



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

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΗ
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ
ΣΑΚΧΑΡΟΥΧΟΥ ΣΙΔΗΡΟΥ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ – ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ**

**ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΜΑΡΓΑΡΙΤΗΣ
ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ**

ΑΘΗΝΑ 2017

Στην οικογένεια μου

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Μιχαήλ Κουππάρης
Ειρήνη Παντερή
Ιωάννης Ντότσικας

Καθηγητής ΕΚΠΑ (Επιβλέπων)
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ
Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης «Φαρμακευτική Ανάλυση – Έλεγχος Ποιότητας» του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, κατά τη διάρκεια του έτους 2016, στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας.

Αντικείμενο της εργασίας αυτής αποτέλεσε η ανάπτυξη και η επικύρωση αναλυτικής μεθόδου για τη μελέτη της κινητικής αποικοδόμησης συμπλόκων σε σκευάσματα σακχαρούχου σιδήρου, με σκοπό να χρησιμοποιηθεί ως κριτήριο ελέγχου ποιότητας και σύγκρισης μεταξύ σκευασμάτων. Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους που συνέβαλαν καθοριστικά στην υλοποίηση της εργασίας αυτής.

Αρχικά, ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, τον Καθηγητή κ. Μιχαήλ Κουππάρη, για το συνεχές ενδιαφέρον του και τις πολύτιμες συμβουλές του αλλά κυρίως για τη δυνατότητα που μου έδωσε να γνωρίσω ουσιαστικότερα και πέραν από τα πλαίσια της παρούσας μελέτης τα πολύ ενδιαφέροντα αντικείμενα της αναλυτικής χημείας και της φαρμακευτικής ανάλυσης.

Ακόμη, θέλω να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Ειρήνη Παντερή και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ιωάννη Ντότσικα για τις υποδείξεις και τις διορθώσεις τους.

Θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον διδάκτορα κ. Κωνσταντίνο Κουσουλό, για την καθοδήγηση, την αμεσότητά του και τη συνεχή βοήθεια του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας αυτής.

Επίσης, ευχαριστώ όλους τους συναδέλφους μου στο εργαστήριο για την άψογη συνεργασία μας και τη βοήθειά τους.

Τέλος, θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια μου για την συμπαράσταση και την υποστήριξη που μου παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Γεώργιος Μαργαρίτης

Αθήνα, Μάρτιος 2017

Πίνακας Περιεχομένων

Μέρος Α: Θεωρητικό Μέρος.....	1
Κεφάλαιο Α.1. Σακχαρούχος σίδηρος.....	2
A.1.1. Ιστορική αναδρομή	2
A.1.2. Χημική δομή και φυσικοχημικές ιδιότητες του σακχαρούχου σιδήρου ..	3
A.1.3. Φαρμακολογικές ιδιότητες και θεραπευτική χρήση του σακχαρούχου σιδήρου	4
A.1.4. Φαρμακοδυναμική και φαρμακοκινητική του σακχαρούχου σιδήρου	7
A.1.5. Σχετικά με τη βιοομοιότητα των σκευασμάτων σακχαρούχου σιδήρου	10
Κεφάλαιο Α.2. Χημική κινητική	13
A.2.1. Εισαγωγή.....	13
A.2.2. Αρχικός ρυθμός ταχύτητας της αντίδρασης	15
A.2.3. Ψευδο-νιοστής-τάξης κινητική.....	16
A.2.4. Ενέργεια ενεργοποίησης και κινητικές θεωρίες.....	17
Κεφάλαιο Α.3. Πειραματικός σχεδιασμός	21
A.3.1. Εισαγωγή.....	21
A.3.2. Σύγκριση του πειραματικού σχεδιασμού με τις παραδοσιακές τεχνικές πειραματισμού – Πλεονεκτήματα του πειραματικού σχεδιασμού	22
A.3.3. Η διαδικασία του πειραματισμού – Τα επτά βήματα του πειραματικού σχεδιασμού	23
A.3.4. Βασικοί ορισμοί – Τα κυριότερα είδη πειραματικού σχεδιασμού.....	25
A.3.5. Παραγοντικοί σχεδιασμοί.....	27
Μέρος Β: Πειραματικό Μέρος.....	32
Κεφάλαιο Β.1. Ανάπτυξη της αναλυτικής μεθόδου	33
B.1.1. Σκοπός της μελέτης	33
B.1.2. Ανάπτυξη της μεθόδου – Οι κυριότερες δοκιμές.....	34
B.1.3. Πειραματική διαδικασία – Υπολογισμοί.....	35
B.1.4. Έλεγχος ισοδυναμίας	39
B.1.5. Στοιχεία πρωτοτυπίας της αναλυτικής μεθόδου.....	42
B.1.6. Διερεύνηση της διεργασίας – Ερμηνεία της χημικής αντίδρασης	43

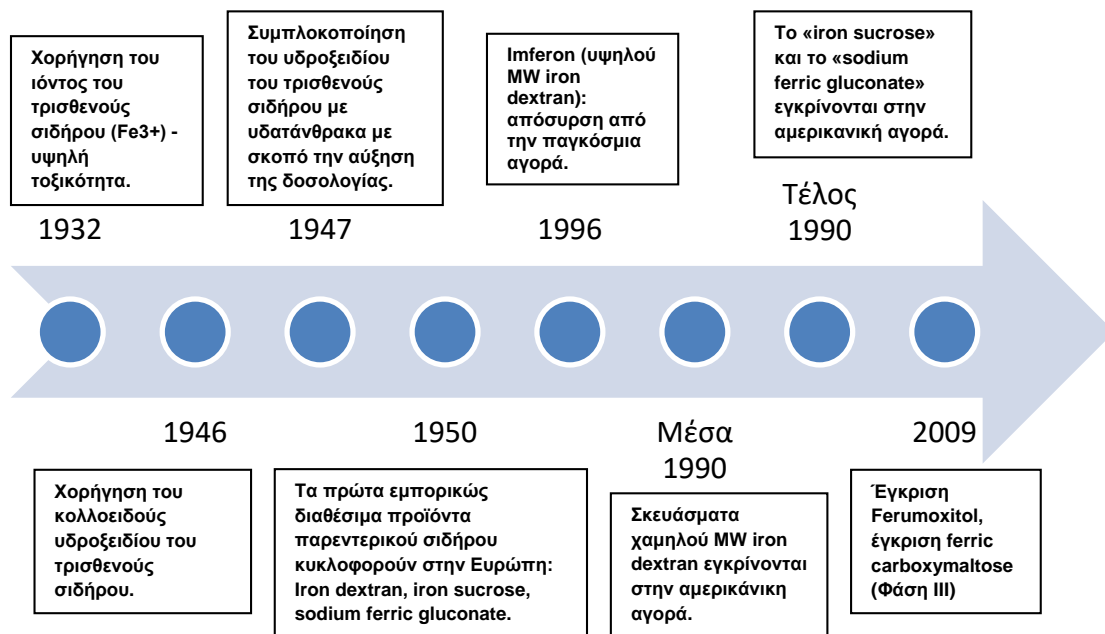
Κεφάλαιο Β.2. Μελέτη της επίδρασης των πειραματικών συνθηκών με τη χρήση τεχνικών πειραματικού σχεδιασμού	50
B.2.1. Γενικά – Διεξαγωγή των πειραμάτων.....	50
B.2.2. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων του πειραματικού σχεδιασμού	52
B.2.3. Θεωρητική ερμηνεία των αποτελεσμάτων του πειραματικού σχεδιασμού – Συμπεράσματα για την ανθεκτικότητα της μεθόδου	59
Κεφάλαιο Β.3. Επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου.....	61
B.3.1. Διαδικασίες επικύρωσης της μεθόδου	61
B.3.2. Δεδομένα για την επικύρωση της μεθόδου	65
B.3.3. Σύνοψη της επικύρωσης της μεθόδου	77
B.3.4.Επίλογος – Γενικά συμπεράσματα	79
Περίληψη	80
Summary	83
Βιβλιογραφία.....	86
Παράρτημα	90

ΜΕΡΟΣ Α: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο Α.1. Σακχαρούχος σίδηρος

Α.1.1. Ιστορική αναδρομή ^{1,2}

Ιστορικά, η παρεντερική χορήγηση του τρισθενούς σιδήρου στην ελεύθερη του μορφή (μη συμπλοκοποιημένος) αποδείχθηκε επισφαλής για την ανθρώπινη υγεία. Η μεγάλη τοξικότητα των ελεύθερων ιόντων Fe^{+3} οδήγησε στον περιορισμό της δοσολογίας στα 8 mg ημερησίως, που αντιστοιχεί περίπου στη συνολική ικανότητα δέσμευσης σιδήρου από την τρανσφερρίνη που βρίσκεται στο πλάσμα. Σκευάσματα που περιείχαν σίδηρο με την κολλοειδή μορφή του υδροξειδίου του σιδήρου επέτρεψαν μεγαλύτερες δοσολογίες, αλλά ωστόσο οι συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες και κυρίως οι σοβαρές υποτασικές κρίσεις απέτρεπαν τη συχνή θεραπευτική τους χρήση. Η συμπλοκοποίηση του υδροξειδίου του σιδήρου με υδατάνθρακες αποτέλεσε σημαντική βελτίωση της ασφαλούς χορήγησης και τη μείωση της τοξικότητας του παρεντερικώς χορηγούμενου σιδήρου. Το γεγονός αυτό επέτρεψε την αύξηση της δοσολογίας με τη χρήση σκευασμάτων υδροξειδίου του τρισθενούς σιδήρου συμπλοκοποιημένου με σάκχαρα. Σήμερα, οι παρεντερικοί παράγοντες σιδήρου είναι κολλοειδή σύμπλοκα μόρια που αποτελούνται από πυρήνες υδροξειδίου του σιδήρου και περιβάλλονται από ένα υδατανθρακικό κάλυμμα. Τα σύμπλοκα αυτά μόρια διαφέρουν στη δομή των υδατανθράκων, αλλά και στο μέγεθος του πυρήνα του σιδήρου.



Εικόνα 1: Οι κυριότεροι ιστορικοί σταθμοί στην εξέλιξη των φαρμάκων παρεντερικού σιδήρου. ²

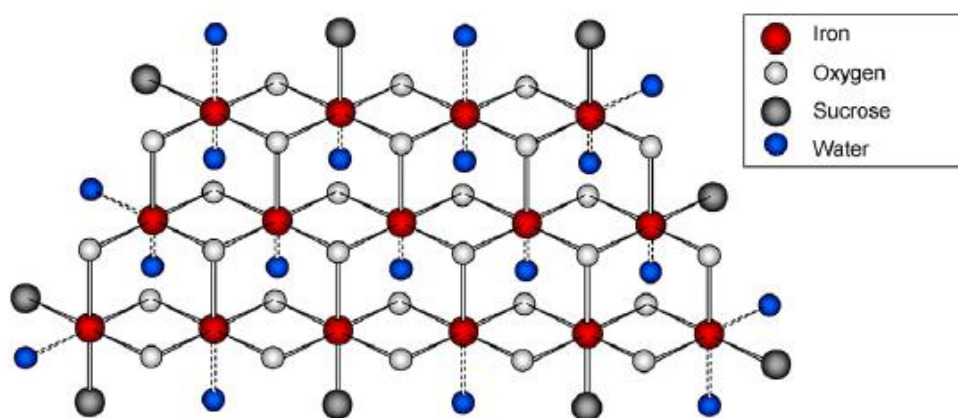
A.1.2. Χημική δομή και φυσικοχημικές ιδιότητες του σακχαρούχου σιδήρου³⁻⁵

Ο σακχαρούχος σίδηρος (iron sucrose) αποτελεί ένα σύμπλοκο μόριο υδροξειδίου του τρισθενούς σιδήρου με σακχαρόζη με προτεινόμενο μοριακό τύπο $[\text{Na}_2\text{Fe}_5\text{O}_8(\text{OH})\cdot 3\text{H}_2\text{O}]_n \cdot x(\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11})$. Το τελικό φαρμακευτικό προϊόν περιέχει 20 mg/ml στοιχειακού σιδήρου και 300 mg/ml σακχαρόζης και είναι ένα αλκαλικό υδατικό διάλυμα με βαθύ καφέ χρώμα. Το pH του διαλύματος κυμαίνεται από 10,5 έως 11,0 και το μέγεθος των συμπλόκων μορίων κυμαίνεται από 34.000 έως 60.000 daltons, με μέσο μοριακό βάρος 43.000 daltons. Δομικά τα σύμπλοκα αυτά μόρια αποτελούν σφαιροειδή νανοσωματίδια με τον πυρήνα του υδροξειδίου του σιδήρου να περιβάλλεται από το υδατανθρακικό κάλυμμα που λειτουργεί σταθεροποιητικά και επιβραδύνει την αποδέσμευση του σιδήρου στην κυκλοφορία του αίματος.

Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και η ακριβής χημική δομή του σακχαρούχου σιδήρου εξαρτώνται άμεσα από την παραγωγική διεργασία, η οποία πρέπει να είναι σαφώς ορισμένη, ώστε να εξασφαλίζεται η ομοιογένεια και αναπαραγωγιμότητα του παραγόμενου προϊόντος. Συνοπτικά η σύνθεση του σακχαρούχου σιδήρου αποτελείται από τα ακόλουθα στάδια. Αρχικά, οι πυρήνες του υδροξειδίου του τρισθενούς σιδήρου σχηματίζονται με τη διάλυση ενός κατάλληλου άλατος (συνήθως τριχλωριούχου σιδήρου) σε ένα υδατικό μέσο σε χαμηλό pH (συνήθως με την επίδραση υδροχλωρικού οξέος) και ακολουθεί εξουδετέρωση ή αλκαλοποίηση με υδροξείδιο του νατρίου. Στην περίπτωση του σακχαρούχου σιδήρου, η αλκαλοποίηση είναι καταλληλότερη από την απλή εξουδετέρωση λόγω του ότι η συμπλοκοποίηση με τη σακχαρόζη είναι αρκετά ασθενής σε ουδέτερο pH. Κατόπιν, τα ιόντα του τρισθενούς σιδήρου αρχικά σχηματίζουν τα μονοπυρηνικά υδροξείδια του σιδήρου. Ο σχηματισμός του $\text{Fe}(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})_3$ οδηγεί στη δημιουργία πολυπυρηνικών μορίων υδροξειδίου του σιδήρου (περιέχουν πολλαπλά συνδεδεμένα άτομα σιδήρου) με σχετική δομή $-\text{FeOOH}-$. Τα μόρια αυτά που είναι αδιάλυτα στο ύδωρ, σταθεροποιούνται με την παρουσία ενός υδατοδιαλυτού συμπλοκοποιητικού παράγοντα, της σακχαρόζης.

Η φαρμακοτεχνική μορφή του σακχαρούχου σιδήρου δεν είναι ένα πραγματικό διάλυμα, αλλά κυρίως μια κολλοειδής μορφή. Το μέγεθος των σωματιδίων είναι μικρότερο από 10 nm, ενώ το μοριακό βάρος των συμπλόκων είναι η πιο καθοριστική φυσικοχημική ιδιότητα για τη μελέτη της σταθερότητας των συμπλόκων και της φαρμακοτεχνικής μορφής. Τα σκευάσματα σακχαρούχου σιδήρου εμφανίζουν σημαντική σταθερότητα στους 30 και τους 40 °C τουλάχιστον για ένα μήνα, χωρίς σημαντική αλλαγή στην χημική τους δομή. Σε υψηλότερες ωστόσο θερμοκρασίες 70 - 90 °C η δομή των συμπλόκων μορίων αλλάζει, καθώς σχηματίζονται συσσωματώματα (aggregates) και στο αυτόκαυστο στους 121 °C παρατηρείται ο σχηματισμός συσσωματωμάτων σε μόλις 30 min.

