιητή στο χρόνο συγκράτησης και τον παράγοντα χωρητικότητας**

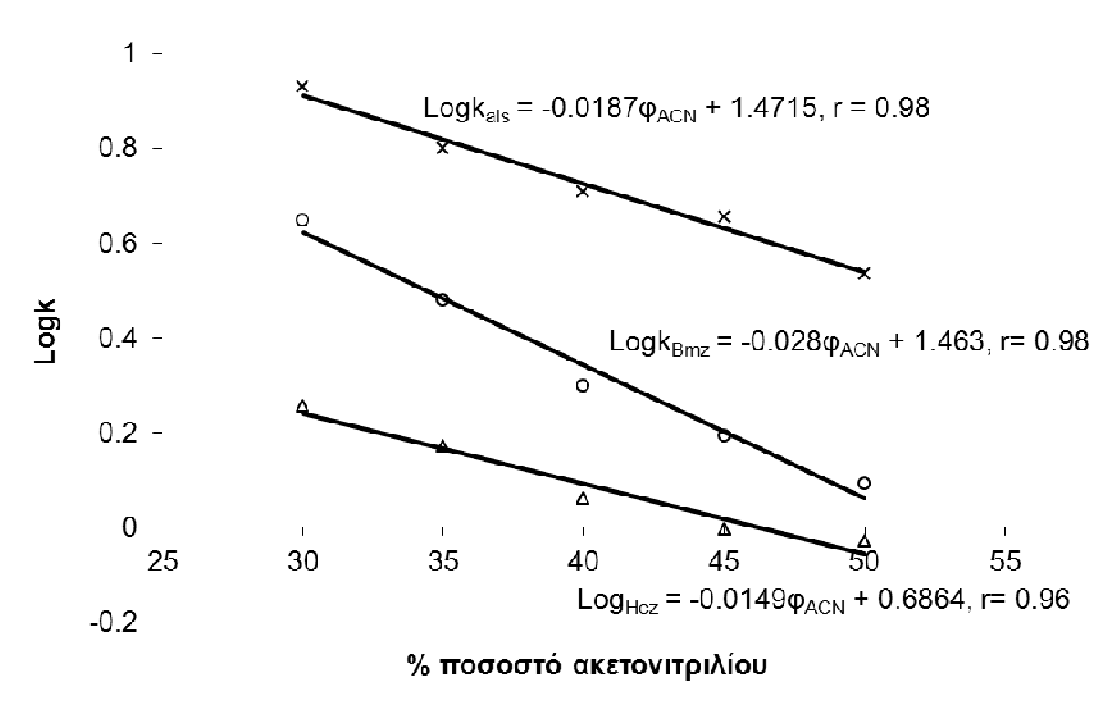
Για τη μελέτη της επίδρασης του ποσοστού του ακετονιτριλίου στο χρόνο συγκράτησης και τον παράγοντα χωρητικότητας της αλίσκιρένης και του υδροχλωροθειαζιδίου, εξετάστηκαν τα εξής πέντε διαφορετικά ποσοστά ακετονιτριλίου στην κινητή φάση: 30, 35, 40, 45 και 50 % v/v σε υδατικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  30mM.

Στον πίνακα 4.1 συνοψίζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης του % ποσοστού του ακετονιτριλίου στους χρόνους συγκράτησης και τον παράγοντα χωρητικότητας της αλίσκιρένης, του υδροχλωροθειαζιδίου και του εσωτερικού προτύπου. Αύξηση του ποσοστού του οργανικού τροποποιητή επέφερε μείωση στο χρόνο ανάλυσης τόσο των αναλυτών, όσο και του εσωτερικού προτύπου.

<b>Πίνακας 4.1.</b> Επίδραση του % ποσοστού του οργανικού τροποποιητή στις βασικές χρωματογραφικές παραμέτρους των αναλυτών και στα εμβαδά των χρωματογραφικών τους κορυφών.					
% ποσοστό ακετονιτριλίου	30	35	40	45	50
<b>Αλίσκιρηνη</b>					
tR ± sd	8,040 ± 0,014	5,920 ± 0,007	5,120 ± 0,013	4,204 ± 0,091	3,243 ± 0,031
logk ± sd	0,929 ± 0,003	0,7990 ± 0,002	0,708 ± 0,002	0,655 ± 0,009	0,5350 ± 0,003
T ± sd	1,173 ± 0,023	1,226 ± 0,021	1,211 ± 0,022	1,316 ± 0,031	1,390 ± 0,036
N ± sd	511 ± 27	2993 ± 128	3188 ± 68	1635 ± 129	1080 ± 75
Peak area ± sd	51650 ± 2802	62866 ± 874	61405 ± 1081	65370 ± 1156	64670 ± 1153
<b>Υδροχλωροθειαζίδιο</b>					
tR ± sd	2,370 ± 0,004	2,016 ± 0,009	1,802 ± 0,010	1,515 ± 0,019	1,418 ± 0,010
logk ± sd	0,255 ± 0,009	0,171 ± 0,002	0,0610 ± 0,004	-0,004 ± 0,023	-0,003 ± 0,009
T ± sd	1,201 ± 0,072	1,401 ± 0,053	1,65 ± 0,12	1,551 ± 0,081	1,306 ± 0,058
N ± sd	667 ± 21	690 ± 8	1090 ± 17	716 ± 30	610 ± 18
Peak area ± sd	22188 ± 939	23743 ± 635	25816 ± 925	22443 ± 1062	19327 ± 950
<b>Βρωμαζεπάμη ( εσωτερικό πρότυπο)</b>					
tR ± sd	4,611 ± 0,005	3,261 ± 0,031	2,507 ± 0,031	1,949 ± 0,055	1,637 ± 0,014
logk ± sd	0,648 ± 0,007	0,478 ± 0,004	0,299 ± 0,007	0,193 ± 0,002	0,091 ± 0,004
T ± sd	1,14 ± 0,12	1,941 ± 0,056	1,473 ± 0,058	1,84 ± 0,29	1,763 ± 0,035
N ± sd	1052 ± 158	774 ± 11	932 ± 26	728 ± 19	614 ± 28
Peak area ± sd	20146 ± 904	24789 ± 516	22794 ± 817	22426 ± 556	22146 ± 904

Στο σχήμα 4.2 παριστάνεται η τιμή log k' σε συνάρτηση με το % ποσοστό ακετονιτριλίου στην κινητή φάση





**Σχήμα 4.2:** Γραφική παράσταση του λογαρίθμου του παράγοντα χωρητικότητας της αλίσκιρένης, του υδροχλωροθειαζιδίου και του εσωτερικού προτύπου (Βρωμαζεπάμη) συναρτήσει του % ποσοστού του ακετονιτριλίου ( $\phi_{ACN}$ ) στην κινητή φάση, η συγκέντρωση του οξικού αμμωνίου στην κινητή φάση ήταν σε όλες τις περιπτώσεις 30 mM.

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα (σχήμα 4.2), υπάρχει γραμμική συσχέτιση ανάμεσα στην τιμή  $\log k'$  των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου και στο ποσοστό του ακετονιτριλίου της κινητής φάσης ( $\phi_{ACN}$ ). Η γραμμικότητα επιβεβαιώνει πειραματικά πως για την κατακράτηση των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου στη στήλη παίζουν ρόλο φαινόμενα κατανομής. Ως βέλτιστο ποσοστό του ακετονιτριλίου επιλέχθηκε το 40% v/v όπου η αλίσκιρένη και το υδροχλωροθειαζίδιο εκλούνται σε χρόνους  $t_R = 5,114$  και  $1,805$  λεπτά, αντίστοιχα ενώ ο χρόνος κατακράτησης του εσωτερικού προτύπου (βρωμαζεπάμη) είναι  $2,524$  λεπτά.

#### 4.6.2 Μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου στο χρόνο συγκράτησης και τον παράγοντα χωρητικότητας

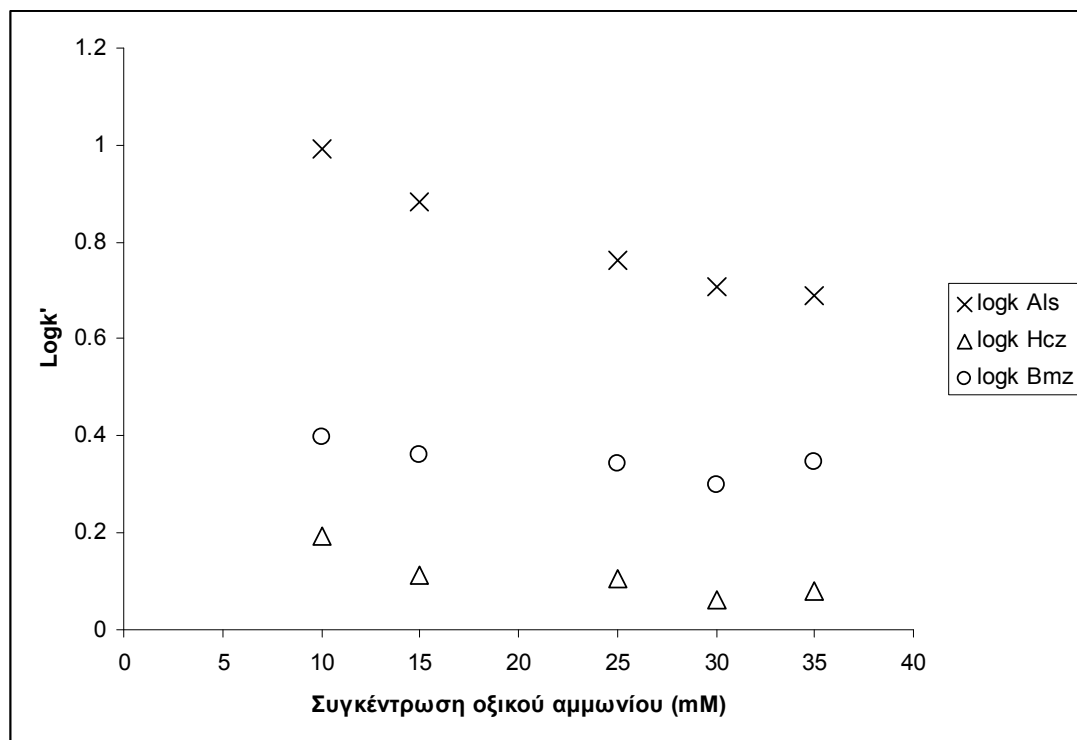
Για τη μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου στο χρόνο συγκράτησης και τον παράγοντα χωρητικότητας της αλίσκιρένης, του υδροχλωροθειαζιδίου και της βρωμαζεπάμης, εξετάστηκαν οι εξής πέντε

συγκεντρώσεις CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> στην κινητή φάση:10, 15, 25, 30 και 35 mM σε κινητή φάση που περιείχε ACN: CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> σε αναλογία 40/60 v/v.

Στον πίνακα 4.2 συνοψίζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου στους χρόνους συγκράτησης και τον παράγοντα χωρητικότητας της αλίσκιρηνης, του υδροχλωροθειαζιδίου και του εσωτερικού προτύπου.

<b>Πίνακας 4.2.</b> Επίδραση της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου στις βασικές χρωματογραφικές παραμέτρους των αναλυτών και στα εμβαδά των χρωματογραφικών τους κορυφών.					
Οξικό αμμώνιο (mM)	10	15	25	30	35
<b>Αλίσκιρηνη</b>					
tR ± sd	8,19 ± 0,006	6,87±0,006	5,45±0,001	5,120 ±0,013	4,88±0,004
logk ± sd	0,990± 0,0025	0,882± 0,001	0,763± 0,001	0,708± 0,002	0,690± 0,002
T ± sd	1,23± 0,0141	1,28± 0,0252	1,26± 0,0529	1,211 ± 0,022	1,22± 0,0250
N ± sd	4280± 48	3917 ± 18	3481 ± 93	3188 ± 68	3199 ± 83
Peak area ± sd	72621 ± 667	63836 ± 2704	57846 ± 5732	61405 ± 1081	60150 ± 395
<b>Υδροχλωροθειαζίδιο</b>					
tR ± sd	1,94±0,004	1,84±0,004	1,83 ±0,006	1,8017± 0,001	1,83±0,003
logk ± sd	0,193 ± 0,002	0,112 ±0,001	0,105 ± 0,001	0,061 ± 0,004	0,082± 0,000
T ± sd	1,45±0,19	1,94± 0,1136	1,73± 0,0404	1,65± 0,12	1,61± 0,0100
N ± sd	1600 ± 57	985 ± 24	1112 ± 269	1090 ± 17	1132 ± 16
Peak area ± sd	23863 ± 1047	24669 ± 1543	23122 ± 1303	25816 ± 925	25099 ± 99
<b>Βρωμαζεπάμη ( εσωτερικό πρότυπο)</b>					
tR ± sd	2,66±0,001	2,62 ±0,002	2,56±0,009	2,507± 0,031	2,67±0,087
logk ± sd	0,397± 0,003	0,359± 0,001	0,342± 0,0011	0,299 ± 0,007	0,347 ±0,021
T ± sd	1,58± 0,0000	1,57± 0,0569	1,57± 0,0551	1,473 ± 0,058	1,48± 0,0050
N ± sd	2441 ± 22	921 ± 28	923 ± 56	932 ± 26	897 ± 7
Peak area ± sd	23489 ± 668	21244 ± 1201	21028 ± 1397	22794 ± 817	22290 ± 152

Στο σχήμα 4.3 παριστάνεται γραφικά η συσχέτιση της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου με τον παράγοντα χωρητικότητας των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου.



**Σχήμα 4.3:** Γραφική παράσταση του λογαρίθμου του παράγοντα χωρητικότητας των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου συναρτήσει της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου στην κινητή φάση, το % ποσοστό ακετονιτριλίου της κινητής φάσης ήταν σε όλες τις περιπτώσεις 40% v/v.

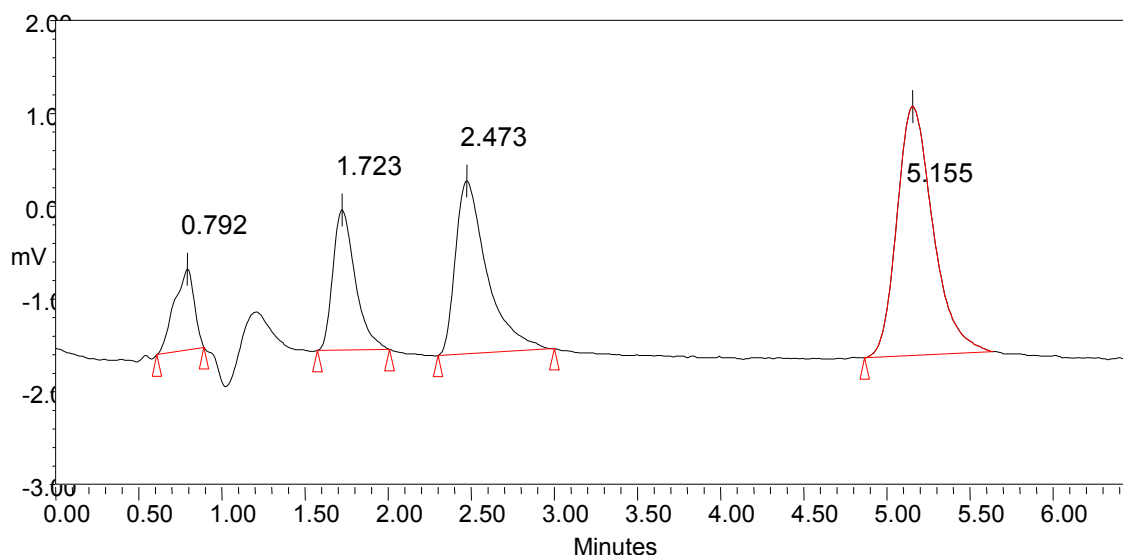
Όπως φαίνεται από τα πειραματικά δεδομένα, οι παράγοντες χωρητικότητας των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου ελαττώνονται, αυξανόμενης της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου, βελτιώνεται σημαντικά ο χρόνος έκλουσης και η συμμετρία της χρωματογραφικής κορυφής της αλίσκιρένης. Ως βέλτιστη συγκέντρωση οξικού αμμωνίου επιλέχθηκε η συγκέντρωση 30 mM, καθώς σε αυτή ο χρόνος ανάλυσης δεν υπερβαίνει τα 6,5 λεπτά.

#### 4.7 Βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες

Οι βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες καθορίστηκαν ως εξής:

- ✓ Στατική φάση: στήλη Fortis Phenyl 150×2.1 mm i.d., 5μm.

- ✓ Κινητή φάση: 30mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>/ακετονιτρίλιο σε αναλογία 60/40, v/v.
- ✓ Ταχύτητα ροής: 0,40 mL min<sup>-1</sup>
- ✓ Όγκος βρόχου: 20μL
- ✓ Ανιχνευτής: UV-Vis με μήκος κύματος ανίχνευσης τα 280 nm.



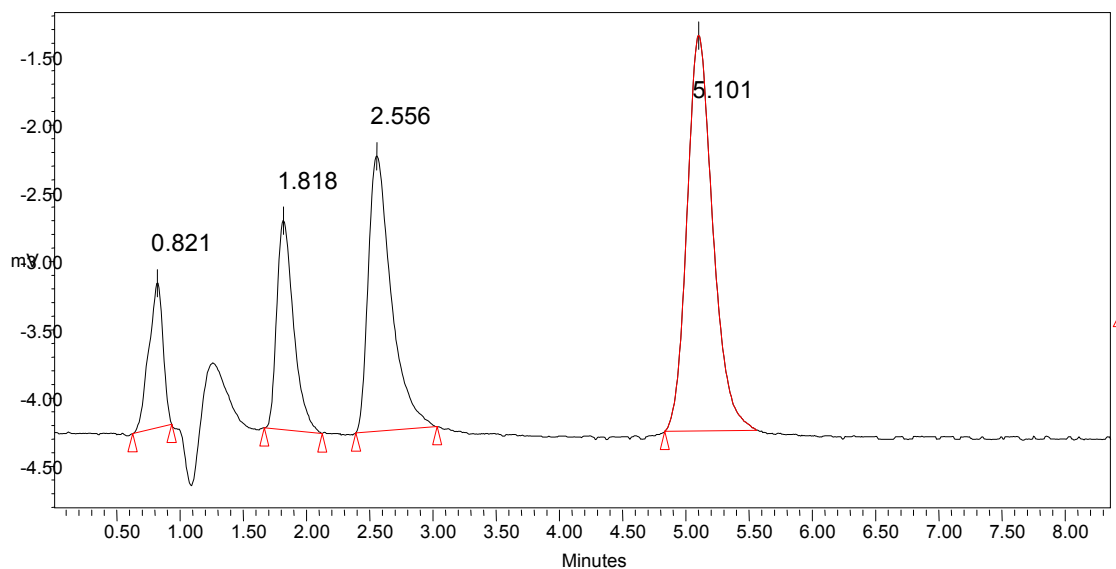
**Σχήμα 4.4:** Τυπικό χρωματογράφημα μίγματος πρότυπου διαλύματος που περιέχει αλισκιρένη σε συγκέντρωση 3,0 μg/mL , υδροχλωροθειαζίδη σε συγκέντρωση 0,25 μg/mL και το εσωτερικό πρότυπο(βρωμαζεπάμη) σε συγκέντρωση 1,0 μg/mL. Οι χρόνοι ανάσχεσης της αλισκιρένης, του υδροχλωροθειαζιδίου και της βρωμαζεπάμης είναι 5,155 , 1,723 και 2,473 λεπτά αντίστοιχα.

#### 4.8 Πορεία κατεργασίας των δισκίων

Η μέθοδος εφαρμόστηκε στην ανάλυση δισκίων Rasilez HCT® της εταιρίας Novartis, κάθε δισκίο έχει ονομαστική συγκέντρωση 150mg αλισκιρένης και 12,5mg υδροχλωροθειαζιδίου ανά δισκίο.

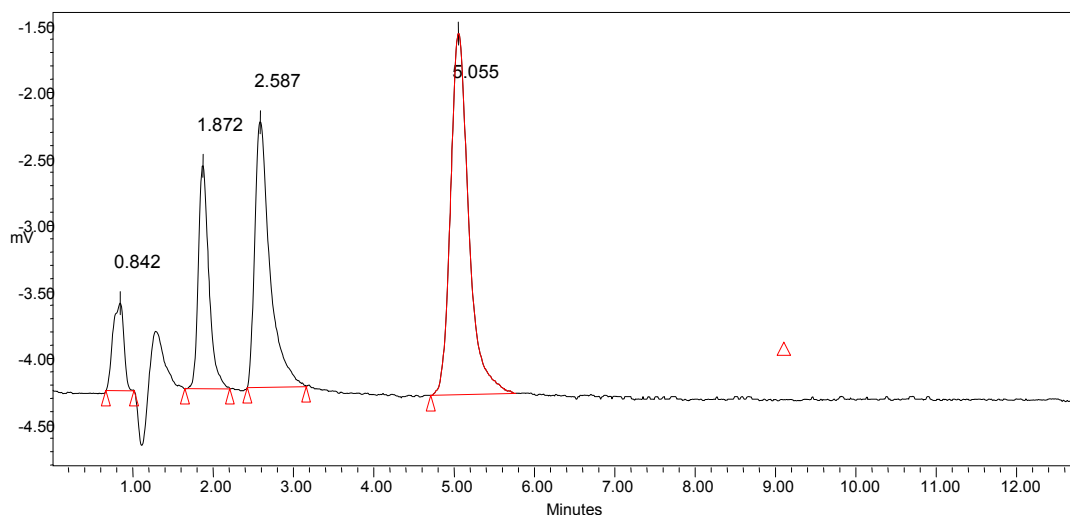
Για την ανάλυση των φαρμακευτικών σκευασμάτων, ζυγίστηκαν ένα προς ένα είκοσι δισκία και υπολογίστηκε το μέσο βάρος τους που βρέθηκε να είναι ίσο με  $439,91 \pm 0,12$  mg. Στη συνέχεια ακολούθησε κονιοποίηση των δισκίων. Από τη σκόνη των δισκίων λήφθηκε ποσότητα ίση με το μέσο βάρος τους και τοποθετήθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100mL όπου προστέθηκαν περίπου 10mL ακετονιτρίλιο και 50mL νερό. Η ογκομετρική φιάλη τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 20 λεπτά. Ακολούθησε αραιώση του διαλύματος μέχρι χαραγής με νερό. Μια ποσότητα από το εναιώρημα φυγοκεντρείται στις 12000 στροφές για 5 λεπτά και ακριβώς 1mL από το υπερκείμενο διαυγές διάλυμα

αραιώνεται σε ογκομετρική φιάλη των 25mL μέχρι χαραγής με τον ίδιο διαλύτη. Ακριβώς 50 μL από το παραπάνω διάλυμα αναμιγνύεται με 100 μL διαλύματος εσωτερικού προτύπου συγκέντρωσης 10 μg mL<sup>-1</sup> και αραιώνονται μέχρι όγκου 1 mL πριν την ανάλυση στο σύστημα HPLC-UV σύμφωνα με τις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες (παράγραφος 4.7).



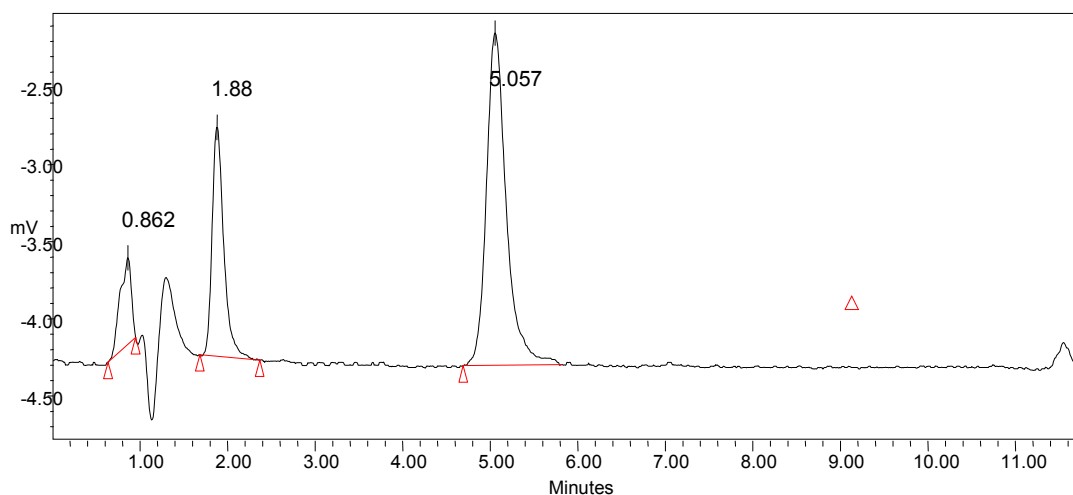
	Name	Retent ion Time	Area	% Area	Height	Resolution	Symmetry Factor	EP Plate Count
1		0.821	8305	9.29	1064		0.81	221
2	Υδροχλωροθειαζίδιο	1.818	14243	15.93	1533	4.3	1.53	930
3	Βρωμαζεπάμη	2.556	25533	28.56	2016	2.7	1.73	1063
4	Αλισκιρένη	5.101	41329	46.22	2900	7.5	1.22	3117

**Σχήμα 4.5:** Τυπικό χρωματογράφημα ενός δισκίου Rasilez HCT® που περιέχει αλισκιρένη σε συγκέντρωση 3,0 μg/mL, υδροχλωροθειαζίδιο σε συγκέντρωση 0,25 μg/mL και το εσωτερικό πρότυπο (βρωμαζεπάμη) σε συγκέντρωση 1,0 μg/mL. Οι χρόνοι ανάσχεσης της αλισκιρένης, του υδροχλωροθειαζιδίου και της βρωμαζεπάμης είναι 5,101, 1,818 και 2,556 λεπτά αντίστοιχα.



	Name	Retention Time	Area	% Area	Height	Resolution	Symmetry Factor	EP Plate Count
1		0.842	6197	6.83	658		0.84	161
2	Υδροχλωροθειαζίδιο	1.872	15329	16.90	1680	4.2	1.44	1058
3	Βρωμαζεπάμη	2.587	26208	28.89	1997	2.7	1.93	1127
4	Αλισκιρένη	5.055	42973	47.38	2719	7.1	1.37	2714

**Σχήμα 4.6:** Τυπικό χρωματογράφημα μίγματος πρότυπου διαλύματος που περιέχει αλισκιρένη σε συγκέντρωση 3,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , υδροχλωροθειαζίδιο σε συγκέντρωση 0,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  και το εσωτερικό πρότυπο (βρωμαζεπάμη) σε συγκέντρωση 1,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Οι χρόνοι ανάσχεσης της αλισκιρένης, του υδροχλωροθειαζιδίου και της βρωμαζεπάμης είναι 5,055, 1,872 και 2,587 λεπτά αντίστοιχα.



	Name	Retention Time	Area	% Area	Height	Resolution	Symmetry Factor	EP Plate Count
1		0.862	5047	9.52	562		0.72	160
2	Υδροχλωροθειαζίδιο	1.880	13751	25.94	1490	4.1	1.50	1052
3	Αλσκιρένη	5.057	34217	64.54	2156	10.3	1.33	2749

**Σχήμα 4.7:** Τυπικό χρωματογράφημα μίγματος πρότυπου διαλύματος που περιέχει αλσκιρένη σε συγκέντρωση 3,0 μg/mL , υδροχλωροθειαζιδη σε συγκέντρωση 0,25 μg/mL. Οι χρόνοι ανάρσεσης της αλσκιρένης και του υδροχλωροθειαζιδίου είναι 5,057 και 1,880 λεπτά αντίστοιχα.

#### 4.9 Καμπύλες αναφοράς – Γραμμικότητα

Για την αξιολόγηση της γραμμικότητας της μεθόδου κατασκευάστηκαν και αναλύθηκαν πέντε καμπύλες αναφοράς σε πέντε διαφορετικές εργαστηριακές ημέρες. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των καμπυλών αναφοράς παρασκευάστηκαν με τρόπο που έχει ήδη περιγραφεί σε προηγούμενη παράγραφο.

Για κάθε μια από τις προσδιοριζόμενες ουσίες υπολογίζεται ο λόγος της επιφάνειας της χρωματογραφικής της κορυφής προς την επιφάνεια της χρωματογραφικής κορυφής του εσωτερικού προτύπου. Σε όλες τις περιπτώσεις εφαρμόζεται η γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης χρησιμοποιώντας τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων.