Το μοριακό βάρος των συμπλόκων δεν φαίνεται να τροποποιείται με την παρουσία ηλεκτρολυτών και η ιοντική ισχύς δεν αποτελεί σημαντικό παράγοντα για τη σταθερότητα του σακχαρούχου σιδήρου. Τέλος, το pH του διαλύματος αποτελεί ιδιαίτερα κρίσιμο παράγοντα για τη σταθερότητα της φαρμακοτεχνικής μορφής, καθώς το σύμπλοκο αποσταθεροποιείται όταν το pH γίνεται όξινο και σε pH κοντά στο 1 το σύμπλοκο αποδιατάσσεται. Η αλλαγή αυτή είναι αναστρέψιμη και εάν το pH ρυθμιστεί ξανά περίπου στο 10,5, το σύμπλοκο ανασχηματίζεται με περίπου ίδιο μοριακό βάρος.



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της προτεινόμενης δομής του σακχαρούχου σιδήρου. ³

A.1.3. Φαρμακολογικές ιδιότητες και θεραπευτική χρήση του σακχαρούχου σιδήρου ⁵⁻⁹

Γενικά

Ο σακχαρούχος σίδηρος χρησιμοποιείται για πάνω από πενήντα χρόνια στην κλινική πρακτική στην Ευρώπη. Το πρωτότυπο σκεύασμα σακχαρούχου σιδήρου με το όνομα Venofer[®], αναπτύχθηκε και κυκλοφορεί στην ευρωπαϊκή αγορά από την εταιρεία Vifor France SA και στην αμερικανική αγορά από την εταιρεία Luitpold Pharmaceuticals Inc.

Το Venofer[®] έχει ονομαστική περιεκτικότητα σε σίδηρο 20 mg/ml. Το σκεύασμα αυτό περιέχει τα ακόλουθα συστατικά: το σύμπλοκο του υδροξειδίου του τρισθενούς σιδήρου με σακχαρόζη ως δραστικό συστατικό, ύδωρ για ενέσιμα ως αραιωτικό έκδοχο και υδροξείδιο του νατρίου ως έκδοχο για τη ρύθμιση του pH. Η φαρμακοτεχνική μορφή του σκευάσματος είναι φύσιγγες των 2,5 ml και των 5 ml που περιέχουν ενέσιμο διάλυμα ή πυκνό διάλυμα για την παρασκευή διαλύματος για ενδοφλέβια έγχυση. Ο σακχαρούχος σίδηρος χορηγείται

ενδοφλεβίως (είτε με βραδεία ένεση, είτε με ενδοφλέβια στάγδην έγχυση) και δεν πρέπει να χορηγείται ενδομυϊκά.

Θεραπευτικές ενδείξεις

Η χρήση του σακχαρούχου σιδήρου ενδείκνυται:

1. Όταν είναι κλινικά αναγκαία η ταχεία προσφορά σιδήρου στις αποθήκες σιδήρου.
2. Σε ασθενείς με δυσανεξία στην από του στόματος χορηγούμενη σιδηροθεραπεία ή μη συμμορφούμενους με αυτήν.
3. Σε ενεργό φλεγμονώδη νόσο του εντέρου, όπου τα χορηγούμενα από του στόματος σκευάσματα σιδήρου είναι αναποτελεσματικά.

Η ανεπάρκεια σιδήρου πρέπει να τεκμηριώνεται από κατάλληλες εργαστηριακές εξετάσεις.

Δοσολογία και προφυλάξεις κατά τη χρήση

Η κατάλληλη δοσολογία του σακχαρούχου σιδήρου πρέπει να υπολογίζεται εξατομικευμένα για κάθε ασθενή και πρέπει η συνολική χορηγούμενη ποσότητα να ισούται με το ολικό έλλειμμα σιδήρου, όπως αυτό υπολογίζεται από την εξίσωση Ganzoni:

Ολικό έλλειμμα σιδήρου (mg) = Σωματικό βάρος (kg) × (Επιθυμητή Hb – Υπάρχουσα Hb) (g/dl) × 2,4 + Εφεδρείες σιδήρου (mg)

Εάν το σωματικό βάρος είναι λιγότερο από 35 kg, τα επιθυμητά επίπεδα αιμοσφαιρίνης είναι 13 g/dl και οι εφεδρείες σιδήρου 15 mg/kg. Εάν το σωματικό βάρος είναι μεγαλύτερο από 35 kg, τα επιθυμητά επίπεδα αιμοσφαιρίνης είναι 15 g/dl και οι εφεδρείες σιδήρου είναι 500 mg.

Ο σακχαρούχος σίδηρος πρέπει να χορηγείται από εκπαιδευμένο προσωπικό στη διαχείριση αναφυλακτικών αντιδράσεων σε κατάλληλο χώρο με πλήρη εξοπλισμό ανάνηψης. Ο ασθενής θα πρέπει να παρακολουθείται τουλάχιστον για μισή ώρα.

Αντενδείξεις

Η χρήση σακχαρούχου σιδήρου αντενδείκνυται στις περιπτώσεις ανθρώπων που εμφανίζουν υπερευαισθησία, είτε στο δραστικό συστατικό, είτε σε άλλα παρεντερικά σκευάσματα σιδήρου. Επίσης η χορήγηση σακχαρούχου σιδήρου αντενδείκνυται σε αναιμίες μη οφειλόμενες στην έλλειψη σιδήρου, καθώς και όταν υπάρχει υπερφόρτωση με σίδηρο ή διαταραχές στη χρήση σιδήρου.

Αλληλεπιδράσεις

Όπως συμβαίνει και με τα υπόλοιπα παρεντερικά σκευάσματα σιδήρου, ο σακχαρούχος σίδηρος δεν πρέπει χορηγείται συγχρόνως με από του στόματος σκευάσματα σιδήρου, με δεδομένο ότι η απορρόφηση του σιδήρου που χορηγείται από του στόματος μειώνεται. Δεν πρέπει να χορηγείται σκεύασμα σιδήρου για διάστημα 5 ημερών από την τελευταία χορήγηση σακχαρούχου σιδήρου.

Ανεπιθύμητες ενέργειες

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες του σακχαρούχου σιδήρου έχουν μελετηθεί και καταγραφεί επαρκώς, τόσο από τις κλινικές μελέτες σε 4.046 εθελοντές, όσο και από την παρακολούθηση της αγοράς μετά την κυκλοφορία του προϊόντος. Η συχνότερα εμφανιζόμενη ανεπιθύμητη ενέργεια είναι η παροδική αλλαγή της γεύσης (dysgeusia) με συχνότητα εμφάνισης περίπου 4,5 % των ασθενών. Ακολουθούν σε συχνότητα εμφάνισης η υπόταση, η υπέρταση, η ναυτία, καθώς και οι αντιδράσεις στο σημείο της ένεσης με συχνότητα εμφάνισης μεγαλύτερης του 1 %. Η σοβαρότερη ανεπιθύμητη ενέργεια είναι οι αντιδράσεις υπερευαισθησίας (hypersensitivity reactions) και υπολογίζεται ότι η συχνότητα εμφάνισης είναι 0,25%.

Υπερδοσολογία

Η υπερδοσολογία σακχαρούχου σιδήρου προκαλεί οξεία υπερφόρτωση σιδήρου, η οποία μπορεί να εκδηλωθεί ως αιμοσιδήρωση. Η υπερδοσολογία αντιμετωπίζεται με ένα σιδηροδεσμευτικό χηλικό παράγοντα ως ειδικό αντίδοτο ή σύμφωνα με την καθιερωμένη ιατρική πρακτική.

Ειδικές περιπτώσεις: Κύηση, γαλουχία, παιδιά

Δεν υπάρχει επαρκής τεκμηρίωση για την ασφάλεια του σακχαρούχου σιδήρου κατά την κύηση. Η ανεπάρκεια σιδήρου κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης πρέπει να αντιμετωπίζεται με από του στόματος χορηγούμενα σκευάσματα σιδήρου. Κατά το δεύτερο και τρίτο τρίμηνο της κύησης μπορεί να γίνει χορήγηση του σακχαρούχου σιδήρου εφόσον το όφελος υπερτερεί του δυνητικού κινδύνου για τη μητέρα και το έμβρυο.

Η χρήση του σακχαρούχου σιδήρου κατά γαλουχία θεωρείται ασφαλής, καθώς δεν θεωρείται πιθανόν να διέρχεται το μη μεταβολισμένο δραστικό συστατικό στο μητρικό γάλα.

Η χρήση σακχαρούχου σιδήρου δεν συνίσταται στα παιδιά, καθώς δεν έχει μελετηθεί επαρκώς.

A.1.4. Φαρμακοδυναμική και φαρμακοκινητική του σακχαρούχου σιδήρου^{1,6,7,10}

Μηχανισμός Δράσης

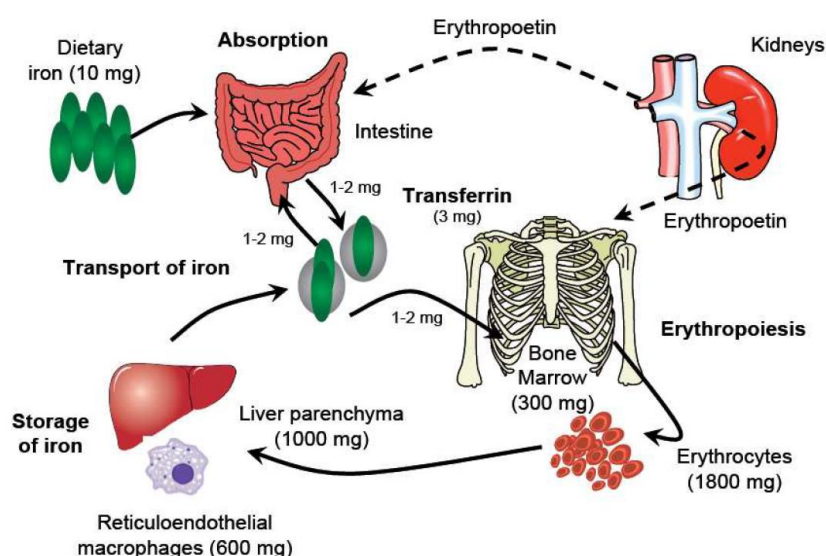
Το δραστικό συστατικό του σακχαρούχου σιδήρου αποτελείται από πυρήνες υδροξειδίου του τρισθενούς σιδήρου και περιβάλλεται από ένα υδατανθρακικό κάλυμμα με το οποίο δεν σχηματίζει ομοιοπολικούς δεσμούς. Η δομή αυτή είναι παραπλήσια με τους πυρήνες που διαθέτει η κύρια φυσιολογική αποθηκευτική πρωτεΐνη, η φερριτίνη. Τα σύμπλοκα αυτά μόρια έχουν τέτοια δομή ώστε να μπορούν να αποδεσμεύσουν με ελεγχόμενο τρόπο σίδηρο για τις μεταφορικές και αποθηκευτικές πρωτεΐνες σιδήρου στον άνθρωπο, δηλαδή για την τρανσφερρίνη και την φερριτίνη, αντίστοιχα. Μετά την ενδοφλέβια χορήγηση, οι πυρήνες του σιδήρου αποσπώνται από το σύμπλοκο κυρίως στο ενδοθηλιακό δίκτυο των κυττάρων του ήπατος, του σπλήνα και του μυελού των οστών. Σε δεύτερο χρόνο, ο σίδηρος χρησιμοποιείται για τη σύνθεση αιμοσφαιρίνης, μυοσφαιρίνης και άλλων πρωτεϊνών που περιέχουν σίδηρο, ενώ η μεγαλύτερη ποσότητα σιδήρου αποθηκεύεται στο ήπαρ με τη μορφή της φερριτίνης.

Ο φυσιολογικός ρόλος του σιδήρου

Το στοιχείο του σιδήρου είναι απαραίτητο για κάθε κύτταρο του ανθρώπινου οργανισμού. Ο κυριότερος φυσιολογικός ρόλος του σιδήρου είναι η μεταφορά του οξυγόνου μέσω της αιμοσφαιρίνης, αλλά και η αποθήκευση του οξυγόνου κυρίως μέσω της μυοσφαιρίνης. Το στοιχείο του σιδήρου ωστόσο συμμετέχει και σε αρκετά ένζυμα ως φορέας ηλεκτρονίων και δρα καταλυτικά σε αντιδράσεις, όπως η υδροξυλίωση. Χωρίς επαρκή παροχή σιδήρου, η σύνθεση της αιμοσφαιρίνης αναστέλλεται και ο αριθμός των ερυθροκυττάρων μειώνεται κάτω από τα φυσιολογικά επίπεδα. Ο σίδηρος στον ανθρώπινο οργανισμό βρίσκεται με την μορφή του δισθενούς Fe(II) και του τρισθενούς Fe(III) ιόντος. Ο δισθενής σίδηρος δεν συναντάται συχνά με την ελεύθερη μορφή του στον οργανισμό, καθώς προκαλεί οξειδωτικό στρες καταστρέφοντας κυτταρικά συστατικά. Στον ανθρώπινο οργανισμό ωστόσο ο δισθενής σίδηρος οξειδώνεται σε τρισθενή, ο οποίος σε ουδέτερο περιβάλλον σχηματίζει αδιάλυτα υδροξείδια του τρισθενούς σιδήρου και μετά αποθηκεύεται και μεταφέρεται με πρωτεΐνες.

Η αποθήκευση και η μεταφορά σιδήρου γίνονται δια μέσω της τρανσφερρίνης, του υποδοχέα της τρανσφερρίνης και της φερριτίνης. Η τρανσφερρίνη μεταφέρει το σίδηρο στο πλάσμα και στο εξωκυτταρικό υγρό. Ο υποδοχέας της τρανσφερρίνης βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες των κυττάρων που απαιτούν σίδηρο και εισάγει σίδηρο στο εσωτερικό του κυττάρου. Η φερριτίνη είναι η κύρια αποθηκευτική πρωτεΐνη που διατηρεί το σίδηρο σε μία άμεσα διαθέσιμη μορφή. Στον ανθρώπινο οργανισμό περίπου το 60 % του σιδήρου

βρίσκεται στα ερυθροκύτταρα συνδεδεμένο με την αιμοσφαιρίνη, το υπόλοιπο ποσοστό στη μυοσφαιρίνη στο μυϊκό σύστημα και σε διάφορα ένζυμα (που μπορεί να περιέχουν ή μη ομάδα αίμης). Μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό σιδήρου υπάρχει ελεύθερο στον ορό του αίματος που είναι μικρότερο από 0,2 %. Υπάρχει ωστόσο μια δυναμική σχέση μεταξύ των φυσιολογικών διαμερισμάτων του σώματος στα οποία υπάρχει αποθηκευμένος σίδηρος. Όσον αφορά τα κυριότερα όργανα του ανθρώπου που συμμετέχουν στην κατανομή του σιδήρου, είναι το ήπαρ και ο σπλήνας που αποδομούν τα ερυθροκύτταρα και ο μυελός των οστών στον οποίον παράγονται τα ερυθροκύτταρα. Ακολουθεί η εικόνα 3, όπου υπάρχει σχηματική αναπαράσταση της κατανομής του σιδήρου στα οργανικά συστήματα του ανθρώπινου οργανισμού.