Στους πίνακες (4.3 έως 4.12) που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα κάθε εργαστηριακής ημέρας για κάθε μια από τις προσδιοριζόμενες ουσίες. Σε κάθε πίνακα παρουσιάζεται η θεωρητική τιμή της

συγκέντρωσης για κάθε αναλύτη, η μέση τιμή του λόγου των επιφανειών, η πειραματικά υπολογιζόμενη συγκέντρωση με βάση την εξίσωση της καμπύλης αναφοράς, καθώς και το % σχετικό αναλυτικό σφάλμα.

Σε όλες τις περιπτώσεις, οι πειραματικά υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις που προέκυψαν από τις εξισώσεις των αντίστοιχων καμπυλών αναφοράς δεν απέχουν περισσότερο από 3.8 % από τις ονομαστικές τιμές. Το γεγονός αυτό έρχεται σε συμφωνία με τις διεθνείς οδηγίες και αποτελεί ένδειξη ότι το γραμμικό μοντέλο περιγράφει ικανοποιητικά τη σχέση ανάμεσα στη συγκέντρωση του αναλύτη και την απόκριση του οργάνου.

**Πίνακας 4.3** Πειραματικά αποτελέσματα της 1ης σειράς μετρήσεων για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς της αλίσκιρένης.

C θεωρητική (μg mL <sup>-1</sup> )	Μέσος όρος σήματος	Σπειραματική (μg mL <sup>-1</sup> )	% σχετικό αναλυτικό σφάλμα
1,50	0,822	1,47	<b>-1,7</b>
2,10	1,160	2,14	<b>1,8</b>
3,00	1,590	2,98	<b>-0,6</b>
3,60	1.914	3,62	<b>0,5</b>
3,90	2,045	3,88	<b>-0,6</b>
4,50	2,352	4,48	<b>-0,4</b>
% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα = [(C πειραματική- C θεωρητική)/ C θεωρητική] x 100			

**Πίνακας 4.4** Πειραματικά αποτελέσματα της 2ης σειράς μετρήσεων για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς της αλίσκιρένης.

C θεωρητική (μg mL <sup>-1</sup> )	Μέσος όρος σήματος	Σπειραματική (μg mL <sup>-1</sup> )	% σχετικό αναλυτικό σφάλμα
1,50	0,781	1,52	<b>1,3</b>
2,10	1,129	2,06	<b>-1,9</b>
3,00	1,731	3,00	<b>-0,1</b>
3,60	2,155	3,66	<b>1,6</b>
3,90	2,323	3,92	<b>0,5</b>
4,50	2,677	4,47	<b>-0,7</b>
% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα = [(C πειραματική- C θεωρητική)/ C θεωρητική] x 100			



**Πίνακας 4.5** Πειραματικά αποτελέσματα της 3ης σειράς μετρήσεων για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς της αλισκιρένης.

C θεωρητική (μg mL <sup>-1</sup> )	Μέσος όρος σήματος	Σπειραματική (μg mL <sup>-1</sup> )	% σχετικό αναλυτικό σφάλμα
1,50	0,850	1,47	<b>-1,8</b>
2,10	1,224	2,09	<b>-0,4</b>
3,00	1,810	3,06	<b>1,9</b>
3,60	2,138	3,60	<b>-0,01</b>
3,90	2,326	3,91	<b>0,2</b>
4,50	2,661	4,46	<b>-0,8</b>

% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα = [(C πειραματική- C θεωρητική)/ C θεωρητική] x 100

**Πίνακας 4.6** Πειραματικά αποτελέσματα της 4ης σειράς μετρήσεων για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς της αλισκιρένης.

C θεωρητική (μg mL <sup>-1</sup> )	Μέσος όρος σήματος	Σπειραματική (μg mL <sup>-1</sup> )	% σχετικό αναλυτικό σφάλμα
1,50	0,822	1,48	<b>-1,5</b>
2,10	1,160	2,02	<b>-3,8</b>
3,00	1,590	2,99	<b>-0,4</b>
3,60	1,914	3,63	<b>0,7</b>
3,90	2,046	3,89	<b>-0,4</b>
4,50	2,362	4,51	<b>0,2</b>

% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα = [(C πειραματική- C θεωρητική)/ C θεωρητική] x 100

**Πίνακας 4.7** Πειραματικά αποτελέσματα της 5<sup>ης</sup> σειράς μετρήσεων για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς της αλισκιρένης.

C θεωρητική (μg mL <sup>-1</sup> )	Μέσος όρος σήματος	Σπειραματική (μg mL <sup>-1</sup> )	% σχετικό αναλυτικό σφάλμα
1,50	0,817	1,50	<b>0,04</b>
2,10	1,141	2,10	<b>0,03</b>
3,00	1,632	3,01	<b>0,4</b>
3,60	1,933	3,57	<b>-0,8</b>
3,90	2,102	3,88	<b>-0,4</b>
4,50	2,444	4,52	<b>0,4</b>
% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα = [(C πειραματική- C θεωρητική)/ C θεωρητική] x 100			

**Πίνακας 4.8** Πειραματικά αποτελέσματα της 1<sup>ης</sup> σειράς μετρήσεων για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς του υδροχλωροθειαζιδίου.

C θεωρητική (μg mL <sup>-1</sup> )	Μέσος όρος σήματος	Σπειραματική (μg mL <sup>-1</sup> )	% σχετικό αναλυτικό σφάλμα
0,125	0,300	0,127	<b>1,5</b>
0,175	0,408	0,173	<b>-1,1</b>
0,250	0,594	0,252	<b>0,9</b>
0,300	0,701	0,298	<b>-0,6</b>
0,325	0,755	0,321	<b>-1,2</b>
0,375	0,891	0,379	<b>1,0</b>
% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα = [(C πειραματική- C θεωρητική)/ C θεωρητική] x 100			

**Πίνακας 4.9** Πειραματικά αποτελέσματα της 2<sup>ης</sup> σειράς μετρήσεων για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς του υδροχλωροθειαζιδίου.

C θεωρητική (μg mL <sup>-1</sup> )	Μέσος όρος σήματος	Σπειραματική (μg mL <sup>-1</sup> )	% σχετικό αναλυτικό σφάλμα
0,125	0,322	0,127	<b>1,7</b>
0,175	0,430	0,171	<b>-2,4</b>
0,250	0,635	0,253	<b>1,3</b>
0,300	0,752	0,300	<b>0,1</b>
0,325	0,810	0,323	<b>-0,5</b>
0,375	0,939	0,375	<b>0,1</b>
% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα = [(C πειραματική- C θεωρητική)/ Cθεωρητική] x 100			

**Πίνακας 4.10** Πειραματικά αποτελέσματα της 3<sup>ης</sup> σειράς μετρήσεων για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς του υδροχλωροθειαζιδίου.

C θεωρητική (μg mL <sup>-1</sup> )	Μέσος όρος σήματος	Σπειραματική (μg mL <sup>-1</sup> )	% σχετικό αναλυτικό σφάλμα
0,125	0,297	0,125	<b>-0,4</b>
0,175	0,421	0,173	<b>-1,2</b>
0,250	0,631	0,255	<b>2,0</b>
0,300	0,744	0,299	<b>-0,3</b>
0,325	0,817	0,328	<b>0,8</b>
0,375	0,931	0,372	<b>-0,7</b>
% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα = [(C πειραματική- C θεωρητική)/ Cθεωρητική] x 100			

**Πίνακας 4.11** Πειραματικά αποτελέσματα της 4<sup>ης</sup> σειράς μετρήσεων για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς του υδροχλωροθειαζιδίου.

C θεωρητική (μg mL <sup>-1</sup> )	Μέσος όρος σήματος	Σπειραματική (μg mL <sup>-1</sup> )	% σχετικό αναλυτικό σφάλμα
0,125	0,296	0,128	<b>2,4</b>
0,175	0,396	0,172	<b>-2,0</b>
0,250	0,577	0,251	<b>0,4</b>
0,300	0,689	0,299	<b>-0,5</b>
0,325	0,739	0,322	<b>-1,0</b>
0,375	0,868	0,378	<b>0,8</b>
% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα = [(C πειραματική- C θεωρητική)/ Cθεωρητική] x 100			

**Πίνακας 4.12** Πειραματικά αποτελέσματα της 5<sup>ης</sup> σειράς μετρήσεων για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς του υδροχλωροθειαζιδίου.

C θεωρητική (μg mL <sup>-1</sup> )	Μέσος όρος σήματος	Σπειραματική (μg mL <sup>-1</sup> )	% σχετικό αναλυτικό σφάλμα
0,125	0,310	0,123	<b>-1,4</b>
0,175	0,434	0,176	<b>0,8</b>
0,250	0,605	0,250	<b>-0,1</b>
0,300	0,733	0,305	<b>1,6</b>
0,325	0,771	0,321	<b>-1,2</b>
0,375	0,895	0,374	<b>-0,1</b>
% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα = [(C πειραματική- C θεωρητική)/ Cθεωρητική] x 100			

Ακολούθησε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των καμπύλων αναφοράς. Η συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης του κάθε αναλύτη και του λόγου των επιφανειών έγινε με εφαρμογή της γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης, με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων. Έτσι λήφθηκαν οι γραμμικές εξισώσεις των καμπυλών αναφοράς οι οποίες παρουσιάζονται στους πίνακες 4.13 και 4.14 για την αλίσκιρένη και το υδροχλωροθειαζίδιο, αντίστοιχα.

Για κάθε καμπύλη αναφοράς υπολογίζεται ο συντελεστής συσχέτισης,  $r$ , το τυπικό σφάλμα της καμπύλης αναφοράς,  $S_r$ , και οι τυπικές αποκλίσεις της

κλίσης και της τομής. Παρατηρούμε ότι η μέθοδος είναι γραμμική και για τις 5 σειρές μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν στη διάρκεια ενός μήνα.

Η δοκιμασία student's t-test διεξήχθη προκειμένου να διαπιστώσουμε αν οι πειραματικές τιμές της τομής( $\alpha$ ) των παρακάτω εξισώσεων γραμμικής συσχέτισης διαφέρουν σημαντικά από τη θεωρητική τιμή μηδέν. Η δοκιμασία βασίζεται στον υπολογισμό των πειραματικών τιμών  $t_{πειρ}$  από τα δεδομένα της εξίσωσης με βάση την τύπο  $t = \alpha / S_{\alpha}$ , όπου  $\alpha$  είναι η τομή της εξίσωσης γραμμικής συσχέτισης και  $S_{\alpha}$  η τυπική απόκλιση του  $\alpha$ . Η πειραματική τιμή  $t_{πειρ}$  συγκρίνεται με τη θεωρητική τιμή  $t_p = 3,18$  για 3 βαθμούς ελευθερίας και 95% στάθμη εμπιστοσύνης. Όπως παρατηρούμε στους πίνακες 4.13 και 4.14 για όλες τις καμπύλες είναι  $t_{πειρ} < t_p = 3,18$ , επομένως οι τομές των εξισώσεων γραμμικής συσχέτισης δεν διαφέρουν σημαντικά από το μηδέν. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί στον ποσοτικό προσδιορισμό της αλισκιρένης και του υδροχλωροθειαζιδίου με την τεχνική του ενός σημείου.

**Πίνακας 4.13** Αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών αναφοράς της αλισκιρένης

Γραμμική περιοχή συγκεντρώσεων ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Γραμμική εξίσωση <sup>α</sup>	$r$ <sup>β</sup>	Τυπική απόκλιση		$S_r$ <sup>γ</sup>	$a/S_a$ <sup>δ</sup>
			Κλίση	Τομή		
<i>Πρώτη σειρά μετρήσεων</i>						
1,5 – 4,5	$R_{Aik} = 0,509 \times C_{Aik} + 0,072$	0,9997	0,0057	0,029	0,015	2,48
<i>Δεύτερη σειρά μετρήσεων</i>						
1,5 – 4,5	$R_{Aik} = 0,643 \times C_{Aik} - 0,196$	0,9995	0,011	0,091	0,026	2,18
<i>Τρίτη σειρά μετρήσεων</i>						
1,5 – 4,5	$R_{Aik} = 0,606 \times C_{Aik} - 0,043$	0,9996	0,029	0,035	0,022	1,23
<i>Τέταρτη σειρά μετρήσεων</i>						
1,5 – 4,5	$R_{Aik} = 0,508 \times C_{Aik} + 0,072$	0,9997	0,0057	0,049	0,014	1,47
<i>Πέμπτη σειρά μετρήσεων</i>						
1,5 – 4,5	$R_{Aik} = 0,539 \times C_{Aik} + 0,0086$	0,9998	0,0043	0,014	0,011	0,61

<sup>α</sup> Λόγος του εμβαδού της κορυφής της αλισκιρένης προς το εμβαδόν της κορυφής του εσωτερικού προτύπου,  $R_{Aik}$ , σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση της αλισκιρένης,  $C_{Aik}$ .

<sup>β</sup> Συντελεστής συσχέτισης

<sup>γ</sup> Σχετικό τυπικό σφάλμα μεθόδου.

<sup>δ</sup> Η θεωρητική τιμή του  $t$  για 95% επίπεδο εμπιστοσύνης ( $P= 0,05$ ) και  $f = n-2 = 4$  βαθμούς ελευθερίας είναι **2,54**.

**Πίνακας 4.14** Αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών αναφοράς του υδροχλωροθειαζιδίου

Γραμμική περιοχή συγκεντρώσεων ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Γραμμική εξίσωση <sup>α</sup>	$r$ <sup>β</sup>	Τυπική απόκλιση		$S_r$ <sup>γ</sup>	$a/S_a$ <sup>δ</sup>
			Κλίση	Τομή		
<i>Πρώτη σειρά μετρήσεων</i>						
0,125 – 0,375	$R_{\text{Hcz}} = 2,345 \times C_{\text{Hcz}} + 0,0025$	0,9994	0,038	0,0101	0,008	1,00
<i>Δεύτερη σειρά μετρήσεων</i>						
0,125 – 0,375	$R_{\text{Hcz}} = 2,485 \times C_{\text{Hcz}} + 0,0059$	0,9996	0,035	0,0095	0,007	0,62
<i>Τρίτη σειρά μετρήσεων</i>						
0,125 – 0,375	$R_{\text{Hcz}} = 2,558 \times C_{\text{Hcz}} - 0,021$	0,9995	0,040	0,0109	0,008	1,93
<i>Τέταρτη σειρά μετρήσεων</i>						
0,125 – 0,375	$R_{\text{Hcz}} = 2,286 \times C_{\text{Hcz}} + 0,0033$	0,9995	0,035	0,0096	0,007	0,34
<i>Πέμπτη σειρά μετρήσεων</i>						
0,125 – 0,375	$R_{\text{Hcz}} = 2,331 \times C_{\text{Hcz}} + 0,0226$	0,9994	0,037	0,0102	0,008	2,22

<sup>α</sup> Λόγος του εμβαδού της κορυφής του υδροχλωροθειαζιδίου προς το εμβαδόν της κορυφής του εσωτερικού προτύπου,  $R_{\text{Hcz}}$ , σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση του υδροχλωροθειαζιδίου,  $C_{\text{Hcz}}$ .