Εικόνα 3: Η κατανομή του σιδήρου στα διάφορα οργανικά συστήματα του ανθρώπου. ¹⁰

Φαρμακοκινητική των παρεντερικών σκευασμάτων σιδήρου

Μετά από την ενδοφλέβια χορήγηση, ο σακχαρούχος σίδηρος αναμειγνύεται με το πλάσμα και εισέρχεται στα μακροφάγα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος (reticular endothelial system – RES) απευθείας από το ενδοαγγειακό υγρό διαμέρισμα.

Τα φαγοκύτταρα που βρίσκονται στο ήπαρ, στον σπλήνα και στον μυελό των οστών απομακρύνουν με ενδοκύτωση το συμπλοκοποιημένο σίδηρο από την κυκλοφορία του αίματος. Εντός των φαγοκυττάρων, ο σίδηρος αποδεσμεύεται από το υδατανθρακικό του περίβλημα με την επίδραση του όξινου και αναγωγικού περιβάλλοντος των λυσοσωμάτων. Κατόπιν, ο δισθενής σίδηρος Fe(II), μεταφέρεται με τον δισθενή μεταλλικό μεταφορέα 1 (DMT1) και αποθηκεύεται σε μια χαμηλού μοριακού βάρους δεξαμενή σιδήρου. Ο σίδηρος

μπορεί να μεταφερθεί στη συνέχεια και να ενσωματωθεί στη φερριτίνη ενδοκυτταρικά ή να εξαχθεί από το κύτταρο με τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη φερροπορτίνη (με τη μορφή του δισθενούς σιδήρου). Ο σίδηρος αφού εξαχθεί από το κύτταρο οξειδώνεται από την πρωτεΐνη σερούλοπλασμίνη στην τρισθενή του μορφή Fe(III) και δεσμεύεται εξωκυτταρικά από την κύρια μεταφορική πρωτεΐνη σιδήρου, τη τρανσφερρίνη. Η τρανσφερρίνη μεταφέρει το σίδηρο στους αντίστοιχους μεμβρανικούς υποδοχείς τρανσφερρίνης των πρόδρομων ερυθροκυττάρων, με αποτέλεσμα την εισαγωγή του σιδήρου στο εσωτερικό των κυττάρων. Τα πρόδρομα ερυθροκύτταρα χρησιμοποιούν αυτά τα αποθέματα σιδήρου για τη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης και σταδιακά εξελίσσονται σε ώριμα ερυθροκύτταρα.

Ιδιαίτερα κρίσιμος παράγοντας για τη φαρμακοκινητική των παρεντερικών σκευασμάτων σιδήρου είναι η θερμοδυναμική και κινητική σταθερότητα των συμπλόκων αυτών (δηλαδή πόση ενέργεια απαιτείται για την αποδέσμευση του σιδήρου από το σύμπλοκο και με ποια ταχύτητα πραγματοποιείται αυτή η διαδικασία). Σε γενικές γραμμές παρατηρείται ότι η σταθερότητα των συμπλόκων αυτών είναι μεγαλύτερη, καθώς μεγαλώνει το μοριακό τους βάρος. Ο σακχαρούχος σίδηρος θεωρείται σύμπλοκο μέσης σταθερότητας.

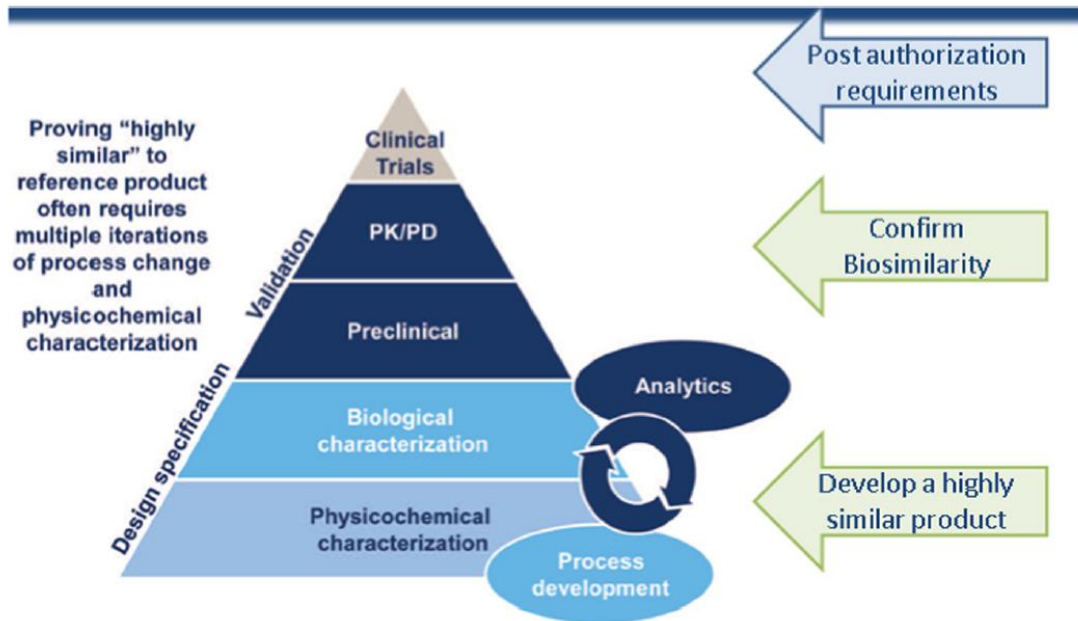
Η ενδοκύτωση των συμπλόκων μορίων από τα φαγοκύτταρα στο ενδοθυλιακό δίκτυο (RES) ακολουθεί πολύπλοκη κινητική. Εικάζεται ότι αρχικά τα φαγοκύτταρα προσλαμβάνουν τον συμπλοκοποιημένο σίδηρο ακολουθώντας πρωτοταξική κινητική, όταν οι δόσεις είναι μικρές, ενώ σε μεγαλύτερες δόσεις η κινητική φαίνεται να είναι μηδενοταξική, που υποδηλώνει ότι ο μηχανισμός αυτός εμφανίζει φαινόμενο κορεσμού. Η απευθείας ενσωμάτωση σιδήρου στην τρανσφερρίνη θεωρείται αμελητέα. Θεωρείται ότι τα σύμπλοκα μόρια που εμφανίζουν μεγαλύτερο μοριακό βάρος απομακρύνονται βραδύτερα από το πλάσμα και εμφανίζουν μεγαλύτερους χρόνους ημίσειας ζωής. Εάν και ο αρχικός ρυθμός μεταφοράς του σιδήρου εντός των φαγοκυττάρων εξαρτάται κυρίως από το μοριακό βάρος των συμπλόκων μορίων, η μεταφορά του σιδήρου από το ενδοθυλιακό δίκτυο προς τα ερυθροκύτταρα εξαρτάται από τη σοβαρότητα της ανεπάρκειας σιδήρου, το ρυθμό της ερυθροποίησης και άλλους παράγοντες που μπορεί να σχετίζονται με τη νόσο του ασθενούς. Κατά συνέπεια όταν η ανεπάρκεια σιδήρου είναι σοβαρή, η μεταφορά από το ενδοθυλιακό δίκτυο προς τα ερυθροκύτταρα γίνεται με σχετικά γρήγορο ρυθμό και ολοκληρώνεται σε διάστημα από δύο έως τέσσερις εβδομάδες, ενώ όταν δεν υπάρχει ένδειξη ανεπάρκειας σιδήρου η μεταφορά συντελείται ελάχιστα ή και καθόλου.

A.1.5. Σχετικά με τη βιοομοιότητα των σκευασμάτων σακχαρούχου σιδήρου ^{11,12}

Για την περίπτωση δραστικών συστατικών με σχετικά μικρό μοριακό βάρος έχει αναπτυχθεί ένα καλά θεμελιωμένο ρυθμιστικό πλαίσιο σχετικά με το θέμα της θεραπευτικής ισοδυναμίας και την απόδειξη της βιοϊσοδυναμίας μεταξύ του πρωτοτύπου και του γενοσήμου φαρμάκου. Οι κανονιστικές αρχές (EMA, FDA και WHO) έχουν εκδώσει σχετικές οδηγίες για την απόδειξη της βιοϊσοδυναμίας των φαρμάκων και τη διασφάλιση της ισοδυναμίας σε όρους ποιότητας, αποτελεσματικότητας και ασφάλειας μεταξύ πρωτοτύπων και γενοσήμων φαρμάκων. Η καθιερωμένη αυτή πορεία για την απόδειξη της βιοϊσοδυναμίας των φαρμάκων αφορά καλώς χαρακτηρισμένα χημικά μόρια που η χημική τους δομή είναι γνωστή και σταθερή στα πρωτότυπα και τα γενόσημα σκευάσματα.

Η καθιερωμένη αυτή πορεία για την απόδειξη της βιοϊσοδυναμίας των φαρμάκων ωστόσο, δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε δύο μεγάλες κατηγορίες φαρμάκων: στα βιοτεχνολογικά φάρμακα, τα οποία παράγονται από ζώντες οργανισμούς και στα μη βιολογικά σύμπλοκα φάρμακα (non biological complex drugs – NBCDs), τα οποία παράγονται μέσω μιας πλήρως συνθετικής οδού. Στις περιπτώσεις αυτές, οι όροι ισοδυναμία (equivalence) και βιοϊσοδυναμία (bioequivalence) κρίνονται αδόκιμοι για να περιγράψουν τη σχέση πρωτοτύπου και γενοσήμου φαρμάκου και αντικαθίσταται από τους όρους ομοιότητα (similarity) και βιοομοιότητα (biosimilarity).

Η διαδικασία ανάπτυξης και παραγωγής ενός βιοόμοιου φαρμάκου συνήθως ξεκινά με τη μελέτη και την ανάλυση των ιδιοτήτων του πρωτοτύπου φαρμάκου με σκοπό τη δημιουργία μιας παραγωγικής διεργασίας που να έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός φαρμάκου με χημική δομή και ιδιότητες κατά το δυνατόν πλησιέστερες στο πρωτότυπο φάρμακο (δημιουργία βιοομοίου φαρμάκου). Σε δεύτερη φάση, η βιοομοιότητα αποδεικνύεται με προκλινικές μελέτες, καθώς και με μελέτες φαρμακοκινητικής και φαρμακοδυναμικής. Μετά την έγκριση της κυκλοφορίας του φαρμάκου επιπλέον κλινικές μελέτες μπορούν να διεξαχθούν για την ενίσχυση της απόδειξης της βιοομοιότητας μεταξύ του πρωτοτύπου και του γενοσήμου φαρμάκου με επιπλέον δεδομένα. Το κρισιμότερο στάδιο για την ανάπτυξη ενός βιοομοίου φαρμάκου είναι το αρχικό στάδιο στο οποίο ορίζεται η παραγωγική διεργασία, καθώς η αποτυχία στη δημιουργία ενός φαρμάκου με υψηλό βαθμό ομοιότητας σε σχέση με το πρωτότυπο φάρμακο δεν μπορεί να αντισταθμιστεί με οποιαδήποτε προσπάθεια στα επόμενα στάδια. Ακολουθεί η εικόνα 4 με τη σχηματική αναπαράσταση της ανάπτυξης ενός βιοόμοιου φαρμάκου.



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση της διεργασίας ανάπτυξης ενός βιοόμοιου φαρμάκου.¹¹
 PK = Pharmacokinetics (Φαρμακοκινητική) , PD = Pharmacodynamics (Φαρμακοδυναμική)

Τα σκευάσματα σακχαρούχου σιδήρου ανήκουν στην κατηγορία των μη βιολογικών συμπλόκων φαρμάκων καθώς πληρούνται οι ακόλουθες προϋποθέσεις:

1. Αποτελούν σύμπλοκα μόρια με πυρήνες οξυ-υδροξειδίου του τρισθενούς σιδήρου και ένα υδατανθρακικό περίβλημα χωρίς απόλυτα καθορισμένη χημική δομή. Είναι δηλαδή ένα σύνολο μορίων με παραπλήσιες χημικές δομές.
2. Ο σακχαρούχος σίδηρος χαρακτηρίζεται ως προφάρμακο, καθώς το ιόν Fe(III) απελευθερώνεται ελεγχόμενα από το σύμπλοκο μόριο για την εμφάνιση της φαρμακολογικής δράσης. Ως δραστικό μόριο (active pharmaceutical ingredient) ωστόσο θεωρείται ολόκληρο το σύμπλοκο μόριο του σακχαρούχου σιδήρου.
3. Η χημική δομή και οι φυσικοχημικές ιδιότητες των συμπλόκων μορίων σακχαρούχου σιδήρου εξαρτώνται σημαντικά από την παραγωγική διεργασία, η οποία πρέπει να είναι αυστηρά ορισμένη και ελεγχόμενη.
4. Η χημική δομή και οι φυσικοχημικές ιδιότητες του συμπλόκου του σακχαρούχου σιδήρου δεν μπορούν να χαρακτηριστούν πλήρως με τις αναλυτικές μεθόδους κατά τον έλεγχο ποιότητας του φαρμάκου.

Το πρωτότυπο σκεύασμα σακχαρούχου σιδήρου (Venofer®) έλαβε έγκριση για κυκλοφορία αρχικά στην Ευρώπη τη δεκαετία του 1950 και στο παρελθόν αρκετά γενόσημα φάρμακα έλαβαν έγκριση για κυκλοφορία στην Ευρώπη μέσω της εθνικής διαδικασίας ή της αποκεντρωμένης διαδικασίας, κυρίως με βιβλιογραφική τεκμηρίωση ακολουθώντας την καθιερωμένη πορεία που αφορά τα γενόσημα φάρμακα. Η έγκριση αυτή γενοσήμων φαρμάκων σακχαρούχου σιδήρου χωρίς να ληφθεί υπ' όψιν η πολύπλοκη φύση του φαρμάκου αυτού οδήγησε στην ύπαρξη γενοσήμων φαρμάκων που δεν είχαν ισοδύναμα φαρμακολογικά αποτελέσματα με το πρωτότυπο φάρμακο. Η διεξαγωγή μελετών σε αρουραίους, αλλά και κλινικών μελετών σε ασθενείς έδειξε σημαντικές διαφορές στην ασφάλεια μεταξύ του πρωτοτύπου φαρμάκου και μερικών γενοσήμων φαρμάκων (iron sucrose similars – ISS) που εμφάνιζαν μεγαλύτερη τοξικότητα.

Με βάση τα δεδομένα αυτά υπάρχει ανάγκη για τη θέσπιση ενός κανονιστικού πλαισίου που θα ρυθμίζει τις διαδικασίες για την απόδειξη της βιοομοιότητας μεταξύ πρωτοτύπων και γενοσήμων φαρμάκων, καθώς και τη διαδικασία έγκρισης γενοσήμων φαρμάκων στις περιπτώσεις αυτές. Δεν έχει υπάρξει ακόμα ένα καλά θεμελιωμένο πλαίσιο, ούτε υπάρχει εναρμόνιση μεταξύ των κυριότερων οργανισμών φαρμάκων για το θέμα της βιοομοιότητας, αλλά υπάρχει μια εν εξελίξει συζήτηση για τα θέματα αυτά, η οποία είναι πολύ πιθανόν να οδηγήσει σε περισσότερα απτά αποτελέσματα στο μέλλον.

Κεφάλαιο A.2. Χημική κινητική

A.2.1. Εισαγωγή¹³⁻¹⁶

Η ταχύτητα μιας χημικής αντίδρασης εκφράζεται ως η μεταβολή της συγκέντρωσης των αντιδρώντων ή των προϊόντων σωμάτων στη μονάδα του χρόνου. Έτσι η ταχύτητα για τη γενική αντίδραση με γνωστή στοιχειομετρία



δίνεται από την ακόλουθη σχέση

$$u = -\frac{1}{a} \frac{d[A]}{dt} = -\frac{1}{b} \frac{d[B]}{dt} = \frac{1}{c} \frac{d[C]}{dt} = \frac{1}{d} \frac{d[D]}{dt} \quad (A2)$$

Η προηγούμενη σχέση ισχύει εφόσον η αντίδραση που μελετάται είναι γνωστής στοιχειομετρίας και οι στοιχειομετρικοί συντελεστές είναι σταθεροί σε δεδομένες συνθήκες (π.χ. δεν έχουμε άλλες δευτερεύουσες αντιδράσεις που καταναλώνουν τα αντιδρώντα σώματα). Ως ταχύτητα της αντίδρασης θεωρούμε την καθαρή ταχύτητα (u_{net}) που προκύπτει εάν από την ταχύτητα της αντίδρασης από τα αντιδρώντα προς τα προϊόντα σώματα αφαιρεθεί η ταχύτητα της αντίστροφης αντίδρασης από τα προϊόντα σώματα προς τα αντιδρώντα. Έτσι μπορεί να γραφτεί:

$$u_{net} = u_{forward} - u_{reverse} \quad (A3)$$

Στην κατάσταση της χημικής ισορροπίας, η καθαρή ταχύτητα είναι μηδέν και οι συγκεντρώσεις των αντιδρώντων και των προϊόντων σωμάτων διατηρούνται σταθερές. Στην περίπτωση όμως που η χημική αντίδραση απέχει από την κατάσταση της χημικής ισορροπίας η εξίσωση της ταχύτητας μπορεί να αναπαρασταθεί αποκλειστικά από τις συγκεντρώσεις των αντιδρώντων σωμάτων και να αγνοηθεί η αντίστροφη αντίδραση, θεωρώντας την αντίδραση μονόδρομη ($u_{net} = u_{forward}$). Έτσι ο νόμος της ταχύτητας μπορεί να γραφτεί ως εξής:

$$u = k[A]^x[B]^y \quad (A4)$$

Εάν η αντίδραση είναι στοιχειώδης, τότε οι στοιχειομετρικοί συντελεστές θα ταυτίζονται με τους εκθέτες της προηγούμενης εξίσωσης, δηλαδή $x = a$ και $y = b$. Από την ολοκλήρωση του νόμου της ταχύτητας προκύπτουν σχέσεις που αποδίδουν τη συγκέντρωση των αντιδρώντων σωμάτων (π.χ. A ή B) συναρτήσει του χρόνου.

Στην περίπτωση που η εξεταζόμενη αντίδραση εμφανίζει πρωτοταξική κινητική ως προς το σώμα A η εξίσωση του νόμου της ταχύτητας της αντίδρασης λαμβάνει την ακόλουθη μορφή:

$$u = -\frac{d[A]}{dt} = k[A] \quad (A5)$$

Κατόπιν ολοκλήρωσης η προηγούμενη σχέση λαμβάνει την ακόλουθη μορφή:

$$[A]_t = [A]_0 e^{-kt} \quad \text{ή} \quad \ln[A]_t = \ln[A]_0 - kt \quad (A6)$$

Εάν η αντίδραση που μελετάται είναι πρωτοταξική ως προς το σώμα A, τότε ο λογάριθμος της συγκέντρωσης του σώματος A θα εμφανίζει γραμμική σχέση ως προς το χρόνο και η κλίση της ευθείας αυτής γραμμής θα ισούται με την αντίθετη τιμή της πρωτοταξικής σταθεράς της ταχύτητας της αντίδρασης (-k).

Ακόμα ένα σημαντικό στοιχείο που μπορούμε να αντλήσουμε από την εξίσωση της ταχύτητας της αντίδρασης είναι ο χρόνος υποδιπλασιασμού ή χρόνος ημιζωής $t_{1/2}$, δηλαδή ο χρόνος που απαιτείται για να ελαττωθεί στο μισό η συγκέντρωση του αντιδρώντος σώματος. Για την περίπτωση της πρωτοταξικής κινητικής θέτοντας στην προηγούμενη εξίσωση $[A]_t = [A]_0/2$ καταλήγουμε στη σχέση:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} = \frac{0,693}{k} \quad (A7)$$

Από την προηγούμενη σχέση συμπεραίνουμε ότι ο χρόνος υποδιπλασιασμού σε μία εξίσωση που ακολουθεί πρωτοταξική κινητική εξαρτάται μόνο από τη σταθερά της ταχύτητας της αντίδρασης.

Με τον ίδιο τρόπο μπορεί να αποδειχθεί ότι στην περίπτωση που η αντίδραση ακολουθεί πρωτοταξική κινητική, ο χρόνος στον οποίο έχει καταναλωθεί ένα ορισμένο ποσοστό του αντιδρώντος σώματος είναι σταθερός και εξαρτάται μόνο από τη σταθερά της ταχύτητας της αντίδρασης. Για παράδειγμα, ο χρόνος στον οποίο έχει καταναλωθεί το 75 % του αντιδρώντος σώματος θα δίνεται από την ακόλουθη σχέση:

$$T_{75} = \frac{\ln 4}{k} = \frac{1,386}{k} \quad (A8)$$

Ακολουθεί ο πίνακας 1 όπου δίδονται οι εξισώσεις ταχύτητας για τις διάφορες τάξεις αντίδρασης.

Πίνακας 1: Η εξίσωση του νόμου της ταχύτητας σε σχέση με την τάξη της αντίδρασης. ^{13,14}

Τάξη της αντίδρασης	Νόμος της ταχύτητας	Ολοκληρωμένη μορφή του νόμου της ταχύτητας	Μονάδες της σταθεράς k	Γραμμική Σχέση
0	$-\frac{d[A]}{dt} = k$	$[A]_t = [A]_0 - kt$	M s ⁻¹	[A] _t vs t
1	$-\frac{d[A]}{dt} = k[A]$	$[A]_t = [A]_0 e^{-kt}$	s ⁻¹	ln[A] _t vs t
2	$-\frac{d[A]}{dt} = k[A]^2$	$\frac{1}{[A]_t} = \frac{1}{[A]_0} + kt$	M ⁻¹ s ⁻¹	$\frac{1}{[A]_t}$ vs t
2	$-\frac{d[A]}{dt} = k[A][B]$	$\frac{1}{[B]_0 - [A]_0} \ln \frac{[A]_0[B]_t}{[B]_0[A]_t} = kt$	M ⁻¹ s ⁻¹	
3	$-\frac{d[A]}{dt} = k[A]^3$	$\frac{1}{[A]_t^2} = \frac{1}{[A]_0^2} + kt$	M ⁻² s ⁻¹	$\frac{1}{[A]_t^2}$ vs t
a + b + c	$-\frac{1}{a} \frac{d[A]}{dt} = k[A]^a[B]^b[C]^c$			

Η πλειοψηφία των αντιδράσεων είναι αρκετά πολύπλοκες, η κινητική τους εξαρτάται από περισσότερα του ενός σώματα και δεν εμπίπτουν σε κατηγορίες, όπου η ολοκλήρωση του νόμου της ταχύτητας είναι μια εύκολη διαδικασία. Σε αυτές τις περιπτώσεις συνήθως χρησιμοποιούνται προσεγγίσεις που απλοποιούν τη μελέτη του φαινομένου, όπως η μελέτη του αρχικού ρυθμού της αντίδρασης και η μέθοδος της ψευδο-νιοστής-τάξης κινητικής.

A.2.2. Αρχικός ρυθμός ταχύτητας της αντίδρασης ¹³

Η τεχνική του αρχικού ρυθμού της αντίδρασης χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της τάξης ενός εκ των αντιδρώντων σωμάτων σε αντιδράσεις που εμφανίζουν μία σύνθετη εξίσωση ταχύτητας. Ο αρχικός ρυθμός αντιστοιχεί στον γραμμικό αρχικό ρυθμό της αντίδρασης όταν δεν έχει καταναλωθεί σημαντικό μέρος των αντιδρώντων σωμάτων (λιγότερο του 10%) και η αντίστροφη αντίδραση από τα προϊόντα προς τα αντιδρώντα σώματα θεωρείται αμελητέα.

Μαθηματικά αυτό μπορεί να εκφραστεί με την ακόλουθη σχέση:

$$Rate_{initial} = -\frac{1}{a} \frac{d[A]}{dt} \approx -\frac{1}{a} \frac{\Delta[A]}{\Delta t} \approx k[A]^a[B]^b[C]^c \quad (A9)$$

Στην περίπτωση αυτή εάν θέλουμε να προσδιορίσουμε τον συντελεστή α αρκεί να μετρήσουμε τον ρυθμό της αντίδρασης σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις

του σώματος A διατηρώντας σταθερές τις συγκεντρώσεις των σωμάτων B και C. Έτσι λαμβάνουμε τη σχέση:

$$\frac{Rate_1}{Rate_2} = \frac{[A_1]^a}{[A_2]^a} = \left(\frac{[A_1]}{[A_2]}\right)^a \quad (A10)$$

Μετασχηματίζοντας την προηγούμενη εξίσωση ο συντελεστής α μπορεί να προσδιοριστεί από την σχέση:

$$\alpha = \frac{\log\left(\frac{[Rate_1]}{[Rate_2]}\right)}{\log\left(\frac{[A_1]}{[A_2]}\right)} \quad (A11)$$

Ενώ ο συντελεστής α μπορεί να προσδιοριστεί μόνο με δύο επίπεδα συγκεντρώσεων για το σώμα A, είναι συνήθως πρακτική να χρησιμοποιούνται περισσότερα επίπεδα συγκεντρώσεων και ο συντελεστής α αποτελεί την κλίση της ευθείας γραμμής που προκύπτει από γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης του $\log(Rate_{initial})$ με το $\log(A_{initial})$ σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\log(Rate_{initial}) = a \log(A_{initial}) + \log(k[B]^b[C]^c) \quad (A12)$$

Με όμοιο τρόπο μπορούν να προσδιοριστούν και οι υπόλοιποι συντελεστές της αντίδρασης, καθώς και η σταθερά του νόμου της ταχύτητας ως εξής:

$$k = \frac{Rate_{initial}}{[A]^a[B]^b[C]^c} \quad (A13)$$

A.2.3. Ψευδο-νιοστής-τάξης κινητική ¹³

Σε περιπτώσεις αντιδράσεων που είναι αρκετά ταχείες ώστε να προσδιοριστεί ο αρχικός ρυθμός της αντίδρασης ή είναι υψηλής τάξης, η αντίδραση αυτή μπορεί να προσομοιωθεί από μια ψευδο-χαμηλότερης-τάξης κινητική μετά από προσαρμογή των συγκεντρώσεων μερικών εκ των συστατικών. Η μέθοδος αυτή αναφέρεται στη βιβλιογραφία και ως μέθοδος της απομόνωσης.

Για την ακόλουθη αντίδραση, εάν οι συγκεντρώσεις των σωμάτων B και C είναι σε σημαντική περίσσεια σε σχέση με το σώμα A, τότε μπορεί να θεωρηθεί ότι το σώμα A μπορεί να καταναλωθεί εξ' ολοκλήρου χωρίς να υπάρξει σημαντική μεταβολή στις συγκεντρώσεις των σωμάτων B και C που παραμένουν σταθερές κατά τη διάρκεια της αντίδρασης.



Στην περίπτωση αυτή η εξίσωση της ταχύτητας αντί της γενικής μορφής (A9) λαμβάνει την απλοποιημένη μορφή με μειωμένη τάξη αντίδρασης:

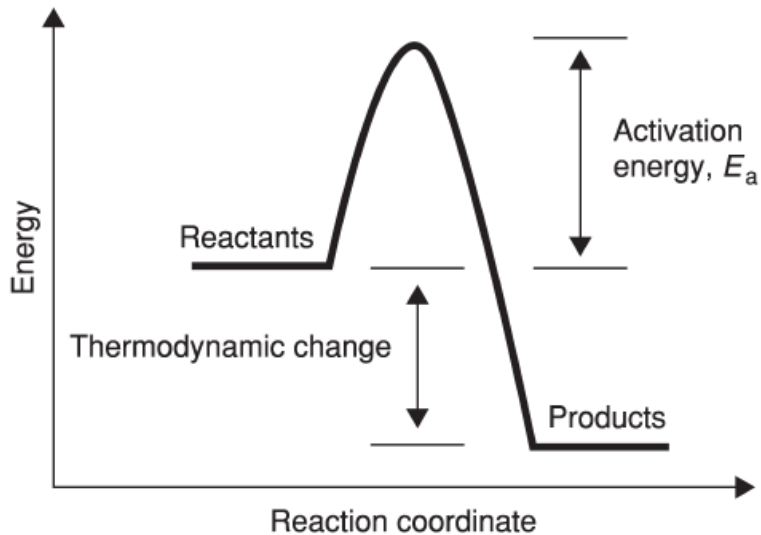
$$-\frac{1}{a} \frac{d[A]}{dt} = k'[A]^a \quad (\text{A15})$$

Η σταθερά k' που συχνά συμβολίζεται με k_{obs} , γιατί αποτελεί τη μετρούμενη-παρατηρούμενη (observed) σταθερά υπό συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, αποτελεί την ψευδο-α-τάξης σταθερά. Ο συντελεστής a μπορεί να προσδιοριστεί μελετώντας τη σχέση της συγκέντρωσης του σώματος A συναρτήσει του χρόνου.

Με αυτή την τεχνική μια οποιαδήποτε κινητική εξίσωση υψηλότερης τάξης μπορεί να απλοποιηθεί σε μια κινητική που περιλαμβάνει ένα ή δύο σώματα που θεωρούνται περισσότερο σημαντικά στο φαινόμενο που μελετάται.

A.2.4. Ενέργεια ενεργοποίησης και κινητικές θεωρίες ^{13,14}

Η πορεία μια χημικής αντίδρασης μπορεί να απεικονισθεί με ένα διάγραμμα που στο y -άξονα βρίσκεται η ενέργεια και στο x -άξονα αναπαριστάται η πορεία της αντίδρασης από τα αντιδρώντα προς τα προϊόντα σώματα. Ο ενεργειακός φραγμός μεταξύ των αντιδρώντων και των προϊόντων σωμάτων ορίζεται ως ενέργεια ενεργοποίησης (E_a). Το μέγεθος της ενέργειας ενεργοποίησης καθορίζει την ταχύτητα της αντίδρασης. Αυτό σημαίνει ότι αντιδράσεις με μικρότερη ενέργεια ενεργοποίησης θα προχωρούν ταχύτερα από τα αντιδρώντα προς τα προϊόντα σώματα σε σχέση με αυτές που έχουν υψηλότερη ενέργεια ενεργοποίησης. Συνεπώς αντιδράσεις με υψηλή ενέργεια ενεργοποίησης μπορεί να ευνοούνται θερμοδυναμικά, αλλά να είναι κινητικά ασήμαντες.