<sup>β</sup> Συντελεστής συσχέτισης.

<sup>γ</sup> Σχετικό τυπικό σφάλμα μεθόδου.

<sup>δ</sup> Η θεωρητική τιμή του  $t$  για 95% επίπεδο εμπιστοσύνης ( $P= 0,05$ ) και  $f = n-2 = 4$  βαθμούς ελευθερίας είναι **2,54**.

#### 4.10 Προσδιορισμός Ορίου Ανίχνευσης και Ορίου Ποσοτικοποίησης

Ο προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης (Limit Of Detection, LOD) και του ορίου ποσοτικοποίησης (Limit Of Quantification, LOQ) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους ορισμούς του ICH Topic Q2B. Το όριο ανίχνευσης (LOD) υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση:  $LOD = 3,3 \frac{s.d.}{b}$ , όπου s.d. είναι η τυπική απόκλιση της τομής της καμπύλης αναφοράς στον άξονα των  $y$ , δηλαδή η τυπική απόκλιση του σταθερού όρου της εξίσωσης της καμπύλης αναφοράς και  $b$  είναι η κλίση της καμπύλης αναφοράς. Το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση:  $LOQ = 10 \frac{s.d.}{b}$ , όπου s.d. είναι η τυπική απόκλιση της τομής της καμπύλης αναφοράς στον άξονα των  $y$ , δηλαδή η τυπική απόκλιση του σταθερού όρου της εξίσωσης της καμπύλης αναφοράς και  $b$  είναι η κλίση της καμπύλης αναφοράς.

Στη δεδομένη μελέτη, οι τιμές LOD και LOQ υπολογίστηκαν από τις εξισώσεις των καμπυλών αναφοράς. Οι μέσες τιμές του LOD υπολογίστηκαν  $0,28 \pm 0,16 \mu\text{g mL}^{-1}$  και  $0,0133 \pm 0,0011 \mu\text{g mL}^{-1}$  για την αλισκιρένη και το υδροχλωροθειαζίδιο, αντίστοιχα. Οι μέσες τιμές του LOQ υπολογίστηκαν  $0,84 \pm 0,48 \mu\text{g mL}^{-1}$  και  $0,0404 \pm 0,0031 \mu\text{g mL}^{-1}$  για την αλισκιρένη και το υδροχλωροθειαζίδιο, αντίστοιχα.

#### 4.11 Έλεγχος ορθότητας (Accuracy) και πιστότητας (Precision)

Η ορθότητα και η πιστότητα αποτελούν κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας των μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού και ο υπολογισμός τους είναι απαραίτητος για την αξιολόγηση και επικύρωσή των μεθόδων αυτών. Η ορθότητα αποτελεί μέτρο της εγγύτητας της πειραματικά μετρούμενης τιμής προς την πραγματική συγκέντρωση του αναλύτη. Ως μέτρο έκφρασης της ορθότητας χρησιμοποιείται το επί τοις εκατό σχετικό σφάλμα (%Er). Η πιστότητα εκφράζει την εγγύτητα μεταξύ των αποτελεσμάτων μιας σειράς ανεξάρτητων εφαρμογών της μεθόδου υπό αυστηρά καθορισμένες συνθήκες και εκφράζεται συνήθως με την % σχετική τυπική απόκλιση (%RSD).

Η προτεινόμενη μέθοδος ελέγχθηκε ως προς την ορθότητα και την πιστότητά της, τόσο κατά τη διάρκεια μιας εργαστηριακής ημέρας, όσο και μεταξύ των ημερών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν μικτά δείγματα ελέγχου σε τρία



επίπεδα συγκεντρώσεων 1,5, 3,0 και 4,5 µg/mL για την αλισκιρένη και 0,125, 0,25 και 3,0 µg/mL για το υδροχλωροθειαζίδιο , αντίστοιχα. Σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν πέντε δείγματα κάθε εργαστηριακή ημέρα, ενώ ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε τέσσερις εργαστηριακές ημέρες (20 συνολικά μετρήσεις ανά επίπεδο συγκέντρωσης).

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων για την εκτίμηση της ορθότητας και της πιστότητας πραγματοποιήθηκε με το υπολογιστικό πρόγραμμα StatMost. Για τον υπολογισμό των στατιστικών παραμέτρων χρησιμοποιήθηκε η μονόδρομη ανάλυση διακύμανσης (one way ANOVA). Η πιστότητα της μεθόδου εκτιμήθηκε με βάση τις % σχετικές τυπικές αποκλίσεις και η ορθότητα με βάση το % σχετικό σφάλμα.

Αναλυτικότερα, υπολογίσθηκαν οι παρακάτω παράμετροι :

- η ολική μέση τιμή των υπολογιζόμενων συγκεντρώσεων (overall mean)
- η, εντός της ημέρας, % σχετική τυπική απόκλιση (intra day % RSD)
- η, μεταξύ των ημερών, % σχετική τυπική απόκλιση (inter day % RSD)
- το % σχετικό σφάλμα ( $E_r$  %).

Στους πίνακες 4.15 και 4.16 παρουσιάζονται οι ευρεθείσες τιμές για κάθε μέτρηση καθώς και οι τιμές των παραπάνω παραμέτρων για κάθε ένα από τα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων της αλισκιρένης και του υδροχλωροθειαζιδίου που μελετήθηκαν.

**Πίνακας 4.15** Ακρίβεια και επαναληψιμότητα της χρωματογραφικής μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αλισκιρένης.

Θεωρητική Συγκέντρωση ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	<b>1,5</b>	<b>3,0</b>	<b>4,5</b>
	1,446	2,910	4,341
Πειραματική συγκέντρωση ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	1,413	2,832	4,409
<u>πρώτη σειρά μετρήσεων</u>	1,413	2,808	4,332
	1,405	2,955	4,435
	1,462	2,958	4,571
Μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση	1,428 $\pm$ 0,025	2,892 $\pm$ 0,069	4,418 $\pm$ 0,096
% σχετικό σφάλμα	<b>5,8</b>	<b>-3,6</b>	<b>-1,8</b>
Πειραματική συγκέντρωση ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	1,408	2,924	4,497
<u>δεύτερη σειρά μετρήσεων</u>	1,487	2,924	4,496
	1,474	2,888	4,585
	1,455	2,922	4,422
	1,489	3,082	4,569
Μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση	1,462 $\pm$ 0,033	2,948 $\pm$ 0,076	4,514 $\pm$ 0,066
% σχετικό σφάλμα	<b>8,3</b>	<b>-1,7</b>	<b>0,3</b>
Πειραματική συγκέντρωση ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	1,385	2,811	4,427
<u>τρίτη σειρά μετρήσεων</u>	1,352	2,839	4,315
	1,399	2,933	4,549
	1,415	2,784	4,442
	1,382	2,811	4,385
Μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση	1,387 $\pm$ 0,023	2,836 $\pm$ 0,058	4,424 $\pm$ 0,085
% σχετικό σφάλμα	<b>2,7</b>	<b>-5,5</b>	<b>-1,7</b>
Πειραματική συγκέντρωση ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	1,542	2,776	4,402
<u>τέταρτη σειρά μετρήσεων</u>	1,448	2,812	4,589
	1,435	2,810	4,555
	1,456	2,798	4,556
	1,352	2,809	4,564
Μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση	1,446 $\pm$ 0,068	2,801 $\pm$ 0,015	4,534 $\pm$ 0,075
% σχετικό σφάλμα	<b>7,1</b>	<b>-6,6</b>	<b>0,7</b>
Αριθμός μετρήσεων ( <b>n</b> )	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>
Ολική μέση τιμή	<b>1,431</b>	<b>2,869</b>	<b>4,472</b>
%Σχετικό σφάλμα ( <b>%E<sub>r</sub></b> )	<b>-4,6</b>	<b>-4,4</b>	<b>-0,6</b>
Εντός της ημέρας % σχετική τυπική απόκλιση ( <b>% RSD<sub>intra day</sub></b> )	<b>2,9</b>	<b>2,1</b>	<b>1,8</b>
Μεταξύ των ημερών % σχετική τυπική απόκλιση ( <b>% RSD<sub>inter day</sub></b> )	<b>5,0</b>	<b>5,0</b>	<b>2,9</b>

**Πίνακας 4.16** Ακρίβεια και επαναληψιμότητα της χρωματογραφικής μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό του υδροχλωροθειαζίδιου.

Θεωρητική Συγκέντρωση ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	<b>0,125</b>	<b>0,25</b>	<b>0,375</b>
	0,1243	0,2601	0,3957
Πειραματική συγκέντρωση ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0,1214	0,2641	0,3932
<u>πρώτη σειρά μετρήσεων</u>	0,1316	0,2349	0,4063
	0,1160	0,2513	0,3871
	0,1265	0,2433	0,4150
Μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση	0,1240 $\pm$ 0,0058	0,2507 $\pm$ 0,012	0,3995 $\pm$ 0,0111
% σχετικό σφάλμα	-0,8	0,3	6,5
Πειραματική συγκέντρωση ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0,1288	0,2486	0,3890
<u>δεύτερη σειρά μετρήσεων</u>	0,1239	0,2438	0,3991
	0,1223	0,2452	0,3829
	0,1266	0,2503	0,3795
	0,1254	0,2534	0,3997
Μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση	0,1254 $\pm$ 0,0025	0,2483 $\pm$ 0,0039	0,3901 $\pm$ 0,0092
% σχετικό σφάλμα	0,3	-0,7	4,0
Πειραματική συγκέντρωση ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0,1183	0,2444	0,3968
<u>τρίτη σειρά μετρήσεων</u>	0,1121	0,2479	0,3939
	0,1196	0,2575	0,4078
	0,1226	0,2375	0,3964
	0,1146	0,2434	0,3805
Μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση	0,1178 $\pm$ 0,0041	0,2461 $\pm$ 0,071	0,3951 $\pm$ 0,0101
% σχετικό σφάλμα	-6,1	-1,5	5,4
Πειραματική συγκέντρωση ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0,1219	0,2388	0,3843
<u>τέταρτη σειρά μετρήσεων</u>	0,1270	0,2255	0,3987
	0,1250	0,2303	0,3844
	0,1343	0,2527	0,3912
	0,1112	0,2447	0,3926
Μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση	0,1241 $\pm$ 0,0078	0,2444 $\pm$ 0,0103	0,3902 $\pm$ 0,0062
% σχετικό σφάλμα	-0,9	-2,2	4,1
Αριθμός μετρήσεων ( <b>n</b> )	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>
Ολική μέση τιμή	<b>0,1227</b>	<b>0,2474</b>	<b>0,3938</b>
%Σχετικό σφάλμα ( <b>%E<sub>r</sub></b> )	<b>-1,8</b>	<b>-1,0</b>	<b>5,0</b>
Εντός της ημέρας %σχετική τυπική απόκλιση ( <b>% RSD<sub>intra day</sub></b> )	<b>4,6</b>	<b>2,3</b>	<b>2,4</b>
Μεταξύ των ημερών %σχετική τυπική απόκλιση ( <b>% RSD<sub>inter day</sub></b> )	<b>6,1</b>	<b>4,1</b>	<b>2,2</b>

Από τα αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι η εντός της ημέρας και η μεταξύ των ημερών % σχετική τυπική απόκλιση και για τα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν δεν ξεπέρασαν την τιμή 5% για την αλισκιρένη και 6,1 % για το υδροχλωροθειαζίδιο. Επιπρόσθετα, η ορθότητα της μεθόδου, όπως αυτή εκφράζεται από το % σχετικό αναλυτικό σφάλμα βρέθηκε να κυμαίνεται μεταξύ των τιμών -0,6 έως -4,4 % για την αλισκιρένη και -1,8 έως 5,0% για το υδροχλωροθειαζίδιο.

#### 4.12 Ανθεκτικότητα της μεθόδου

Η ανθεκτικότητα μιας μεθόδου δείχνει την αξιοπιστία (reliability) μιας ανάλυσης σε σχέση με προσχεδιασμένες μεταβολές στις πειραματικές παραμέτρους της μεθόδου.

Για την αξιολόγηση της μεθόδου μελετήθηκε η επιρροή μικρών προμελετημένων διαφοροποιήσεων των παραμέτρων της μεθόδου στους χρόνους ανάλυσης της αλισκιρένης-υδροχλωροθειαζιδίου και του εσωτερικού προτύπου. Οι παράγοντες που επιλέχθηκαν να μελετηθούν ήταν: η συγκέντρωση του οξικού αμμωνίου, η ταχύτητα ροής και το μήκος κύματος. Κάθε παράγοντας μελετήθηκε σε τρία επίπεδα (-1, 0, 1). Κάθε φορά μεταβάλλεται μόνο ένας παράγοντας για να υπολογισθεί η επίδραση του, ενώ οι υπόλοιποι παράγοντες διατηρούνται σταθεροί. Σε επαναλαμβανόμενες εγχύσεις (  $n=3$  ) ενός μίγματος διαλύματος που περιείχε  $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  αλισκιρένης και  $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  υδροχλωροθειαζιδίου, καθώς και  $1,0 \mu\text{g/mL}$  βρομαζεπάμης πραγματοποιήθηκαν μικρές αλλαγές των παραμέτρων που προαναφέρθηκαν (παράγοντες ). Στον πίνακα 4.17 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μελετών ανθεκτικότητας.

<b>Πίνακας 4.17</b> Έλεγχος ανθεκτικότητας της μεθόδου HPLC για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αλισκιρένης και του υδροχλωροθειαζιδίου.										
<b>Χρωματογραφικές μεταβολές</b>		<b>Υδροχλωροθειαζίδιο</b>			<b>Βρωμαζεπάμη (IS)</b>			<b>Αλισκιρένη</b>		
<b>Παράγοντες</b>	<b>Επίπεδο</b>	<b>tr<sup>α</sup></b>	<b>k'<sup>β</sup></b>	<b>T<sub>v</sub></b>	<b>tr<sup>α</sup></b>	<b>k'<sup>β</sup></b>	<b>T<sub>v</sub></b>	<b>tr<sup>α</sup></b>	<b>k'<sup>β</sup></b>	<b>T<sub>v</sub></b>
<b>A. Συγκέντρωση οξικού αμμωνίου (mM)</b>										
29	-1	1,756	1,22	1,43	2,531	2,20	2,03	5,569	6,03	1,19
30	0	1,727	1,17	1,48	2,473	2,10	1,91	5,157	5,47	1,28
31	1	1,832	1,28	1,43	2,725	2,39	2,06	6,139	6,65	1,18
<b>Μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (n=3)</b>		<b>1,772 ± 0,054</b>	<b>1,223 ± 0,055</b>	<b>1,447 ± 0,029</b>	<b>2,576 ± 0,132</b>	<b>2,230 ± 0,147</b>	<b>2,000 ± 0,079</b>	<b>5,622 ± 0,493</b>	<b>6,050 ± 0,590</b>	<b>1,217 ± 0,006</b>
<b>B. Ταχύτητα ροής (mL min<sup>-1</sup>)</b>										
0,39	-1	1,777	1,22	1,58	2,516	2,14	2,13	5,268	5,57	1,28
0,40	0	1,727	1,17	1,48	2,473	2,10	1,91	5,157	5,47	1,19
0,41	1	1,694	1,21	1,61	2,403	2,13	1,90	5,048	5,57	1,27
<b>Μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (n=3)</b>		<b>1,733 ± 0,042</b>	<b>1,200 ± 0,0026</b>	<b>1,557 ± 0,068</b>	<b>2,464 ± 0,057</b>	<b>2,123 ± 0,021</b>	<b>1,980 ± 0,130</b>	<b>5,158 ± 0,110</b>	<b>5,537 ± 0,058</b>	<b>1,247 ± 0,049</b>
<b>Γ. % Μήκος κύματος (nm)</b>										
279	-1	1,749	1,19	1,53	2,479	2,11	1,94	5,183	5,50	1,31
280	0	1,727	1,17	1,48	2,473	2,10	1,91	5,157	5,47	1,19
281	1	1,752	1,20	1,44	2,476	2,10	1,89	5,184	5,50	1,30
<b>Μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (n=3)</b>		<b>1,743 ± 0,014</b>	<b>1,187 ± 0,015</b>	<b>1,483 ± 0,045</b>	<b>2,476 ± 0,003</b>	<b>2,103 ± 0,006</b>	<b>1,913 ± 0,025</b>	<b>5,175 ± 0,015</b>	<b>5,490 ± 0,017</b>	<b>1,267 ± 0,0067</b>

#### 4.13 Ποσοτικός προσδιορισμός της αλισκιρένης και του υδροχλωροθειαζιδίου σε φαρμακευτικά σκευάσματα

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε εφαρμόστηκε στην ανάλυση εμπορικά διαθέσιμων δισκίων που περιείχαν 150 mg αλισκιρένης και 12,5 mg υδροχλωροθειαζιδίου, (RasilezHCT 150/12,5). Ο προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε σε ποσότητα δισκίων ίση με το μέσο βάρος αυτών (439.9 mg) η οποία αντιστοιχεί σε 150 mg αλισκιρένης και 12,5 mg υδροχλωροθειαζιδίου, σύμφωνα με τη μέθοδο κατεργασίας δισκίων (παρ. 4.8). Δέκα διαφορετικά δείγματα παρασκευάζονται και αναλύονται χρωματογραφικά σύμφωνα με τις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες. Στους πίνακες 4.19 και 4.20 συνοψίζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης.

<b>Πίνακας 4.18.</b> Ανάλυση αλισκιρένης σε σκόνη δισκίων φαρμακευτικών σκευασμάτων.					
a/ a	Λόγος επιφανειών	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg mL <sup>-1</sup> )	Ευρεθείσα ποσότητα αλισκιρένης ανά δισκίο (mg)	% επί της αναγραφόμενης τιμής	%E.
1	1,605	2,96	148,00	98,7	-1,4
2	1,566	2,88	144,00	96,0	-3,8
3	1,585	2,92	146,00	97,3	-2,6
4	1,598	2,95	147,50	98,3	-1,8
5	1,586	2,92	146,00	97,3	-2,6
6	1,607	2,96	148,00	98,7	-1,3
7	1,620	2,99	149,50	99,7	-0,5
8	1,636	3,01	150,50	100,3	0,5
9	1,619	2,98	149,00	99,5	-0,6
10	1,607	2,96	148,00	98,7	-1,3
<b>Μέση τιμή ± τυπική απόκλιση<sub>(n=10)</sub></b>			<b>147,65 ± 1,90</b>	<b>98,5 ± 1,3</b>	<b>-1,5</b>

**Πίνακας 4.19** Ανάλυση του υδροχλωροθειαζιδίου σε σκόνη δισκίων φαρμακευτικών σκευασμάτων.

α/ α	Λόγος επιφανειών	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg mL <sup>-1</sup> )	Ευρεθείσα ποσότητα υδροχλωροθειαζιδίου ανά δισκίο (mg)	% επί της αναγραφόμενης τιμής	%Er
1	0,569	0,246	12,30	98,4	-1,4
2	0,573	0,248	12,40	99,2	-0,6
3	0,570	0,247	12,35	98,8	-1,2
4	0,578	0,250	12,50	100,0	0,1
5	0,572	0,248	12,40	99,2	-0,9
6	0,584	0,253	12,65	101,2	1,2
7	0,578	0,250	12,50	100,0	0,1
8	0,567	0,246	12,30	98,4	-1,7
9	0,575	0,249	12,45	99,6	-0,3
10	0,571	0,247	12,35	98,8	-1,1
<b>Μέση τιμή ± τυπική απόκλιση<sub>(n=10)</sub></b>			<b>12,42 ± 0,11</b>	<b>99,4 ± 0,9</b>	<b>-0,6</b>

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κανένα από τα αναλυόμενα δείγματα δεν είναι εκτός των ορίων καθώς η μέση ποσότητα της αλisciρένης επί της αναγραφόμενης τιμής είναι  $98,5 \pm 1,3$  ή  $147,65 \pm 1,9$  mg ανά δισκίο (n=10), με μέσο % σχετικό σφάλμα -1,5 % και καθώς η μέση ποσότητα του υδροχλωροθειαζιδίου επί της αναγραφόμενης τιμής είναι  $99,4 \pm 0,9$  ή  $12,42 \pm 0,11$  mg ανά δισκίο (n=10), με μέσο % σχετικό σφάλμα -0,6 %

#### 4.14 Έλεγχος της ομοιομορφίας του περιεχομένου στην ανάλυση δισκίων αλisciρένης-υδροχλωροθειαζιδίου

Η μέθοδος αποδείχτηκε κατάλληλη για τον έλεγχο ομοιομορφίας, όπου απαιτείται ένας μεγάλος αριθμός δοκιμών σε μεμονωμένα δισκία. Δύο διαφορετικές εμπορικές παρτίδες διαθέσιμων δισκίων που περιέχουν αλisciρένη-υδροχλωροθειαζίδιο αναλύθηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο. Η ανάλυση των δισκίων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την προεπιλεγμένη μέθοδο κατεργασίας των δισκίων η οποία παρουσιάζεται στην παράγραφο 4.8. Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε εσωτερικό πρότυπο και ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της αλisciρένης και του υδροχλωροθειαζιδίου πραγματοποιήθηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς μετρώντας το λόγο του

εμβαδού της κορυφής του κάθε αναλύτη προς το εμβαδόν της κορυφής του εσωτερικού προτύπου. Στον πίνακα 4.21 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του μέσου όρου των δέκα διαφορετικών μετρήσεων όπως προκύπτουν από την ανάλυση δύο διαφορετικών παρτίδων δισκίων RasilezHCT 150/12,5.

**Πίνακας 4.20** Προσδιορισμός της αλισκιρένης σε φαρμακευτικά σκευάσματα με υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης.

Φαρμακευτικό σκεύασμα: RasilezHCT (150mg/12.5 mg)	Ευρεθείσα ποσότητα της αλισκιρένης mg/δισκίο <sup>α</sup>	
Παρτίδα	Μέση τιμή ± SD (n=10)	Ανάκτηση (%)
1	149,5 ± 3,5	99,7 ± 2,3
2	148,7 ± 3,6	99,1 ± 2,4

<sup>α</sup> Τα αποτελέσματα αποτελούν τον μέσο όρο δέκα διαφορετικών μετρήσεων δισκίων της ίδιας παρτίδας.

**Πίνακας 4.21** Προσδιορισμός του υδροχλωροθειαζιδίου σε φαρμακευτικά σκευάσματα με υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης.

Φαρμακευτικό σκεύασμα: RasilezHCT (150mg/12.5 mg)	Ευρεθείσα ποσότητα του υδροχλωροθειαζιδίου mg/δισκίο <sup>α</sup>	
Παρτίδα	Μέση τιμή ± SD (n=10)	Ανάκτηση (%)
1	12,3 ± 0,3	98,3 ± 2,7
2	12,3 ± 0,4	98,0 ± 3,2

<sup>α</sup> Τα αποτελέσματα αποτελούν τον μέσο όρο δέκα διαφορετικών μετρήσεων δισκίων της ίδιας παρτίδας.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κανένα από τα αναλυόμενα δείγματα δεν είναι εκτός των ορίων καθώς η μέση % ποσότητα αλισκιρένης επί της αναγραφόμενης τιμής είναι 99,7 και 99,1 % και η μέση % ποσότητα του υδροχλωροθειαζιδίου επί της αναγραφόμενης τιμής είναι 98,3 και 98,0 %, ενώ η μέση ποσότητα αλισκιρένης είναι ανά δισκίο είναι 149,5 και 148,7 mg ανά δισκίο και η μέση ποσότητα υδροχλωροθειαζιδίου είναι ανά δισκίο 12,3 και 12,3 mg ανά δισκίο για τις παρτίδες 1 και 2 αντίστοιχα.



#### 4.15 Μελέτες Σταθερότητας

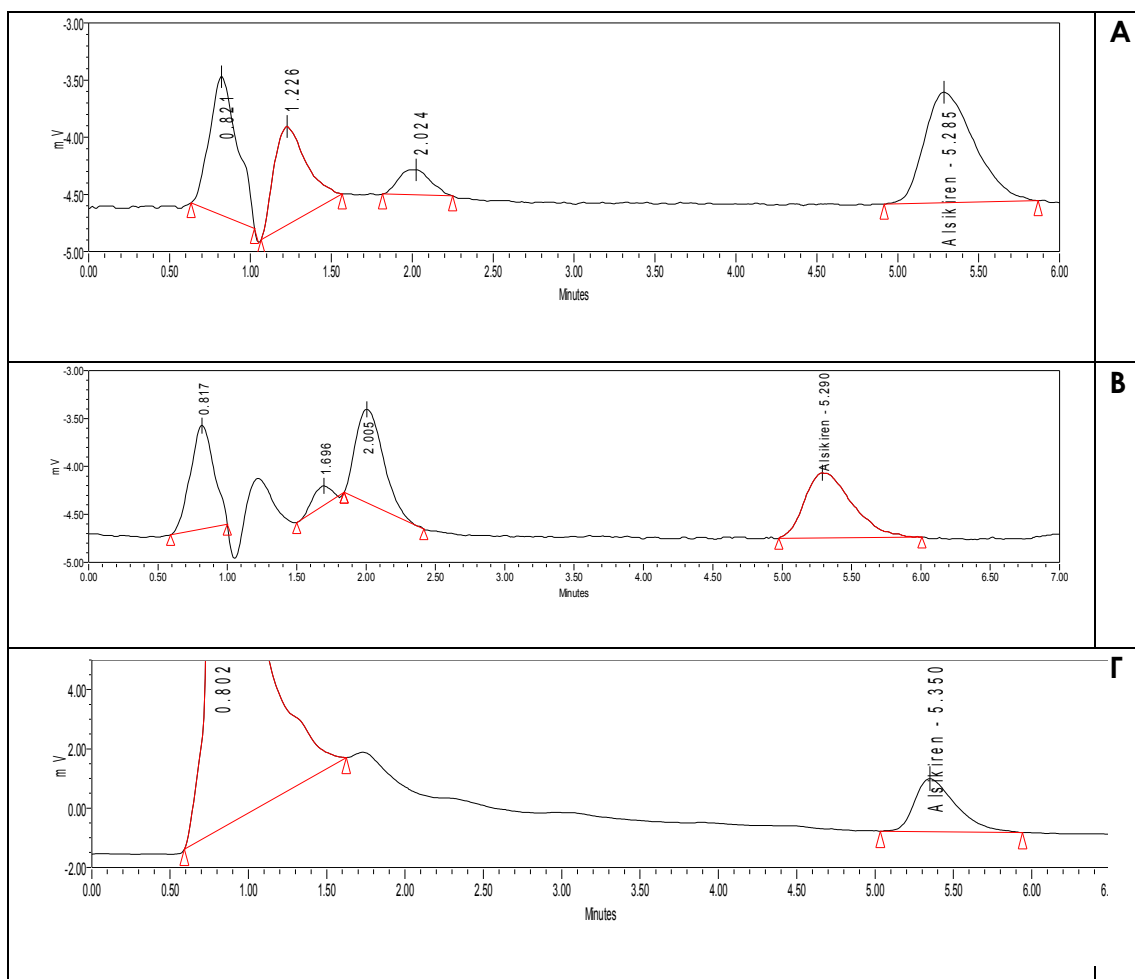
Με σκοπό να διαπιστωθεί περαιτέρω η εκλεκτικότητα της μεθόδου στον ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών, πραγματοποιήθηκαν μελέτες επιταχυνόμενης διάσπασης με κατεργασία των δραστικών συστατικών σε διαφορετικές συνθήκες φύλαξης. Στη μελέτη αποικοδόμησης μελετήθηκε αρχικά η επίδραση των εξής συνθηκών αποθήκευσης: όξινο περιβάλλον 1,0 M HCl σε 25°C, διάλυμα 1,0 M NaOH σε 25 °C και διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> συγκέντρωσης 5,0% v/v σε 25 °C. Παρασκευάζονται αρχικά πυκνά διαλύματα των αναλυτών σε συγκεντρώσεις 60 µg/ml για την αλισκιρένη και το υδροχλωροθειαζίδιο, αντίστοιχα, στους παραπάνω διαλύτες. Σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα λαμβάνεται ακριβώς 500 µL από τα παραπάνω πυκνά διαλύματα και αραιώνεται στα 10ml εξουδετερώνοντας κάθε φορά το με την αντίστοιχη ποσότητα οξέος ή βάσης.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των αναλυτών επιτυγχάνεται με καμπύλες αναφοράς που έγιναν με τον προσδιορισμό του εμβαδού των χρωματογραφικών κορυφών. Τα αποτελέσματα των μελετών συνοψίζονται στον πίνακα 4.23. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα των μελετών σταθερότητας η αλισκιρένη μετά από 145 ώρες παραμονής σε όξινο περιβάλλον η % ανάκτησή της ανέρχεται σε ποσοστό 52,2% και στις συνθήκες της χρωματογραφικής ανάλυσης ανιχνεύονται δύο προϊόντα διάσπασης στα 2,14 και 5,38 λεπτά, από τη διάσπασή της σε αλκαλικό περιβάλλον δεν εμφανίζονται προϊόντα διάσπασης σε αυτό το μήκος κύματος ανίχνευσης και μετά από 145 λεπτά η % ανάκτησή της είναι 60,0 %. Η διάσπαση της αλισκιρένης σε οξειδωτικές συνθήκες με 5% v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> προχωράει αργά και μετά από 170 λεπτά η ανάκτησή της παραμένει σε ποσοστό 88,0% χωρίς να ανιχνεύονται προϊόντα διάσπασης. Η % ανάκτηση του υδροχλωροθειαζιδίου μετά από 145 ώρες σε αλκαλικό περιβάλλον είναι 18,7%, και σε όξινο περιβάλλον είναι 31,4%. Σε οξειδωτικές συνθήκες η % ανάκτηση του υδροχλωροθειαζιδίου είναι 53,8 %. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε καμία από τις περιπτώσεις επιταχυνόμενης διάσπασης του υδροχλωροθειαζιδίου δεν εμφανίζονται προϊόντα διάσπασης που θα μπορούσαν να παρεμποδίσουν τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό των δύο αναλυτών.