Εικόνα 5: Διάγραμμα που αναπαριστά την ενέργεια σε συνάρτηση με την πορεία της αντίδρασης σε μια θερμοδυναμικώς ευνοούμενη αντίδραση.¹³

Για την ερμηνεία της κινητικής των αντιδράσεων οι κυριότερες θεωρίες που έχουν αναπτυχθεί είναι η θεωρία των συγκρούσεων, η θεωρία της μεταβατικής κατάστασης και η κινητική Michaelis-Menten.

Θεωρία των συγκρούσεων

Σύμφωνα με τη θεωρία των συγκρούσεων (1920), τα αντιδρώντα σώματα υπερβαίνουν την ενέργεια ενεργοποίησης συγκρουόμενα μεταξύ τους. Για αντιδράσεις που έχουν χαμηλή ενέργεια ενεργοποίησης κάθε σύγκρουση οδηγεί στο σχηματισμό προϊόντων. Σε αυτήν την περίπτωση το περιοριστικό βήμα για την κινητική της αντίδρασης είναι η μεταφορά ή η διάχυση των μορίων, που περιορίζουν το πόσο γρήγορα μπορούν να γίνουν οι συγκρούσεις μεταξύ των αντιδρώντων σωμάτων.

Για αντιδράσεις με μεγάλη ενέργεια ενεργοποίησης μόνο ένας μικρός αριθμός των συγκρούσεων των μορίων οδηγεί στο σχηματισμό προϊόντων σωμάτων. Σύμφωνα με τη θεωρία των συγκρούσεων για να οδηγήσει μια σύγκρουση αντιδρώντων μορίων στο σχηματισμό προϊόντων θα πρέπει τα μόρια αυτά να έχουν κατάλληλη ενέργεια και κατάλληλο προσανατολισμό. Η ελάχιστη ενέργεια που απαιτείται χρησιμοποιείται για την υπέρβαση των απωστικών δυνάμεων που αναπτύσσονται μεταξύ των μορίων κατά τη σύγκρουσή τους, τη διάσπαση δεσμών και την ανακατάταξη των ηλεκτρονίων με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματιστούν τα προϊόντα. Η ελάχιστη αυτή ενέργεια αντιστοιχεί στην ενέργεια ενεργοποίησης. Ο κατάλληλος προσανατολισμός είναι εξίσου απαραίτητος για να γίνει η αντίδραση και το κλάσμα των συγκρούσεων στις οποίες τα μόρια έχουν τον προσανατολισμό αυτό καλείται στερεοχημικός παράγοντας και εξαρτάται από τη φύση των αντιδρώντων σωμάτων.

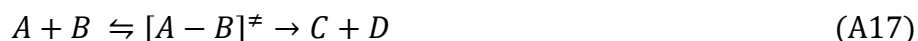
Εν κατακλείδι, σύμφωνα με τη θεωρία των συγκρούσεων η σταθερά ταχύτητας της αντίδρασης θα δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$k = Zfp \quad (A16)$$

Όπου Z είναι η συχνότητα των συγκρούσεων, f το κλάσμα των συγκρούσεων που θα έχουν ενέργεια μεγαλύτερη από την ενέργεια ενεργοποίησης και p το κλάσμα των συγκρούσεων που συμβαίνουν με τα αντιδρώντα κατάλληλα προσανατολισμένα.

Θεωρία της μεταβατικής κατάστασης

Στη θεωρία της μεταβατικής κατάστασης (1930) ή θεωρία του ενεργοποιημένου συμπλόκου, οι συγκρούσεις μεταξύ των αντιδρώντων σωμάτων οδηγούν στο σχηματισμό μιας ασταθούς ενδιάμεσης κατάστασης, αυτής του ενεργοποιημένου συμπλόκου. Κατά τη δημιουργία του ενεργοποιημένου συμπλόκου, μέρος της κινητικής ενέργειας των αντιδρώντων μετατρέπεται σε δυναμική ενέργεια λόγω της αναδιάταξης των χημικών δεσμών. Η ενεργειακή κατάσταση του ενεργοποιημένου συμπλόκου είναι υψηλή και άρα η ασταθής αυτή δομή διασπάται προς το σχηματισμό των προϊόντων ή των αντιδρώντων σωμάτων. Η ενεργειακή διαφορά μεταξύ των αντιδρώντων σωμάτων και του ενεργοποιημένου συμπλόκου αντιστοιχεί στην ενέργεια ενεργοποίησης. Σχηματικά η θεωρία της μεταβατικής κατάστασης μπορεί να αναπαρασταθεί ως εξής:



Σύμφωνα με τη θεωρία της μεταβατικής κατάστασης, κάθε στοιχειώδης αντίδραση αντιστοιχεί σε ένα ενεργοποιημένο σύμπλοκο. Άρα στην περίπτωση που έχουμε μια ολική αντίδραση που αποτελείται από περισσότερες στοιχειώδεις αντιδράσεις θα έχουμε τόσα ενεργοποιημένα σύμπλοκα, όσες και οι στοιχειώδεις αντιδράσεις. Το ενεργοποιημένο σύμπλοκο του πιο αργού σταδίου θα εμφανίζει την υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση (ενέργεια ενεργοποίησης) και άρα θα αποτελεί το περιοριστικό βήμα για την ταχύτητα της ολικής αντίδρασης. Συνεπώς στη θεωρία της μεταβατικής κατάστασης, όπως και στη θεωρία των συγκρούσεων, η ενέργεια ενεργοποίησης αποτελεί το φράγμα μιας αντίδρασης και όσο μικρότερη είναι η ενέργεια ενεργοποίησης, τόσο ταχύτερη είναι η αντίδραση.

Ενέργεια ενεργοποίησης και σταθερά της ταχύτητας

Η μαθηματική σχέση που συνδέει την ενέργεια ενεργοποίησης με τη σταθερά της ταχύτητας αντίδρασης αναπτύχθηκε αρχικά από τον χημικό Svante Arrhenius το 1889, πριν από τη διατύπωση των δύο προηγούμενων θεωριών και έχει τη ακόλουθη μορφή:

$$k = Ae^{\frac{-E_a}{RT}} \quad (\text{A18})$$

Στην εξίσωση αυτή το μέγεθος E_a (σε J mol^{-1}) είναι η μοριακή ενέργεια ενεργοποίησης, R η παγκόσμια σταθερά των αερίων ($8,3145 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T η απόλυτη θερμοκρασία (σε K) και A η σταθερά της εξίσωσης του Arrhenius που ονομάζεται και παράγοντας συχνότητας. Η σταθερά της εξίσωσης του Arrhenius εξαρτάται από το στερεοχημικό παράγοντα.

Η εξίσωση του Arrhenius επιτρέπει τον προσδιορισμό της ενέργειας ενεργοποίησης, καθώς επίσης και την ποσοτικοποίηση της επίδρασης της θερμοκρασίας στην ταχύτητα της αντίδρασης. Σύμφωνα με την εξίσωση του Arrhenius, η σταθερά της ταχύτητας της αντίδρασης αυξάνεται εκθετικά με την αύξηση της θερμοκρασίας. Αυτό συμβαίνει λόγω του ότι η αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνει τη μέση κινητική ενέργεια των μορίων και επομένως και το ποσοστό των αποτελεσματικών συγκρούσεων.

Ο προσδιορισμός της ενέργειας ενεργοποίησης μπορεί να γίνει με τη μέτρηση της σταθεράς της ταχύτητας της αντίδρασης σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Με γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης του παράγοντα $\ln k$ συναρτήσει του T^{-1} , λαμβάνεται ευθεία γραμμή με κλίση $-E_a R^{-1}$ σύμφωνα και με τη μετασχηματισμένη εξίσωση του Arrhenius:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (\text{A19})$$

Κεφάλαιο Α.3. Πειραματικός σχεδιασμός

Α.3.1. Εισαγωγή¹⁷⁻²⁴

Ο πειραματικός σχεδιασμός ή στατιστικός σχεδιασμός των πειραμάτων (experimental design ή statistical design of experiments, DoE) είναι η στρατηγική οργάνωσης των πειραμάτων με τέτοιο τρόπο ώστε η πληροφορία που αναζητείται να λαμβάνεται όσο αποδοτικότερα και ακριβέστερα γίνεται με τον ελάχιστο αριθμό πειραμάτων.

Ο πειραματικός σχεδιασμός αποτελεί μια τεχνική εκτέλεσης πειραμάτων στην οποία οι ελεγχόμενοι παράγοντες μεταβάλλονται σκόπιμα και ταυτόχρονα προκειμένου να κατανοηθεί η επίδραση που θα έχουν στο τελικό αποτέλεσμα, αλλά και πως οι τυχόν μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις επηρεάζουν το τελικό αποτέλεσμα στη διεργασία που μελετάται (απόκριση της διεργασίας). Έτσι αποσκοπεί στη διερεύνηση και τη βαθειά κατανόηση των διεργασιών μέσω της διερεύνησης των σχέσεων αιτίου – αιτιατού που διέπουν τις διεργασίες αυτές.

Ο πειραματικός σχεδιασμός σήμερα εφαρμόζεται ευρύτατα, τόσο στα πλαίσια της βιομηχανίας, όσο και στα πλαίσια της επιστημονικής έρευνας σε πολλά διαφορετικά πεδία, όπως η ιατρική, η φαρμακολογία, η βιολογία, η γεωργία, η αστρονομία, η τεχνολογία υλικών, η βιομηχανική παραγωγή, η αεροναυπηγική κ.α.

Με τη χρήση του πειραματικού σχεδιασμού στη βιομηχανία βελτιώνονται οι βιομηχανικές διεργασίες και τα παραγόμενα προϊόντα, καθώς ελαττώνεται η μεταβλητότητα, αυξάνεται η ανθεκτικότητα των διεργασιών, αυξάνεται η ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων και οι διεργασίες σχεδιάζονται και εκτελούνται σωστά από την αρχή. Η ποιότητα δεν αντιμετωπίζεται πλέον σαν μια ιδιότητα των προϊόντων που ελέγχεται στο τέλος, αλλά ενσωματώνεται σε αυτά από την αρχή μέσω του σχεδιασμού (Quality by Design – QbD). Καθώς το κόστος του σχεδιασμού είναι μικρό σε σχέση με το κέρδος που θα προκύψει από τη βελτίωση των διεργασιών η χρήση του πειραματικού σχεδιασμού αποτελεί ανταγωνιστικό πλεονέκτημα για τις βιομηχανίες σήμερα.

Τα τελευταία χρόνια στη φαρμακευτική βιομηχανία σημειώθηκαν σημαντικές αλλαγές όσον αφορά στο κανονιστικό πλαίσιο της έρευνας και ανάπτυξης φαρμακευτικών προϊόντων. Σύμφωνα με τις σύγχρονες κανονιστικές διατάξεις (FDA, Guidance for Industry-PAT, 2004, ICH Q8, 2006), απαιτείται βαθειά γνώση των διεργασιών για την ενσωμάτωση της ποιότητας στα προϊόντα από το αρχικό στάδιο, δηλαδή τη φάση του σχεδιασμού.

Για πρώτη φορά στη φαρμακευτική έρευνα και ανάπτυξη διατυπώνεται από επίσημους φορείς η απαίτηση για την ύπαρξη ενός σχεδιαστικού χώρου εντός του οποίου η συμπεριφορά της διεργασίας είναι γνωστή, καθορισμένη και

οδηγεί στα επιθυμητά χαρακτηριστικά ποιότητας των φαρμακευτικών προϊόντων (ασφάλεια, ποιότητα και αποτελεσματικότητα). Ακόμα προτείνεται η χρήση του Πειραματικού Σχεδιασμού στην έρευνα και ανάπτυξη των φαρμακευτικών προϊόντων. Με λίγα λόγια, το ενδιαφέρον μεταφέρεται οριστικά από τον τυπικό έλεγχο ποιότητας των φαρμακευτικών προϊόντων στις διεργασίες που τα παράγουν, από τη φάση της ανάπτυξης. Πλέον απαιτείται εξ' αρχής η ανάπτυξη κατάλληλων, ικανών, ανθεκτικών και επαναλήψιμων διεργασιών, στα πλαίσια της ποιότητας σχεδιασμού (Quality by Design).

A.3.2. Σύγκριση του πειραματικού σχεδιασμού με τις παραδοσιακές τεχνικές πειραματισμού – Πλεονεκτήματα πειραματικού σχεδιασμού^{23,24}

Παραδοσιακά έχουν χρησιμοποιηθεί πολλές διαφορετικές τεχνικές πειραματισμού οι οποίες είχαν την δυνατότητα να εξάγουν συμπεράσματα με απλότητα και αμεσότητα. Στη συνέχεια αναφέρονται δύο από αυτές για να συγκριθούν με το πειραματικό σχεδιασμό.

- Τεχνική αλλαγής ενός παράγοντα τη φορά (One Factor At a Time approach, OFAT)

Στην τεχνική OFAT μεταβάλλεται ένας παράγοντας κάθε φορά, ενώ οι υπόλοιποι διατηρούνται σταθεροί και παρατηρείται η μεταβολή στο αποτέλεσμα. Αυτή η τεχνική αποτελεί την πιο κλασική τεχνική πειραματισμού και χρησιμοποιείται και σήμερα συχνά στην πράξη, ωστόσο εμφανίζει ορισμένα μειονεκτήματα. Απαιτεί μεγάλη δαπάνη πόρων και χρόνου αφού περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό πειραμάτων, τα συμπεράσματα που εξάγονται δεν είναι πάντα τόσο ασφαλή και δεν λαμβάνει υπ' όψιν της τυχόν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων.

- Τεχνική της εμπειρικής εκτίμησης των καλύτερων συνθηκών (Best guess approach)

Στην τεχνική αυτή ορίζονται οι τιμές των παραγόντων που οι ερευνητές θεωρούν ότι είναι οι καλύτερες και με αλλαγές σε ένα ή δυο παράγοντες το πολύ προσπαθούν να βελτιώσουν το αποτέλεσμα. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην εμπειρία των ερευνητών και στη γνώση των διεργασιών, αλλά δεν μας παρέχει τη δυνατότητα να γνωρίζουμε τις βέλτιστες συνθήκες, ενώ πολλές φορές μπορούν να γίνουν πολλές προσπάθειες χωρίς κανένα αποτέλεσμα.