Από τις μελέτες αυτές διαπιστώθηκε ότι τα προϊόντα διάσπασης που ανιχνεύονται δεν παρεμποδίζουν τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό των δύο αναλυτών στις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες.

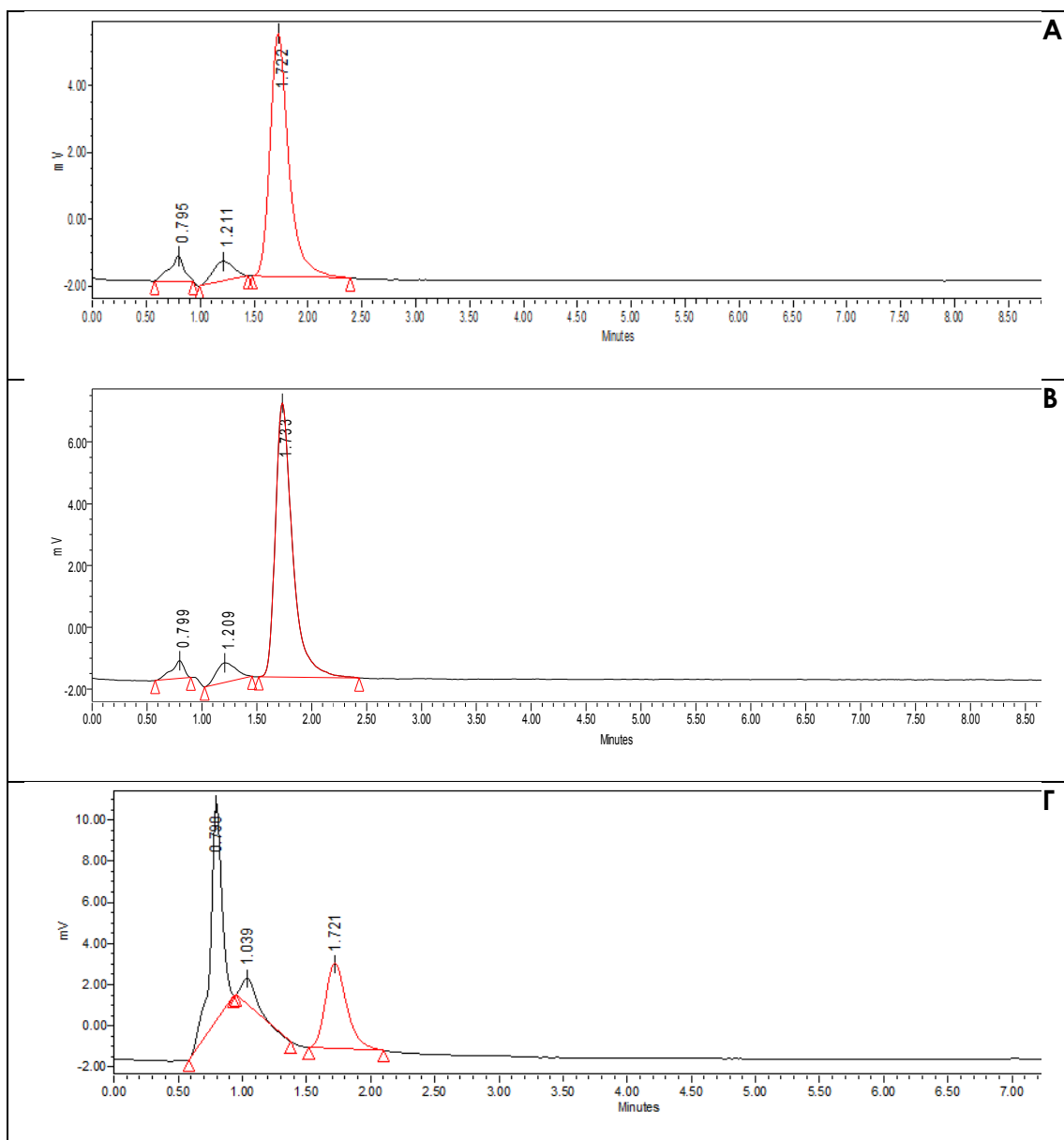
<b>Πίνακας 4.23</b> Μελέτες σταθερότητας της αλισκιρένης και του υδροχλωροθειαζιδίου σε διάφορες συνθήκες φύλαξης με την τεχνική HPLC-UV.			
Αναλύτης/ Συνθήκες φύλαξης	Χρόνος διάσπασης (ώρες)	Συγκέντρωση ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) / % ανάκτηση	Προϊόντα διάσπασης/ χρόνοι κατακράτησης
<b>Αλισκιρένη</b>			
Όξινο περιβάλλον (HCl 1,0 M, 25°C)	0	3,04 (101,2)	2,148, 13,538 2,148, 13,538
	0,25	2,96 (98,8)	
	0,5	2,95 (98,3)	
	48	2,43 (81,1)	
	68	2,44 (81,3)	
	145	1,57 (52,2)	
Αλκαλικό περιβάλλον (NaOH 1,0 M, 25°C)	0	2,98 (99,5)	
	0,25	3,03 (100,9)	
	0,5	3,01 (100,2)	
	48	2,27 (75,8)	
	67	1,90 (63,3)	
	145	1,20 (40,0)	
Οξειδωτικές συνθήκες (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 5% v/v, 25°C)	0	2,99 (99,6)	7,586
	0,5	2,96 (98,6)	
	1,0	2,96 (98,5)	
	23	2,94 (98,0)	
	48	2,87 (95,7)	
	96	2,66 (88,7)	
	170	2,64 (88,0)	
<b>Υδροχλωροθειαζίδιο</b>			
Όξινο περιβάλλον (HCl 1,0 M, 25°C)	0	4,17 (104,2)	-
	24	3,42 (85,6)	
	48	3,48 (86,9)	
	67	3,50 (87,5)	
	145	0,75 (18,7)	
Αλκαλικό περιβάλλον (NaOH 1,0 M, 25°C)	0	4,15 (103,6)	-
	24	3,32 (82,9)	
	48	3,25 (81,6)	
	67	3,20 (79,9)	
	145	1,26 (31,4)	
Οξειδωτικές συνθήκες (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 5% v/v, 25°C)	0	4,12 (102,9)	-
	1,0	3,93 (98,3)	
	24	2,86 (71,5)	
	48	3,05 (76,2)	
	67	2,43 (60,9)	
145	2,15 (53,8)		

Στο σχήμα 4.8. απεικονίζονται τυπικά χρωματογραφήματα που λαμβάνονται από την ανάλυση δειγμάτων της επιταχυνόμενης διάσπασης της αλισκιρένης σε όξινο περιβάλλον με 1,0 M HCl στους 25 °C για 145 ώρες, σε αλκαλικό περιβάλλον με 1,0 M NaOH στους 25 °C για 145 ώρες και σε διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5,0 % v/v στου 25 °C για 170 ώρες.



**Σχήμα 4.8:** Τυπικά χρωματογραφήματα από τις μελέτες επιταχυνόμενης διάσπασης της αλισκιρένης **(Α)** μετά από παραμονή για 145 ώρες σε υδατικό διάλυμα HCl 0,1 M στους 25°C, **(Β)** μετά από παραμονή για 145 ώρες σε υδατικό διάλυμα NaOH 0,1 M στους 25°C, και **(Γ)** μετά από παραμονή για 170 ώρες σε διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% (v/v). Σε όλες τις περιπτώσεις η θεωρητική συγκέντρωση της αλισκιρένης σε χρόνο t<sub>0</sub> από την έναρξη της διάσπασης ήταν 4,0 μg mL<sup>-1</sup>.

Στο σχήμα 4.9 απεικονίζονται τυπικά χρωματογραφήματα που λαμβάνονται από την ανάλυση δειγμάτων της επιταχυνόμενης διάσπασης του υδροχλωροθειαζιδίου σε όξινο περιβάλλον με 1,0 M HCl στους 25 °C για 145 ώρες, σε αλκαλικό περιβάλλον με 1,0 M NaOH στους 25 °C για 145 ώρες και σε διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5,0 % v/v στου 25 °C για 145 ώρες.

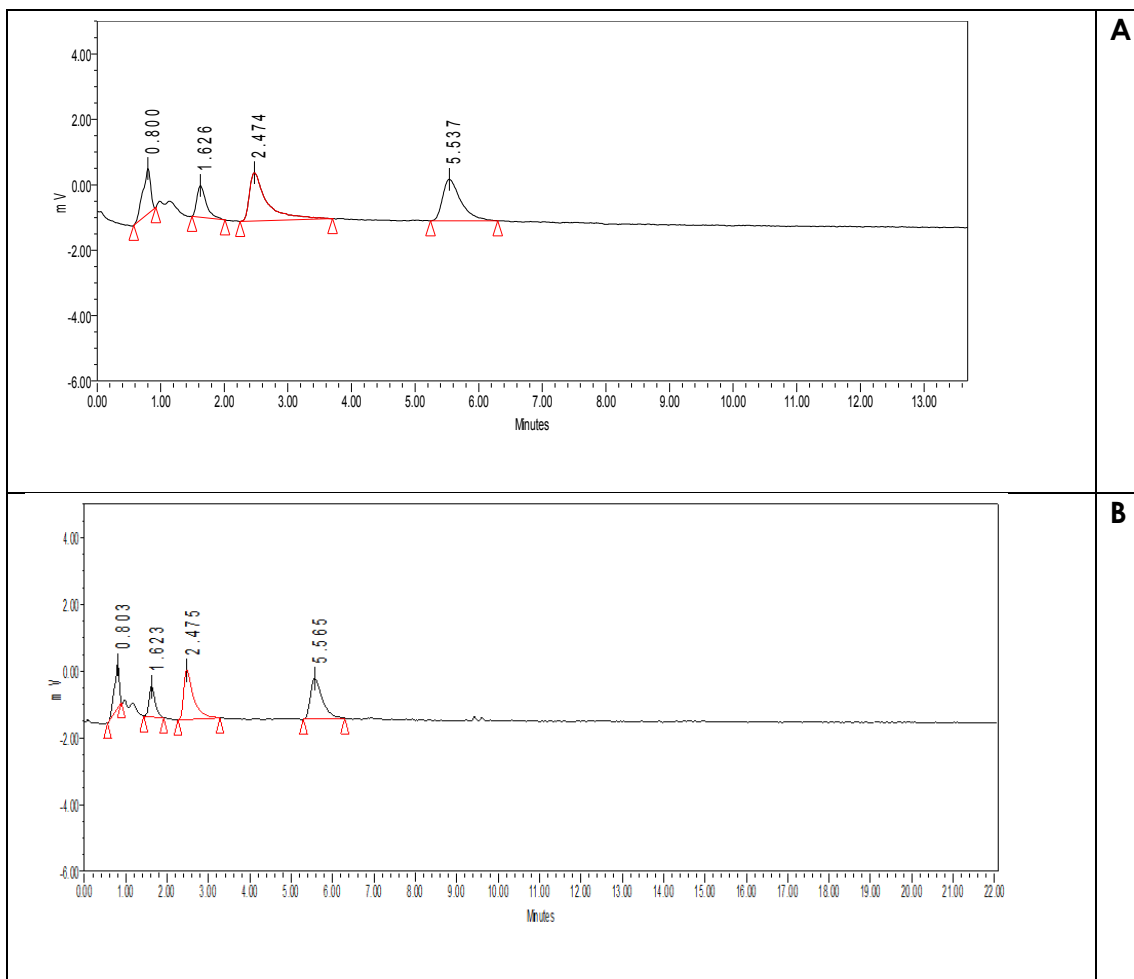


**Σχήμα 4.9:** Τυπικά χρωματογραφήματα από τις μελέτες επιταχυνόμενης διάσπασης του υδροχλωροθειαζιδίου (A) μετά από παραμονή για 169 ώρες σε υδατικό διάλυμα HCl 0,1 M στους 25°C, (B) μετά από παραμονή για 169 ώρες σε υδατικό διάλυμα NaOH 0,1 M στους 25°C, και (Γ) μετά από παραμονή για 193 ώρες σε διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% (v/v). Σε όλες τις περιπτώσεις η θεωρητική συγκέντρωση της αλισκιρένης σε χρόνο t<sub>0</sub> από την έναρξη της διάσπασης ήταν 4,0 μg mL<sup>-1</sup>.

Μελετήθηκε η σταθερότητα των δισκίων Rasilez HCT 150/12.5 με αποθήκευση σε θερμοκρασία 50°C ± 2 °C παρουσία 70% σχετικής υγρασίας και απουσία υγρασίας για χρονικό διάστημα 6 μηνών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 4.22.

<b>Πίνακας 4.22</b> Μελέτες σταθερότητας των δισκίων Rasilez HCT 150/12.5 με την τεχνική HPLC-UV.			
Συνθήκες φύλαξης/αναλύτης	Χρόνος διάσπασης (μήνες)	Συγκέντρωση/ δισκίο(mg) n=2	% Ανάκτηση
<b>Αλισκιρένη</b>			
50 ± 2°C/ 70% σχετική υγρασία	1	150,4	100,3
	2	150,5	100,3
	3	146,5	97,7
	4	145,2	96,8
	5	139,5	93,0
	6	139,0	92,7
50 ± 2°C	1	149,5	99,7
	2	146,6	97,8
	3	142,3	94,9
	4	141,7	94,5
	5	141,2	94,1
	6	138,2	92,1
<b>Υδροχλωροθειαζίδιο</b>			
50 ± 2°C / 70% σχετική υγρασία	1	12,3	98,4
	2	12,6	100,4
	3	12,1	97,1
	4	11,6	92,5
	5	11,3	90,8
	6	11,0	88,3
50 ± 2°C	1	12,3	98,4
	2	12,3	98,4
	3	12,1	96,4
	4	11,8	94,6
	5	11,6	92,7
	6	11,5	91,8

Η % ανάκτηση μετά από έξι μήνες αποθήκευσης στους 50± 2°C βρέθηκε 92,1% και 91,8% για την αλισκιρένη και το υδροχλωροθειαζίδιο, αντίστοιχα. Μετά από αποθήκευση στους 50 ± 2°C παρουσία 70% σχετική υγρασίας η % ανάκτηση ήταν 92,7 και 88,3% για την αλισκιρένη και το υδροχλωροθειαζίδιο, αντίστοιχα.



**Σχήμα 4.10:** **A:**Τυπικό χρωματογράφημα από την ανάλυση ενός δισκίου Rasilez HCT® μετά από 6 μήνες αποθήκευση σε θερμοκρασία 50°C χωρίς υγρασία. Οι χρόνοι ανάσχεσης της αλισκιρένης, του υδροχλωροθειαζιδίου και της βρωμαζεπάμης είναι 5,537 , 1,626 και 2,474 λεπτά αντίστοιχα. **B:** Τυπικό χρωματογράφημα από την ανάλυση ενός δισκίου Rasilez HCT® μετά από 6 αποθήκευσης σε θερμοκρασία **50°C** παρουσία **70%** σχετικής υγρασίας. Οι χρόνοι ανάσχεσης της αλισκιρένης, του υδροχλωροθειαζιδίου και της βρωμαζεπάμης είναι 5,565, 1,623 και 2,475 λεπτά αντίστοιχα.

Εξετάζοντας τα παραπάνω στοιχεία επιταχυνόμενης διάσπασης παρατηρούμε ότι δεν εμφανίζονται οποιαδήποτε προϊόντα διάσπασης που θα μπορούσαν να παρεμποδίσουν τον προσδιορισμό των αναλυτών υπό τις επιλεγμένες βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες.

#### 4.16 Έλεγχος ειδικότητας μεθόδου προσδιορισμού

Ο έλεγχος ειδικότητας είναι ο έλεγχος ικανότητας της μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αλισκιρένης και του υδροχλωροθειαζιδίου παρουσία εκδόχων. Πραγματοποιήθηκαν μελέτες ανάκτησης του εκάστοτε αναλύτη χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της γνωστής προσθήκης.

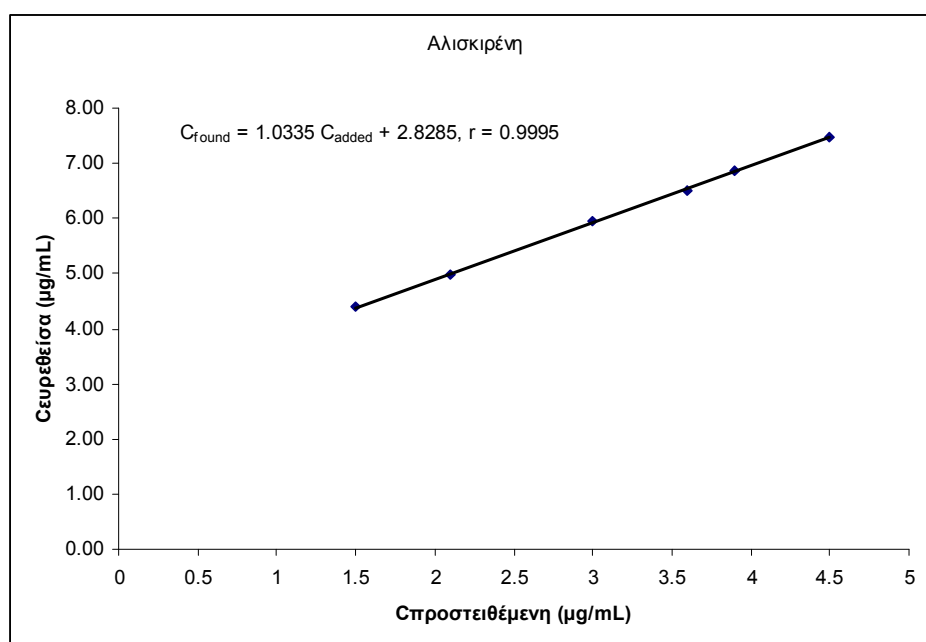
Παρασκευάζονται 6 διαφορετικά μικτά διαλύματα παρακαταθήκης αλισκιρένης και υδροχλωροθειαζιδίου συγκεντρώσεων 30, 42, 60, 72, 78 και 90  $\mu\text{g mL}^{-1}$  σε αλισκιρένη και 2,5, 3,5, 5, 6, 6,5 και 7,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  σε υδροχλωροθειαζίδιο, αντίστοιχα. Σε κάθενα από αυτά τα μικτά διαλύματα έχει προστεθεί ακριβώς 1mL από ένα διάλυμα δισκίου Ralisez/Hct συγκέντρωσης 60,0  $\mu\text{g/mL}$  σε αλισκιρένης και 0,25  $\mu\text{g/mL}$  σε υδροχλωροθειαζίδιο. Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την προεπιλεγμένη μέθοδο κατεργασίας των δισκίων. Σε όλες τις περιπτώσεις ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της αλισκιρένης και της υδροχλωροθειαζιδίου πραγματοποιήθηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς μετρώντας το εμβαδόν της κορυφής αλισκιρένης και της υδροχλωροθειαζιδίου και υπολογίζοντας το λόγο της με το εσωτερικό πρότυπο κάθε φορά αντίστοιχως. Ακολουθως καταρτίζεται καμπύλη αναφοράς με γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης των αποτελεσμάτων ανάμεσα στην ευρεθείσα ποσότητα του αναλύτη και την προστεθείσα ποσότητα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 4.23 και στα σχήματα 4.8 και 4.9.

<b>Πίνακας 4.23</b> Αποτελέσματα της τεχνικής της γνωστής προσθήκης				
	<b>Προστεθείσα ποσότητα <sup>α</sup> (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	<b>Ευρεθείσα ποσότητα (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	<b>M <sup>β</sup></b>	<b>Ανάκτηση <sup>γ</sup> (%)</b>
<b>Αλισκιρένη</b>			<b>1,033</b>	<b>103,3</b>
	1,5	4,39		
	2,1	4,97		
	3,0	5,96		
	3,6	6,51		
	3,9	6,87		
	4,5	7,49		

<sup>α</sup> πρότυπη ποσότητα αλισκιρένης προστιθέμενη σε σκόνη δισκίων ισοδύναμη με 3,0  $\mu\text{g}$  αλισκιρένης  
<sup>β</sup> m είναι η κλίση της εξίσωσης της καμπύλης αναφοράς  
<sup>γ</sup> ανάκτηση (%) =  $m \times 100$

	Προσθεθείσα ποσότητα <sup>α</sup> (μg)	Ευρεθείσα ποσότητα (μg)	M <sup>β</sup>	Ανάκτηση <sup>γ</sup> (%)
Υδροχλωροθειαζίδιο	0,125	0,361	0,9526	95,2
	0,175	0,412		
	0,250	0,483		
	0,300	0,526		
	0,325	0,550		
	0,375	0,603		

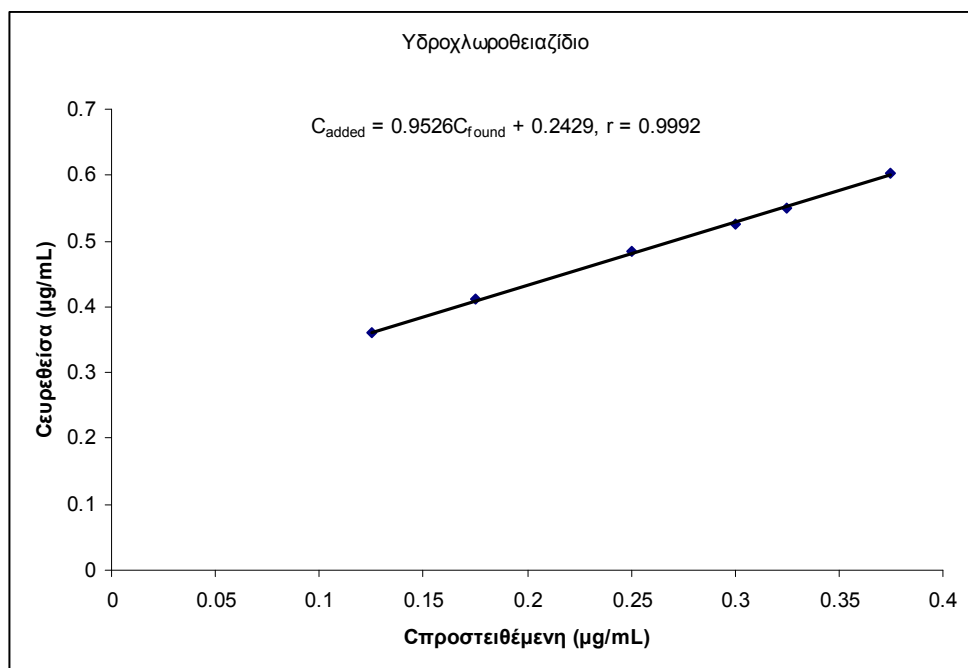
<sup>α</sup> πρότυπη ποσότητα υδροχλωροθειαζιδίου προστιθέμενη σε σκόνη δισκίων ισοδύναμη με 0,25 μg υδροχλωροθειαζιδίου  
<sup>β</sup> m είναι η κλίση της εξίσωσης της καμπύλης αναφοράς  
<sup>γ</sup> ανάκτηση (%) = m × 100



**Σχήμα 4.8** Γραφική παράσταση της καμπύλης αναφοράς μεταξύ της ευρεθείσας και της προστιθέμενης ποσότητας της αλίσκιρηνής σε σκόνη δισκίων RasilezHCT 150/12.5.

Η % ανάκτηση της αλίσκιρηνής υπολογίζεται από την κλίση της καμπύλης αναφοράς x 100 και βρέθηκε ότι είναι ίση με 104.1 % και είναι παρόμοια με την ανάκτηση των δισκίων (παραγραφο 4.8), γεγονός που αποδεικνύει ότι τα υπόλοιπα συστατικά του φαρμακευτικού σκευάσματος δεν παρεμποδίζουν την ανάλυσή της.





**Σχήμα 4.9** Γραφική παράσταση της καμπύλης αναφοράς μεταξύ της ευρεθείσας και της προστιθέμενης ποσότητας του υδροχλωροθειαζιδίου σε σκόνη δισκίων RasilezHCT 150/12.5.

Η % ανάκτηση του υδροχλωροθειαζιδίου υπολογίζεται από την κλίση της καμπύλης αναφοράς  $\times 100$  και βρέθηκε ότι είναι ίση με 95,2 % και είναι παρόμοια με την ανάκτηση των δισκίων (παράγραφο 4.8), γεγονός που αποδεικνύει ότι τα υπόλοιπα συστατικά της κρέμας δεν παρεμποδίζουν την ανάλυση του υδροχλωροθειαζιδίου.

#### 4.17 Συμπεράσματα και προοπτικές

Στην παρούσα διατριβή ειδικευσης περιγράφεται η ανάπτυξη και αξιολόγηση μιας απλής, γρήγορης, εκλεκτικής και ανθεκτικής μεθόδου ανάλυσης για τον προσδιορισμό της αλισκιρένης και του υδροχλωροθειαζιδίου σε δισκία.

Η χρωματογραφική ανάλυση έγινε με τη χρήση συστήματος RP-HPLC, με ανιχνευτή UV-Vis, σε χρωματογραφική στήλη phenyl με διάμετρο πόρων 5  $\mu\text{m}$  (150  $\times$  2,1 mm) και κινητή φάση ACN/CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> 30 mM, 40:60 (v/v) και ταχύτητα ροής 0,40 mL min<sup>-1</sup>. Ο ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) ρυθμίστηκε σε μήκος κύματος ανίχνευσης 280nm. Οι χρόνοι κατακράτησης της αλισκιρένης, του υδροχλωροθειαζιδίου και της βρωμαζεπάμης είναι 5,155 , 1,723 και 2,473 λεπτά αντίστοιχα. Η κατασκευή των καμπυλών αναφοράς

πραγματοποιήθηκε με σειρά μετρήσεων σε γραμμική περιοχή συγκεντρώσεων από 1,5 μέχρι 4,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  για την αλισκιρένη και 0,125 μέχρι 0,375  $\mu\text{g mL}^{-1}$  για το υδροχλωροθειαζίδιο. Το όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης βρέθηκε ότι είναι  $0,28 \pm 0,16 \mu\text{g mL}^{-1}$  και  $0,84 \pm 0,48 \mu\text{g mL}^{-1}$ , για την αλισκιρένη και  $0,0133 \pm 0,0011 \mu\text{g mL}^{-1}$  και  $0,0404 \pm 0,0031 \mu\text{g mL}^{-1}$ , για το υδροχλωροθειαζίδιο, αντίστοιχα. Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε η βρωμαζεπάμη.