Άρα θα μπορούσαμε να συνοψίσουμε τα πλεονεκτήματα του Πειραματικού Σχεδιασμού έναντι των παραδοσιακών τεχνικών πειραματισμού στα εξής:

1. Ο πειραματικός σχεδιασμός εμφανίζει τη μέγιστη δυνατή αποτελεσματικότητα, καθώς αποκτάμε τη μέγιστη δυνατή πληροφορία με τον ελάχιστο αριθμό πειραμάτων.
2. Η μείωση του αριθμού των πειραμάτων σημαίνει ότι μειώνεται και η δαπάνη σε χρόνο και χρήμα που απαιτείται για τα πειράματα.
3. Υπάρχει η δυνατότητα για εις βάθος κατανόηση της διεργασίας με διερεύνηση των επιδράσεων, αλλά και των αλληλεπιδράσεων που εμφανίζονται μεταξύ των παραγόντων.
4. Επιτρέπει το διαχωρισμό ανάμεσα στους σημαντικούς και μη σημαντικούς παράγοντες. Διαφοροποιεί τους παράγοντες θορύβου από τους κρίσιμους παράγοντες.
5. Προσομοιώνει τη συμπεριφορά της διεργασίας με μαθηματικά μοντέλα στα οποία μετά από στατιστική επεξεργασία αξιολογεί τη στατιστική τους σημασία.
6. Επιτρέπει την ανεξάρτητη αλλαγή των παραγόντων της διεργασίας. Παρέχει σημαντική πληροφορία από μία μόνο μελέτη και επιτρέπει την εύρεση της βέλτιστης διεργασίας με μικρό αριθμό πειραμάτων.
7. Ικανότητα πρόβλεψης του αποτελέσματος της διεργασίας σε όλο το πειραματικό χώρο και η δυνατότητα βελτιστοποίησής της ή η εκτίμηση της ανθεκτικότητάς της στη μεταβλητότητα των συνθηκών.

A.3.3. Η διαδικασία του πειραματισμού – Τα επτά βήματα του πειραματικού σχεδιασμού^{19,23,24}

Η διαδικασία του πειραματικού σχεδιασμού διακρίνεται σε τρεις φάσεις, τη φάση του σχεδιασμού του πειράματος, τη φάση της διεξαγωγής πειραμάτων και τη φάση της ανάλυσης των αποτελεσμάτων και της εξαγωγής συμπερασμάτων. Οι τρεις αυτές φάσεις είναι εξίσου σημαντικές και απαιτούν τη συντονισμένη εργασία της ομάδας για να αποδώσουν. Ο Montgomery (1997) περιέγραψε την ακόλουθη αλληλουχία επτά βημάτων που πρέπει να γίνονται για την ορθή διεξαγωγή ενός πειραματικού σχεδίου.¹⁹

- **1° Βήμα: Ορισμός του αντικειμένου πειραματισμού**

Είναι απλό αλλά σημαντικό βήμα του πειραματισμού. Εδώ πρέπει να ορισθεί ο στόχος και το αντικείμενο του πειραματισμού (ο τρόπος με τον οποίο θα επιτευχθεί ο στόχος αυτός).

- **2° Βήμα: Επιλογή παραγόντων και επιπέδων**

Εδώ επιλέγεται ο αριθμός των παραγόντων που θα μελετηθούν, ο αριθμός και οι τιμές των επιπέδων τους. Εδώ απαιτούνται θεωρητικές και πρακτικές γνώσεις για την επιλογή των κατάλληλων επιπέδων.

- **3° Βήμα: Επιλογή των αποκρίσεων**

Εδώ επιλέγονται τα χαρακτηριστικά της διεργασίας που θα μελετηθούν, τα οποία θα πρέπει να είναι και καθοριστικά για την ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος. Για τις αποκρίσεις που επιλέγουμε θα πρέπει να υπάρχει μια μέθοδος μέτρησης που θα διαθέτει ικανοποιητική ακρίβεια, επαναληψιμότητα και αξιοπιστία.

- **4° Βήμα: Επιλογή του είδους του σχεδιασμού**

Εδώ επιλέγεται ο κατάλληλος τύπος σχεδιασμού (π.χ. κλασματικός ή πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός), ο αριθμός των επαναλήψεων, η τυχαιοποίηση και η ομαδοποίηση των πειραμάτων.

- **5° Βήμα: Διεξαγωγή των πειραμάτων**

- **6° Βήμα: Ανάλυση των πειραματικών δεδομένων**

Η ανάλυση των πειραματικών δεδομένων μπορεί να γίνει με βοήθεια κατάλληλου λογισμικού που αναλύει τα δεδομένα με στατιστικό τρόπο και παρέχει γραφικά εργαλεία που βοηθούν στην ερμηνεία τους.

- **7° Βήμα: Εξαγωγή Συμπερασμάτων**

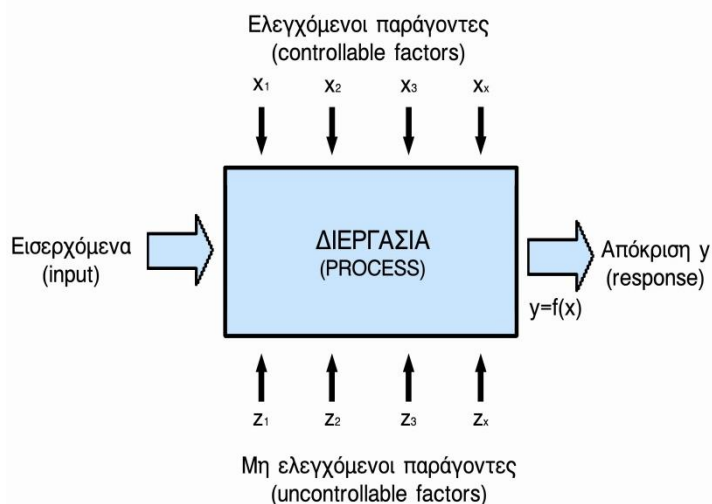
Με την ανάλυση των πειραματικών δεδομένων εξάγονται και συμπεράσματα που συνήθως έχουν πρακτική σημασία και μπορούν να επιβεβαιωθούν με τη διεξαγωγή επιβεβαιωτικών δοκιμών.

A.3.4. Βασικοί ορισμοί – Τα κυριότερα είδη πειραματικού σχεδιασμού

24-28

Βασικοί Ορισμοί

Διεργασία (process) ²⁷: Ορίζεται ως ένας συνδυασμός ανθρώπων, μεθόδων, εξοπλισμού, υλικών, μετρήσεων και περιβαλλοντικών συνθηκών οι οποίες αλληλεπιδρούν παράλληλα ώστε να παραχθεί ένα συγκεκριμένο αποτέλεσμα. Στην εικόνα 6 δίδεται σχηματική αναπαράσταση της έννοιας.



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της διεργασίας. ²⁴

Πειραματικός Σχεδιασμός (experimental design) ²⁶: Είναι η διεύθυνση του τρόπου διεξαγωγής ενός πειράματος και η επιλογή των επιπέδων ενός ή περισσότερων παραγόντων ή των συνδυασμών αυτών που θα συμπεριληφθούν στο πείραμα.

Πειραματική δοκιμή (experimental run) ¹⁸: Είναι μία σειρά δοκιμασιών οι οποίες εκτελούνται υπό καθορισμένες συνθήκες και καταλήγουν σε ένα μοναδικό δεδομένο για τις μετρούμενες αποκρίσεις.

Δοκιμή (test) ή δοκιμασία (trial) ¹⁸: Είναι η διαδικασία της εξέτασης της ισχύος μίας υπόθεσης. Μπορεί για παράδειγμα να προσανατολίζεται στον έλεγχο της συμμόρφωσης με τις προδιαγραφές.

Σχεδιαστικός χώρος (design space) ¹⁸: Καθορίζεται από τα επίπεδα των παραγόντων και αποτελεί το χώρο εντός του οποίου πραγματοποιούνται οι πειραματικές δοκιμές.

Παράγοντας ή ανεξάρτητη μεταβλητή (factor or independent variable) ¹⁸: Είναι η ελεγχόμενη ή μη μεταβλητή η οποία μπορεί να είναι ποσοτική ή ποιοτική και της οποίας η επίδραση μελετάται επί της απόκρισης. Ως ποιοτική χαρακτηρίζεται η μεταβλητή εκείνη που μπορεί να λάβει μόνο διακριτές μη

αριθμητικές τιμές, ενώ ποσοτική είναι η μεταβλητή εκείνη που μπορεί να λάβει αριθμητικές τιμές (συνεχείς ή διακριτές).

Επίπεδο Παράγοντα (factor level): Είναι οι διάφορες τιμές που μπορεί να λάβει ένας παράγοντας στα πειράματα.

Απόκριση (response) ²⁷: Είναι το υπό μελέτη χαρακτηριστικό ποιότητας ή αλλιώς η μετρούμενη εξερχόμενη μεταβλητή μίας διεργασίας ή ενός πειράματος (εξαρτημένη μεταβλητή). Η επιλογή της απόκρισης ή των αποκρίσεων κατά το σχεδιασμό ενός πειράματος είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με το γενικό σκοπό της μελέτης.

Επίδραση (effect) ²⁷: Ονομάζεται το μέγεθος της αλλαγής μίας απόκρισης λόγω της μεταβολής των επιπέδων των υπό μελέτη παραγόντων. Ως κύρια επίδραση ορίζεται αυτή που έχει ο κάθε παράγοντας ξεχωριστά στα διάφορα επίπεδα του.

Αλληλεπίδραση (interaction) ¹⁹: Ο όρος αλληλεπίδραση στον πειραματικό σχεδιασμό χρησιμοποιείται στη περίπτωση εκείνη στην οποία η επίδραση ενός παράγοντα στην απόκριση δεν είναι γραμμική, δηλαδή δεν εμφανίζει αναλογία με τη μεταβολή των επιπέδων του. Το φαινόμενο της αλληλεπίδρασης μπορεί να είναι συνεργικό ή ανταγωνιστικό.

Μαθηματικό μοντέλο (mathematical model) ¹⁸: Είναι η έκφραση η οποία ορίζει την εξάρτηση της εξαρτημένης μεταβλητής (απόκριση) από τις ανεξάρτητες μεταβλητές (παράγοντες).

Τυχαιοποίηση (randomization) ²⁶: Είναι η διαδικασία επιλογής της σειράς διεξαγωγής των πειραμάτων με τέτοιο τρόπο ώστε όλοι οι πιθανοί συνδυασμοί να παρουσιάζουν την ίδια πιθανότητα εκτέλεσης.

Κυριότερα είδη πειραματικού σχεδιασμού

Στη φαρμακευτική χρησιμοποιούνται διαφορετικοί τύποι πειραματικού σχεδιασμού ανάλογα με τις μελετώμενες παραμέτρους, καθώς και με το σκοπό της μελέτης. Ανάλογα με τις παραμέτρους που μελετώνται έχουμε τους σχεδιασμούς μείγματος (mixture designs) και τους σχεδιασμούς διεργασίας (process designs) ή παραγοντικούς σχεδιασμούς (factorial designs).

Στους σχεδιασμούς μείγματος μελετάται η επίδραση της μεταβολής των ποσοτήτων των συστατικών σε μια φαρμακευτική συνταγή όταν η συνολική τους ποσότητα είναι καθορισμένη. Οι σχεδιασμοί αυτοί έχουν ευρεία εφαρμογή στο αντικείμενο της φαρμακευτικής τεχνολογίας και στη μελέτη των φαρμακευτικών συνταγών (formulation). Στους σχεδιασμούς που αφορούν τη μελέτη των διεργασιών μελετάται η επίδραση της μεταβολής παραμέτρων (παραγόντων) που μπορούν να μεταβληθούν ανεξάρτητα η μία από την άλλη

στις αποκρίσεις της διεργασίας. Όταν είναι επιθυμητή η ταυτόχρονη μελέτη των δύο προηγούμενων περιπτώσεων ενδείκνυται η εφαρμογή σχεδιασμών μείγματος-διεργασίας.

Η χρήση του πειραματικού σχεδιασμού διαφοροποιείται ανάλογα με το σκοπό της μελέτης σε τρεις κυρίως κατηγορίες: σχεδιασμοί διαχωρισμού των σημαντικών παραγόντων (screening designs), σχεδιασμοί χαρακτηρισμού της διεργασίας και σχεδιασμοί βελτιστοποίησης της διεργασίας (optimization designs ή response surface methodology designs). Οι σχεδιασμοί διαχωρισμού των σημαντικών παραγόντων χρησιμοποιούνται στα πρώτα στάδια της μελέτης, όπου συνήθως το ζητούμενο είναι να προσδιοριστούν ποιοι από τους παράγοντες επιδρούν στις αποκρίσεις σε στατιστικά σημαντικό βαθμό. Οι σχεδιασμοί αυτοί αποσκοπούν στη διάκριση των λίγων σημαντικών παραγόντων από πολλούς μη σημαντικούς παράγοντες. Κατά κανόνα σε αυτή τη φάση χρησιμοποιούνται κλασματικοί παραγοντικοί σχεδιασμοί. Οι σχεδιασμοί χαρακτηρισμού της διεργασίας στοχεύουν στην πληρέστερη μελέτη των επιδράσεων λίγων παραγόντων στις αποκρίσεις. Εδώ ενδιαφέρει η μελέτη λίγων παραγόντων (συνήθως στατιστικά σημαντικών) και η μελέτη των επιδράσεων και των αλληλεπιδράσεών τους. Ο πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός αποτελεί τον ιδανικότερο σχεδιασμό για την περίπτωση αυτή. Οι σχεδιασμοί που αποσκοπούν στη βελτιστοποίηση μιας διεργασίας χρησιμοποιούν κυρίως τη μεθοδολογία των επιφανειών απόκρισης (response surface methodology – RSM). Στόχος των σχεδιασμών αυτών είναι η χαρτογράφηση των τιμών των αποκρίσεων σε σχέση με τις τιμές των παραγόντων, ώστε να είναι εφικτός ο καθορισμός των κατάλληλων τιμών των παραγόντων που οδηγούν στη βελτιστοποίηση των αποκρίσεων.

A.3.5. Παραγοντικοί σχεδιασμοί^{18,24,29,30}

Γενικά

Στους παραγοντικούς σχεδιασμούς μελετάται η επίδραση των παραγόντων στις αποκρίσεις μέσω της ταυτόχρονης και ανεξάρτητης μεταβολής των τιμών των παραγόντων στα πειράματα. Η βασική διαφορά με τις κλασικές τεχνικές πειραματισμού, είναι ότι δεν μεταβάλλεται ένας παράγοντας κάθε φορά αλλά σχεδιάζεται ένα σύνολο πειραμάτων στα οποία οι παράγοντες μεταβάλλονται σύμφωνα με έναν ορισμένο τρόπο. Οι παραγοντικοί σχεδιασμοί επιτρέπουν τη χρήση στατιστικής, τόσο στη σχεδίαση των πειραμάτων, όσο και κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων τους. Ακόμα επιτρέπει τον προσδιορισμό των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των παραγόντων.