Μελετήθηκε η επίδραση της σύστασης της κινητής φάσης, η ροή της κινητής φάσης και το μήκος κύματος του ανιχνευτή σε σχέση με τον χρόνο συγκράτησης και τον παράγοντα χωρητικότητας της αλισκιρένης, του υδροχλωροθειαζιδίου και του εσωτερικού προτύπου. Ο παράγοντες που εξετάστηκε ήταν η συγκέντρωση του οξικού αμμωνίου στην κινητή φάση.

Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από γραμμικότητα, ικανοποιητική ακρίβεια και επαναληψιμότητα, τόσο εντός της ημέρας, όσο και μεταξύ των ημερών. Η εντός της ημέρας, % σχετική τυπική απόκλιση (intra day % RSD) βρέθηκε μικρότερες από 6,1 %, ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στην μεταξύ των ημερών, % σχετική τυπική απόκλιση (inter day % RSD), το ποσοστό του σχετικού τυπικού σφάλματος (Er %) βρέθηκε μικρότερο κατά απόλυτη τιμή από 1,9%. Η μέθοδος κρίθηκε ανθεκτική καθώς μικρές και σταδιακές μεταβολές κάποιων παραμέτρων επέφεραν ελάχιστες μόνο διακυμάνσεις στις υπόλοιπες παραμέτρους. Την ανάπτυξη και αξιολόγηση της μεθόδου ακολούθησαν δοκιμασίες σταθερότητας του φαρμακευτικού σκευάσματος σε διάφορες συνθήκες φύλαξης.

Η αναπτυχθείσα μεθοδολογία εφαρμόστηκε με επιτυχία σε αναλύσεις φαρμακευτικών σκευασμάτων Ralisez/Hct της εταιρίας Novartis. Τα παραπάνω αποτελέσματα σε συνδυασμό με το μικρό χρόνο ανάλυσης (~6,5 λεπτά) καθιστούν τη μέθοδο κατάλληλη να εφαρμοστεί σε φαρμακευτικές αναλύσεις ρουτίνας.

## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Η αλισκιρένη είναι ένας από του στόματος δραστικός, ισχυρός και άμεσος αναστολέας της ρενίνης. Το υδροχλωροθειαζίδιο υπάγεται στην κατηγορία των θειαζιδικών διουρητικών. Ο συνδυασμός της αλισκιρένης με το υδροχλωροθειαζίδιο ενδείκνυται σε ασθενείς των οποίων η αρτηριακή πίεση δεν ρυθμίζεται επαρκώς με μόνο αλισκιρένη ή μόνο το υδροχλωροθειαζίδιο. Στην παρούσα διατριβή ειδικεύσης αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μια αναλυτική μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της αλισκιρένης και του υδροχλωροθειαζιδίου, με την μέθοδο υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, σε δισκία Rasilez HCT® της εταιρείας Novartis. Για την εκτέλεση της χρωματογραφικής ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφική στήλη phenyl με διάμετρο πόρων 5 μm (150 x 2,1 mm) και κινητή φάση ACN/CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> 30 mM, 40:60 (v/v) με ταχύτητα ροής 0,40 mL min<sup>-1</sup>. Ο ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) ρυθμίστηκε σε μήκος κύματος ανίχνευσης 280nm. Οι χρόνοι κατακράτησης της αλισκιρένης, του υδροχλωροθειαζιδίου και της βρωμαζεπάμης (το εσωτερικό πρότυπο που επιλέχθηκε) είναι 5,155, 1,723 και 2,473 λεπτά αντίστοιχα. Το όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης βρέθηκε ότι είναι 0,28 ± 0,16 μg mL<sup>-1</sup> και 0,84 ± 0,48 μg mL<sup>-1</sup>, για την αλισκιρένη και 0,0133 ± 0,0011 μg mL<sup>-1</sup> και 0,0404 ± 0,0031 μg mL<sup>-1</sup>, για το υδροχλωροθειαζίδιο, αντίστοιχα. Η μέθοδος αξιολογήθηκε ως προς τα κύρια γνωρίσματα ποιότητας και βρέθηκε πως είναι ακριβής, ειδική, επαναλήψιμη, εκλεκτική και αποτελεί γρήγορη και εύκολη μέθοδο προσδιορισμού με χρόνο ένεσης 6,5 λεπτά. Έγιναν μελέτες σταθερότητας και η μέθοδος κρίθηκε επιτυχής και ως προς αυτό το κομμάτι της αξιολόγησης.

## **SUMMARY**

Aliskiren is an orally active, potent and selective direct inhibitor of renin. Hydrochlorothiazide belongs to the class of thiazide diuretics. The combination of aliskiren and hydrochlorothiazide is indicated in patients whose blood pressure is not adequately controlled with aliskiren alone or hydrochlorothiazide alone. In this thesis specialization was developed and validated an analytical method for quantification of aliskiren and hydrochlorothiazide by liquid chromatography high performance tablets Rasilez HCT ® company Novartis. The performance of chromatographic analysis was used chromatographic column with phenyl porosity of 5 microns (150 x 2,1 mm) and mobile phase ACN/CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> 30 mM, 40:60 (v / v) with a flow rate of 0,40 mL min<sup>-1</sup>. Detector UV-visible (UV-Vis) adjusted to detection wavelength 280nm. The retention times of aliskiren, of hydrochlorothiazide and bromazepam (the internal standard was selected) is 5.155, 1.723 and 2.473 minutes respectively. . The limit of detection and quantification was found to be 0,28 ± 0,16 mg mL<sup>-1</sup> and 0,84 ± 0,48 mg mL<sup>-1</sup>, for aliskiren and 0.0133 ± 0,0011 mg mL<sup>-1</sup> and 0.0404 ± 0, 0031 mg mL<sup>-1</sup>, the hydrochlorothiazide, respectively. The method was evaluated for the main features and quality found to be accurate, specific, repeatable, selective and is quick and easy method to determine injection time 6.5 minutes. Stability studies were performed and the method was successful and in this part of the evaluation.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. R. P. Scott, K. K. Unger and U. Trudiger, High Performance Liquid Chromatography, New York, 1989.
2. J. H. Knox, J. N. Done, A. F. Fell, M. T. Gilbert, A. Pryde and R. A. Wall, High Performance Liquid Chromatography, University Press, Edinburg, 1978.
3. W. S. Hancock and J. T. Sparrow, HPLC of Biological Compounds, Marcel Dekker, New York, 1984.
4. D. R. Brown, High Pressure Liquid Chromatography, Biomedical and Biochemical Applications, Academic Press, New York, 1973.
5. J. N. Done, J. H. Knox and J. Loheac, Applications of High - Speed Liquid Chromatography, John Wiley and Sons, New York, 1974.
6. L. R. Snyder, Practical HPLC Method Development, Wiley, 1988.
7. P. J. Schoenmakers, Retention and Selectivity in Liquid Chromatography, Euro HPLC Course Patras, Greece, 1992.
8. P. Kucera, Microcolumn High Performance Liquid Chromatography, Ed. New York: Elsevier, 1984.
9. R. W. Scott, Liquid Chromatography for the Analyst, Marcel Dekker 1994.
10. M. T. Gilbert, High Performance Liquid Chromatography, Bristol, UK: Wright, 1987.
11. R. P. Brown and R. H. Hartwick, High Performance Liquid Chromatography, New York: Wiley, 1989.
12. D. L. Saunders, Chromatography 3rd ed., E. Heftman, Ed., New York: Van Nostrand Reinhold, 1975.
13. Giddings, J. C.: Dynamics of Chromatography, Part I, Principles and Theory, Marcel Dekker, New York, 1965.
14. Kirkland, J. J: J. Chromatography Science, 7, 7, 1969.
15. Huber, J. F. K: J. Chromatography Science, 7, 85, 1969.
16. Horvath, C. G. Preiss, B. A. and Lipsky, S. R., Anal. Chem. 39, 1422, 1967.
17. N. A. Parris, Instrumental Liquid Chromatography, 2nd ed. New York: Elsevier, 1984.
18. H. Engelhardt, Practice of High Performance Liquid Chromatography, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, Tokyo, 1986.
19. A. Katritzky and R. I. Offerman, Crit. Rev. Anal. Chem., 21 (4), 83, 1989.

20. Snyder, L. R.: In High Performance Liquid Chromatography, Advances and Perspectives, vol. 3, New York, 157, 1983.
21. Howard, G. A.: and Martin, A. J. P.: *Biochem. J.*, 56, 536, 1950.
22. R. E. Majors, *LC-GC*, 13(8), 202, 1995 and 12(12), 890, 1994.
23. R. P. W. Scott, *Small Bore Liquid Chromatography Columns, Their Properties and Uses*, Ed. New York: Willey, 1984.
24. M. Novotny, *Anal. Chem.*, 60, 500A, 1988.
25. R. P. Scott, *Liquid Chromatography Detectors*, 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 1986.
26. E. S. Yeung and R. E. Syvonec, *Anal. Chem.*, 58, 1237A, 1986.
27. C. A. Dorschel et al., *Anal. Chem.*, 61, 951A, 1989.
28. J. M. Miller, *Separation Methods in Chemical Analysis*, Wiley-Interscience, New York, 1975.
29. J. Dorsey, W. Cooper, J. Wheeler, H. Barth, J. Foley, Retention Mechanism of Bonded Phase Liquid Chromatography, *Analytical Chemistry*, 66, 857A, 1994.
30. I. E. Κουντουρέλλης, *Μαθήματα Φαρμακευτικής Ανάλυσης II*, 1997.
31. Pescok , Shields, Cairns, Mc William, *Modern Methods of Chemical Analysis*, 2nd ed., J. Wiley, New York, 1976.
32. L. R. Snyder and J. J. Kirkland, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, J. Wiley- Interscience, New York, 1974.
33. D. C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*, W. H. Freeman and Company, New York, 1991.
34. E. Francotte, Contribution of preparative chromatographic resolution to the investigation of chiral phenomena, *Journal of Chromatography*, 666, 561, 1994.
35. L. R. Snyder and J. J. Kirkland, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, Wiley, New York, 2nd ed, 1979.
36. Gonnet C., and Rocca, J. L., *J. Chromatography*, 120, 419, 1976.
37. Lindsay S., *High Performance Liquid Chromatography*, John Willey and Sons, New York, 1989.
38. Meyer, V. R.: *J. Chromatography*, 334, 197, 1985.
39. Schoemakers P. J.: *Optimization of Chromatographic Selectivity, A guide to methoddevelopment*, Elsevier, Amsterdam, 1986.

40. Colin H., Krstulovic, A. M., Lexcoffier J. And Guiochor G., A guide to the HPLC literature, John Willey and Sons, New York, 1973.
41. Knox J. H.: Theory of HPLC, Part I, with special reference to column design in practical HPLC, (Simpson C. F. ed) Heyden and Sons, London, 1976.
42. Μαρκοπούλου Αικατερίνη, -διδακτορική διατριβή, ΑΠΘ, 1992.
43. Snyder L. R., in Techniques of Chemistry, 2nd ed., Vol III, Part I, A. Weissberger and E. S. Perry, eds., Willey-Interscience, New York, 1978.
44. Metsch F. A., Angew. Chem., 65, 586, 1953.
45. Godfrey N. B., Chemtech, 360, 1972.
46. Abbott S. R., Berg J. R., Achener P., and Stephenson R. L., J. Chromatogr., 126, 421, 1976.
47. Forestier H. and Truffert L., Analysis, 3, 30, 1975.
48. Snyder L. R., J. W. Dolan, and J. R. Gant, *ibid.*, 165, 3, 1979.
49. Snyder L. R., J. Chromatogr., 92, 223, 1974.
50. Snyder L. R., J. Chromatogr. Scien., 16, 223, 1978.
51. Karger B. L., Gant J. R., Hartkopf A., and Wiener P. H., J. Chromatogr., 128, 65, 1976.
52. Gerbacia W. E. F., J. Chromatogr., 166, 261, 1978.
53. Rohrschneider L., Anal. Chem., 45, 1241, 1973.
54. Sampson R. L., Am. Lab., 109, 1977.
55. Snyder L. R., Principles of Adsorption Chromatography, Dekker, New York, Chapt. 8, 1976.
56. Snyder L. R., In Techniques of Chemistry, 2nd ed., Vol III, Part I, A. Weissberger and E. S. Perry, eds., Willey-Interscience, New York, Chapt. 2, 1978.
57. Tanaka N., Goodell H., Hiroshi Kimura and Karger B. L., *ibid.*, 158, 223, 1978.
58. Draper N., Smith H., Εφαρμοσμένη Ανάλυση Παλινδρόμησης, Εκδόσεις Παπαζήση, Αθήνα 1997.
59. Snyder L.R., Kirkland J.J., Glajch J.L., Practical HPLC Method Development 2d edition, New York, John Wiley, 402-438, 1997
60. Claessens H.A., van Straten M.A., Kirkland J.J., J. Chrom(A), 728, 259-270, 1996

61. Constanzo S.J., Optimization of mobile phase conditions for TLC methods used in pharmaceutical analyses, *J.Chromatographic Sci.*, 35 (4),156-160, 1997
62. Moffat F., Cooper P.A., Jessop K.M., *Anal.Chem.*, 71,1119-1124, 1999
63. Persson B.A., Vessman J., Mcdowall R.D., How good is your method? in *Question of Quality, LC/GC*, 15(10), 944-946, 1997
64. Marin A., Garcia E., Garcia A., Barbas C., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29,701-714, 2002
65. Snyder L.R., Kirkland J.J.,Glajch J.L, *Practical HPLC Method Development* 2d edition, New York, John Wiley, 233-291, 1997
66. Swartz M.E., Krull I.S., *Validation of Chromatographic methods*, *Pharm.Tech.*, 22 (3), 104-119, 1998
67. Wrasse-Sangoi M., Secretti L.T., Diefenbac I.F., Bueno Rolim C.M. and da Silva Sangoi M., *Quim. Nova*, 33(6), 1330-1334, 2010
68. Wrasse-Sangoi M., Sangoi M.S., Oliveira P.R., Secretti L.T., and Rolim C.M.B. *J. Chromatogr. Sci.*, 49, 170-175, 2011
69. Shalini Pachauri. A development and validation of HPLC Method for analysis of some antihypertensive agents in their pharmaceutical dosage forms. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2010, 2(8):459-464.