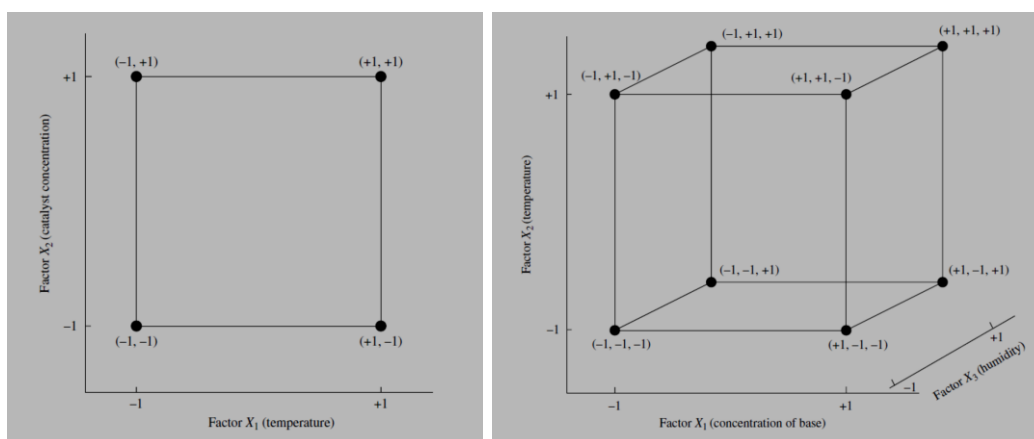
Τα επίπεδα των παραγόντων συμβολίζονται συνήθως με (-) για το χαμηλό επίπεδο και με (+) για το υψηλό επίπεδο. Είναι σύνηθες οι κωδικοποιημένες

τιμές -1 και +1 να χρησιμοποιούνται ως χαμηλό και υψηλό επίπεδο, αντίστοιχα για τους παράγοντες αντί των πραγματικών τιμών. Με αυτόν τον τρόπο κατά τον υπολογισμό των επιδράσεων και την εύρεση μαθηματικών μοντέλων που περιγράφουν τον πειραματικό σχεδιασμό, οι επιδράσεις των παραγόντων είναι απαλλαγμένες από την επίδραση των μονάδων τους.

Οι παραγοντικοί σχεδιασμοί διακρίνονται σε δύο μεγάλες υποομάδες: τους πλήρεις παραγοντικούς σχεδιασμούς (full factorial designs) και τους κλασματικούς παραγοντικούς σχεδιασμούς (fractional factorial designs). Οι πλήρεις παραγοντικοί σχεδιασμοί περιέχουν όλους τους πιθανούς συνδυασμούς επιπέδων για τους παράγοντες που μελετώνται. Άρα ο αριθμός των πειραμάτων θα δίνεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$\text{Αριθμός Πειραμάτων} = \text{Επίπεδα}^{\text{Παράγοντες}}$$

Εάν για παράδειγμα μελετώνται 3 παράγοντες σε 2 διαφορετικά επίπεδα, ο αντίστοιχος πλήρης πειραματικός σχεδιασμός θα περιέχει 2^3 ή 8 πειράματα. Οι παραγοντικοί σχεδιασμοί και οι αντίστοιχοι σχεδιαστικοί χώροι συνήθως αναπαρίστανται με το σχήμα του τετραγώνου, εάν μελετώνται δύο παράγοντες και με το σχήμα του κύβου εάν μελετώνται τρεις με κάθε άξονα να αναπαριστά ένα παράγοντα. Ακολουθεί σχηματική αναπαράσταση δύο παραδειγμάτων πειραματικών σχεδιασμών.



Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση από δύο πλήρεις παραγοντικούς σχεδιασμούς (αριστερά ένας 2^2 και δεξιά ένας 2^3 πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός).²⁹

Υπολογισμός των κύριων επιδράσεων παραγόντων και των αλληλεπιδράσεων

Ας υποθέσουμε ότι έχουμε έναν παραγοντικό σχεδιασμό 3 παραγόντων (X_1, X_2, X_3) σε 2 επίπεδα (-1,+1). Ο πειραματικός αυτός σχεδιασμός θα αποτελεστεί από οκτώ πειράματα, τα οποία αναφέρονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 2: Τα πειράματα ενός 2^3 παραγοντικού σχεδιασμού.

Πείραμα	Παράγοντες / Αλληλεπιδράσεις							Απόκριση
	X_1	X_2	X_3	X_1X_2	X_1X_3	X_2X_3	$X_1X_2X_3$	
-	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	Y_1
a	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	Y_2
b	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	Y_3
ab	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	Y_4
c	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	Y_5
ac	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1	Y_6
bc	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	Y_7
abc	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	Y_8

Οι κύριες επιδράσεις των παραγόντων (X_1, X_2, X_3) μπορούν να υπολογιστούν εάν αφαιρεθεί από το μέσο όρο των αποκρίσεων για τις οποίες ο παράγοντας λαμβάνει την τιμή του υψηλού επιπέδου, ο μέσος όρος των αποκρίσεων για τις οποίες ο παράγοντας λαμβάνει την τιμή του χαμηλού επιπέδου. Με όμοιο τρόπο προσδιορίζεται η επίδραση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των παραγόντων. Έτσι για παράδειγμα η επίδραση του παράγοντα X_1 και της αλληλεπίδρασης X_1X_3 θα δίνονται από τους ακόλουθους τύπους:

$$D_{X_1} = \frac{Y_2+Y_4+Y_6+Y_8}{4} - \frac{Y_1+Y_3+Y_5+Y_7}{4} \quad (A20)$$

$$D_{X_1X_3} = \frac{Y_1+Y_3+Y_6+Y_8}{4} - \frac{Y_2+Y_4+Y_5+Y_7}{4} \quad (A21)$$

Με τον τρόπο αυτό μπορούν να υπολογιστούν οι τιμές των επιδράσεων όλων των παραγόντων και των μεταξύ των παραγόντων αλληλεπιδράσεων. Οι παράγοντες που η υπολογιζόμενη για αυτούς επίδραση εμφανίζει μεγαλύτερη απόλυτη τιμή είναι σημαντικότεροι ή αλλιώς επιδρούν ισχυρότερα στην μελετώμενη απόκριση. Το ίδιο κριτήριο ισχύει και για τις αλληλεπιδράσεις. Το πρόσημο της τιμής της αλληλεπίδρασης δείχνει εάν η αλληλεπίδραση είναι συνεργιστική (θετικό πρόσημο) ή ανταγωνιστική (αρνητικό πρόσημο). Η μέθοδος αυτή παρέχει ένα τρόπο για την ανίχνευση των σημαντικών παραγόντων και αλληλεπιδράσεων, αλλά είναι αρκετά υποκειμενική και δεν παρέχει αρκετές πληροφορίες για το εάν οι επιδράσεις αυτές είναι στατιστικά σημαντικές ούτε δίνει τη δυνατότητα για περαιτέρω στατιστική ανάλυση.

Στατιστική ανάλυση του πειραματικού σχεδιασμού

Ο Frank Yates (1933) ανέπτυξε μία τυποποιημένη μέθοδο επεξεργασίας των δεδομένων ενός πλήρους παραγοντικού σχεδιασμού, ώστε να είναι εφικτή η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων του πειραματικού σχεδιασμού συνδέοντας τον πειραματικό σχεδιασμό με την ανάλυση διασποράς (ANOVA).

Η μέθοδος του, εάν και απλή, περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό υπολογισμών και για αυτό δεν χρησιμοποιείται σήμερα στην πράξη. Ωστόσο η χρήση ηλεκτρονικών υπολογιστών και η ανάπτυξη στατιστικών προγραμμάτων έχει καταστήσει εύκολη τη στατιστική ανάλυση των πειραματικών δεδομένων.

Η προτιμώμενη μέθοδος για τη μελέτη των επιδράσεων των παραγόντων και των αλληλεπιδράσεων που εμφανίζουν περιλαμβάνει τη συσχέτιση των αποκρίσεων και των παραγόντων με ένα μαθηματικό μοντέλο. Στην περίπτωση του πλήρους παραγοντικού σχεδιασμού πρωτοβάθμια μοντέλα που περιλαμβάνουν όλες τις επιδράσεις και τις αλληλεπιδράσεις είναι η συνήθης επιλογή. Για παράδειγμα για έναν σχεδιασμό 2^3 το πλήρες μοντέλο που μπορεί να περιγράψει το σχεδιασμό είναι το ακόλουθο:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{123}X_1X_2X_3 + \varepsilon \quad (A22)$$

Σε αυτήν τη μαθηματική εξίσωση οι παράγοντες X_1 , X_2 , X_3 λαμβάνουν τις κωδικοποιημένες τιμές +1 και -1 ανάλογα με το πείραμα. Οι συντελεστές της μέσης τιμής (b_0), των παραγόντων (b_1, b_2, b_3) και των αλληλεπιδράσεων ($b_{12}, b_{13}, b_{23}, b_{123}$) μπορούν να υπολογιστούν με πολλαπλή γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης. Η σύγκριση των συντελεστών αυτών κατά απόλυτη τιμή φανερώνει τη σημαντικότητα των επιδράσεων των διαφόρων παραγόντων ή αλληλεπιδράσεων. Παράγοντες που εμφανίζουν ισχυρότερη επίδραση στην απόκριση θα έχουν συντελεστές μεγαλύτερους κατά απόλυτη τιμή. Ο παράγοντας ε αντιστοιχεί στο τυχαίο πειραματικό σφάλμα το οποίο μπορεί να

υπολογιστεί με επαναλήψεις σε ορισμένα σημεία του πειραματικού σχεδιασμού.

Γενικότερα η εξίσωση του μαθηματικού μοντέλου που περιγράφει έναν πλήρη παραγοντικό σχεδιασμό έχει την ακόλουθη μορφή:

$$Y = b_0 + \sum_{j=1}^k b_j X_j + \sum_{j=1}^k \sum_{i<j} b_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (\text{A22})$$

Πρέπει να σημειωθεί ότι εάν ο πειραματικός σχεδιασμός περιλαμβάνει τόσα πειράματα, όσοι και οι συντελεστές που υπάρχουν στο μαθηματικό μοντέλο δεν μπορεί να ελεγχθεί η καλή ή όχι προσαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα (model's lack of fit) και δεν μπορεί να γίνει στατιστικός έλεγχος για να διαπιστωθεί εάν η μεταβλητότητα στην απόκριση οφείλεται στη μεταβολή της τιμής του παράγοντα ή σε πειραματικό σφάλμα (estimation of experimental error).

Η εκτίμηση της καλής προσαρμογής του μοντέλου και ο υπολογισμός του πειραματικού σφάλματος γίνεται με προσθήκη νέων πειραματικών σημείων ή με επανάληψη κάποιων από τα πειράματα που ήδη έγιναν.

ΜΕΡΟΣ Β: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο B.1. Ανάπτυξη της αναλυτικής μεθόδου

B.1.1. Σκοπός της μελέτης

Η παρούσα εργασία αποσκοπεί στην ανάπτυξη και την επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου για τη μελέτη της κινητικής αποικοδόμησης των συμπλόκων σακχαρούχου σιδήρου σε τελικά σκευάσματα σακχαρούχου σιδήρου που προορίζονται για παρεντερική χορήγηση.

Η κύρια χρήση αυτής της αναλυτικής μεθόδου είναι ως εργαλείο ελέγχου ποιότητας με σκοπό την απόδειξη της ισοδυναμίας μεταξύ διαφορετικών παρτίδων του σκευάσματος και τη διασφάλιση της ποιότητας και της απουσίας μεταβλητότητας κατά την παραγωγική διαδικασία.

Η αναλυτική αυτή μέθοδος δεν επαρκεί για την απόδειξη της βιοϊσοδυναμίας-βιοομοιότητας δύο διαφορετικών σκευασμάτων σακχαρούχου σιδήρου στο άνθρωπο, καθώς αποτελεί έναν *in-vitro* έλεγχο και δεν μπορεί να εξομοιώσει την πολυπλοκότητα του ανθρώπινου βιολογικού περιβάλλοντος. Ωστόσο, είναι κατάλληλη για να παράσχει μία αρχική ένδειξη σχετικά με την ισοδυναμία ή μη δύο διαφορετικών σκευασμάτων ως προς την κινητική αποικοδόμησης των συμπλόκων σακχαρούχου σιδήρου και κατ' επέκταση της σταθερότητάς τους.

Επιπλέον στόχος της εργασίας αυτής είναι η χρήση τεχνικών πειραματικού σχεδιασμού για τη μελέτη της επίδρασης των διαφόρων πειραματικών παραγόντων και τυχόν αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους στο αναλυτικό αποτέλεσμα. Αυτό αποσκοπεί στη βαθύτερη κατανόηση της αναλυτικής μεθόδου και στην εξέταση της ανθεκτικότητάς της με τη διενέργεια μικρών και ελεγχόμενων μεταβολών στους διάφορους πειραματικούς παράγοντες.

Τέλος, στην εργασία αυτή επιχειρείται και η μελέτη και η ερμηνεία της χημικής αντίδρασης της οποίας μελετάται η κινητική, καθώς και εξηγείται γιατί η παρούσα αναλυτική μέθοδος είναι κατάλληλη για τους σκοπούς για τους οποίους προορίζεται.

B.1.2 Ανάπτυξη της μεθόδου – Οι κυριότερες δοκιμές

Κατά την ανάπτυξη της αναλυτικής μεθόδου πραγματοποιήθηκαν συνοπτικά οι ακόλουθες δοκιμές:

A. Σχετικά με τη μελετώμενη χημική αντίδραση

Εξετάστηκε η κινητική αποικοδόμησης των συμπλόκων σακχαρούχου σιδήρου με αντίδραση οξειδοαναγωγής παρουσία ενός διαλύματος ασκορβικού οξέος (που περιείχε και φωσφορικό οξύ, μονόξινο φωσφορικό νάτριο, κιτρικό οξύ, θειικό σίδηρο και σορβιτόλη), καθώς και η αποικοδόμηση των συμπλόκων σακχαρούχου σιδήρου σε όξινο περιβάλλον με διάλυμα υδροχλωρικού οξέος. Ωστόσο, κυρίως για λόγους γραμμικότητας και επαναληψιμότητας επιλέχθηκε η μελέτη της κινητικής παρουσία διαλύματος υδροχλωρικού οξέος 0,75 M. Στην παράγραφο B.1.6 επεξηγείται αναλυτικότερα η επιλογή αυτή.

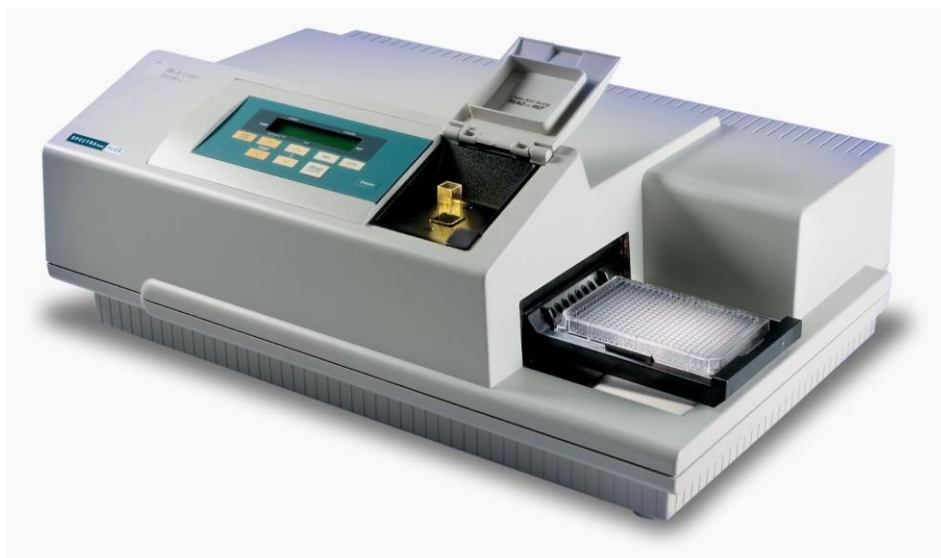
B. Σχετικά με τις παραμέτρους του φασματοφωτομέτρου

Οι βασικές παράμετροι του φασματοφωτομέτρου που απαιτούσαν ρύθμιση ήταν η θερμοκρασία της μικροπλάκας, το μήκος κύματος, η διάρκεια καταγραφής της απορρόφησης και το χρονικό διάστημα που λαμβάνει τιμές απορρόφησης το όργανο. Η θερμοκρασία ορίστηκε στους 37 °C καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Το μήκος κύματος ορίστηκε να είναι σταθερό στα 450 nm, καθώς στο μήκος κύματος αυτό απορροφά ισχυρά το σύμπλοκο του σακχαρούχου σιδήρου και η απορρόφηση μειώνεται όταν αυτό αποδιατάσσεται. Η διάρκεια καταγραφής της απορρόφησης ορίστηκε ώστε το χρονικό διάστημα να είναι αρκετό για την ολοκλήρωση της αντίδρασης που μελετάται, στις 2 ώρες για το υδροχλωρικό οξύ και στα 40 min για το διάλυμα ασκορβικού οξέος. Όσο αφορά το χρονικό διάστημα για την καταγραφή της απορρόφησης από το φασματοφωτόμετρο αρχικά επιλέχθηκε να λαμβάνεται η απορρόφηση κάθε 10 s ενώ στη συνέχεια επιλέχθηκε να λαμβάνεται η απορρόφηση κάθε 30 s, καθώς τα δεδομένα ήταν επαρκή για την δημιουργία της καμπύλης της απορρόφησης και την ανάλυση παλινδρόμησης.

B.1.3 Πειραματική διαδικασία – Υπολογισμοί

Πειραματική διαδικασία

Οργανολογία	<p><u>Molecular Devices Spectra MAX Plus Microplate Reader</u> Φασματοφωτόμετρο που επιτρέπει την ταχεία μέτρηση της απορρόφησης σε ορισμένα μήκη κύματος σε λειτουργία κινητικής (kinetic mode) σε κυψελίδες ή σε μικροπλάκες 96-θέσεων. Κατά τη χρήση μικροπλακών 96-θέσεων επιτρέπει την ταυτόχρονη μέτρηση της απορρόφησης στις θέσεις που έχουν προεπιλεγεί. Διαθέτει ακόμα σύστημα ρύθμισης της θερμοκρασίας ώστε να διατηρείται η ίδια θερμοκρασία κατά τη διάρκεια του πειράματος της κινητικής. Βαθμονομείται όπως τα κλασικά φασματοφωτόμετρα για ακρίβεια στην απορρόφηση, πιστότητα, σταθερότητα και ακρίβεια μήκους κύματος και ύπαρξη παράσιτου φωτός (stray light). Ακόμα βαθμονομείται και το σύστημα ρύθμισης της θερμοκρασίας. Το φασματοφωτόμετρο έχει δυνατότητα ρύθμισης των ακόλουθων παραγόντων.</p> <p>Θερμοκρασία: 15 – 45 °C Μήκος κύματος: 190 – 1000 nm Ακολουθεί η εικόνα 8 με τη φωτογραφία του οργάνου.</p> <p><u>Grand Bio, PHMP Thermo-Shaker for Microplates</u> Επωαστήρας που δύναται να αναδεύει δύο μικροπλάκες 96-θέσεων. Επιτρέπει τη ρύθμιση της θερμοκρασίας και τη σύγχρονη ανάδευση των δειγμάτων.</p> <p>Στροφές ανά λεπτό: 250 – 600 rpm Θερμοκρασία: 25 – 60 °C</p>
--------------------	--



Εικόνα 8: Φωτογραφία που εικονίζει το φασματοφωτόμετρο Molecular Devices Spectra MAX Plus Microplate Reader.

Πιπέτες	<p>Πολυκάναλη πιπέτα 12-καναλιών 5-50 μL Thermo Labsystems Finnpipette 4510</p> <p>Πολυκάναλη πιπέτα 8-καναλιών 50-300 μL Thermo Labsystems Finnpipette 4510</p>
----------------	--

Αντιδραστήρια	<p>Απιονισμένο Ύδωρ</p> <p>Υδροχλωρικό Οξύ (HCl) 36%, 11,65 M (Fisher, Analytical Reagent Grade)</p>
----------------------	--

Σκεύασμα αναφοράς	<p>Reference, 100 mg Fe(III) / 5 mL</p> <p>Πρωτότυπο σκεύασμα σακχαρούχου σιδήρου.</p>
--------------------------	--

Σκεύασμα ελέγχου	<p>Test, 100 mg Fe(III) / 5 mL</p> <p>Γενόσημο σκεύασμα σακχαρούχου σιδήρου.</p>
-------------------------	--

<p>Διάλυμα υδροχλωρικού οξέος 0.75 M (Διάλυμα 1)</p>	<p>Μεταφέρονται 16,1 mL πυκνού υδροχλωρικού οξέος σε μια ογκομετρική φιάλη των 250,0 mL που περιέχει μικρή ποσότητα απιονισμένου ύδατος. Αναδεύεται και αραιώνεται μέχρι χαραγής με απιονισμένο νερό</p> <p>Σημείωση: Ο απαιτούμενος όγκος πυκνού υδροχλωρικού οξέος μπορεί να τροποποιηθεί ανάλογα με την ακριβή περιεκτικότητα του υδροχλωρικού οξέος.</p>
---	---

<p>Διάλυμα παρακαταθήκης σακχαρούχου σιδήρου (Διάλυμα 2)</p>	<p>Μεταφέρονται 2,0 mL του τελικού προϊόντος σε μια ογκομετρική φιάλη των 20,0 mL. Αναμειγνύεται με απιονισμένο νερό και συμπληρώνεται μέχρι χαραγής.</p>
---	---

<p>Διάλυμα ελέγχου / Πείραμα κινητικής</p>	<p>Μεταφέρονται 350 μL του διαλύματος 1 και 12 μL του διαλύματος 2 σε διαφορετικές θέσεις σε μια μικροπλάκα 96-θέσεων. Επωάζεται η μικροπλάκα στους $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ για 10 min και αναδεύεται συγχρόνως με ταχύτητα 250 rpm. Μετά προστίθενται 300 μL του προθερμασμένου στους $37 ^\circ\text{C}$ διαλύματος 1 σε κάθε θέση που έχουν τοποθετηθεί τα 12 μL του διαλύματος 2. Αναδεύεται στον επωαστήρα στις 250 rpm για 30 s, και τοποθετείται αμέσως η μικροπλάκα στο φασματοφωτόμετρο, ώστε να ξεκινήσει η μέτρηση της απορρόφησης σε μήκος κύματος 450 nm και να καταγραφεί η αρχική απορρόφηση A_0. Ρυθμίζεται κατάλληλα το όργανο ώστε να λαμβάνει μετρήσεις της απορρόφησης κάθε 30 s για το χρονικό διάστημα των 120 min. Η θερμοκρασία του οργάνου πρέπει να είναι ρυθμισμένη σταθερά στους $37 ^\circ\text{C}$ κατά τη διάρκεια των μετρήσεων (και περίπου 1 ώρα πριν τη χρήση).</p>
---	--

Υπολογισμοί

1. Πρωτοταξική κινητική – σταθερά k_{obs}

Η μελετώμενη αντίδραση εμφανίζει ψευδοπρωτοταξική κινητική και για την μελέτη της κινητικής είναι απαραίτητο να υπολογιστεί η ψευδοπρωτοταξική σταθερά (k_{obs}) μέσω γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης στην ακόλουθη εξίσωση:

$$\log \left[\frac{A_t - A_\infty}{A_0 - A_\infty} \right] = -\frac{k_{obs}}{2,303} t \quad (B1)$$

Όπου η πρωτοταξική σταθερά θα ισούται με

$$k_{obs} = -2,303 \times slope \quad (B2)$$

Στην προηγούμενη εξίσωση ο όρος A_0 αντιστοιχεί στην αρχική απορρόφηση (που μετράται σε χρόνο μηδέν), ο όρος A_t στη μετρούμενη απορρόφηση σε κάθε χρόνο t και ο A_∞ στην απορρόφηση που μετράται για $t = 120 \text{ min}$.

Η καμπύλη παλινδρόμησης (B1) αφορά το χρονικό διάστημα 0 - 90 min, καθώς μετά από το χρονικό διάστημα αυτό η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί και δεν παρατηρείται η ψευδοπρωτοταξική κινητική. Η καμπύλη αυτή θα πρέπει να είναι γραμμική.

Για να είναι αποδεκτή η γραμμικότητα της εξίσωσης θα πρέπει ο συντελεστής συσχέτισης r να είναι μεγαλύτερος από 0,99.

2. Ποσοστό του συμπλοκοποιημένου σιδήρου

Το ποσοστό του συμπλοκοποιημένου σιδήρου Fe(III) που βρίσκεται κάθε στιγμή στο διάλυμα θα δίνεται από την εξίσωση:

$$\% Fe (III) = \frac{A_t - A_\infty}{A_0 - A_\infty} \times 100 \quad (B3)$$

3. Χρόνος ή χρονικό διάστημα T_{75}

Αντιστοιχεί στο χρόνο στον οποίο τουλάχιστον το 75 % του σιδήρου έχει αποδεσμευτεί από το σύμπλοκο του σακχαρούχου σιδήρου, που σημαίνει ότι απομένει το πολύ το 25 % σίδηρος με την μορφή του σακχαρούχου σιδήρου. Ο χρόνος T_{75} υπολογίζεται από τα πειραματικά δεδομένα με την προηγούμενη εξίσωση (B3).

Στο παράρτημα παρατίθενται ενδεικτικά για ένα πείραμα κινητικής, πίνακες με τα πειραματικά δεδομένα και η καμπύλη παλινδρόμησης.

B.1.4. Έλεγχος ισοδυναμίας³¹⁻³⁸

Ο έλεγχος της ισοδυναμίας (equivalence testing) γίνεται με έλεγχο των παραμέτρων k_{obs} και T_{75} του σκευάσματος αναφοράς και του σκευάσματος ελέγχου μέσω μιας διπλής δοκιμασίας t ενός άκρου (Two one-sided t -test, TOST).

Μαθηματικά η υπόθεση της ισοδυναμίας των παραμέτρων k_{obs} και T_{75} του δείγματος αναφοράς και του δείγματος ελέγχου στατιστικά μπορεί να γραφτεί με τις παρακάτω στατιστικές υποθέσεις.

1) Μηδενική υπόθεση ή υπόθεση ανισοδυναμίας.

$$H_0: \frac{\mu_T}{\mu_R} \leq \delta_L \text{ ή } \frac{\mu_T}{\mu_R} \geq \delta_U \quad (B4)$$

2) Εναλλακτική υπόθεση ή υπόθεση ισοδυναμίας.

$$H_a: \delta_L < \frac{\mu_T}{\mu_R} < \delta_U \quad (B5)$$

Στις προηγούμενες σχέσεις B4 και B5, οι τιμές μ_T και μ_R αντιστοιχούν στις μέσες τιμές των παραμέτρων του σκευάσματος ελέγχου και του σκευάσματος αναφοράς, αντίστοιχα και οι τιμές δ_L και δ_U στο ανώτερο και κατώτερο όριο αντίστοιχα που μπορεί να λάβει ο λόγος αυτός. Ο έλεγχος των υποθέσεων αυτών γίνεται με δύο δοκιμασίες t -test ενός άκρου ή ισοδύναμα με την κατασκευή του διαστήματος εμπιστοσύνης για τον λόγο μ_T/μ_R με βάση την κατανομή Student και τον έλεγχο για το εάν το διάστημα αυτό βρίσκεται εντός του διαστήματος (δ_L , δ_U). Στον συγκεκριμένο έλεγχο η κατώτερη τιμή και η ανώτερη τιμή για τον λόγο των παραμέτρων ορίζεται ότι πρέπει να είναι 80 % και 120 %.

Η χρήση της διπλής δοκιμασίας t ενός άκρου (TOST) προτάθηκε από τους Schuirman και Westlake, για την απόδειξη της ισοδυναμίας της βιοδιαθεσιμότητας μεταξύ ενός σκευάσματος αναφοράς και ενός σκευάσματος ελέγχου (βιοϊσοδυναμία).^{33, 34} Έκτοτε η χρήση του στατιστικού αυτού ελέγχου βρίσκει ευρύτερη εφαρμογή στις βιοεπιπτώσεις.

Η βασική διαφορά της δοκιμασίας αυτής με τη χρήση ενός απλού t -test έγκειται στο ότι δεν ελέγχεται απλώς εάν οι μέσοι όροι των δύο κατανομών διαφέρουν σημαντικά, αλλά ελέγχεται και εάν ο λόγος τους ή η διαφορά τους βρίσκεται εντός αποδεκτών ορίων μεταβλητότητας.

Αναλυτικότερα ο έλεγχος ισοδυναμίας στην παρούσα μελέτη, γίνεται με την ακόλουθη διαδικασία:

Το πείραμα κινητικής εκτελείται για 10 επαναλήψεις, τόσο για το σκεύασμα αναφοράς, όσο και για το σκεύασμα ελέγχου. Τα διαλύματα αυτά τοποθετούνται στην ίδια μικροπλάκα και κατόπιν προσδιορίζονται οι τιμές T_{75} και k_{obs} για κάθε επανάληψη. Ο έλεγχος ισοδυναμίας πραγματοποιείται με διπλή δοκιμασία t ενός άκρου (two one sided t -test) σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία.

1. Όρια ισοδυναμίας

Ο έλεγχος ισοδυναμίας ελέγχει εάν το διάστημα εμπιστοσύνης που προκύπτει για τον λόγο των παραμέτρων που αντιστοιχούν στο σκεύασμα ελέγχου προς το σκεύασμα αναφοράς βρίσκεται εντός ορισμένων ορίων. Το χαμηλότερο και το υψηλότερο όριο εντός των οποίων θα πρέπει να βρίσκεται το διάστημα εμπιστοσύνης είναι 0,80 και 1,20 αντίστοιχα.

2. Υπολογισμός του διαστήματος εμπιστοσύνης

Η συνδιακύμανση (S_{12}) μεταξύ των τιμών του δείγματος ελέγχου (X) και των τιμών του δείγματος αναφοράς (Y) υπολογίζεται από την ακόλουθη σχέση:

$$S_{12} = \left[\left(\sum_{i=1}^n X_i Y_i \right) - n \bar{X} \bar{Y} \right] / (n - 1) \quad (B6)$$

Όπου

X_i	Αντιστοιχεί στην i παρατήρηση για το σκεύασμα ελέγχου
Y_i	Αντιστοιχεί στην i παρατήρηση για το σκεύασμα αναφοράς
\bar{X}	Η μέση τιμή των παρατηρήσεων για το σκεύασμα ελέγχου
\bar{Y}	Η μέση τιμή των παρατηρήσεων για το σκεύασμα αναφοράς
n	Ο αριθμός των ζευγών των παρατηρήσεων

Το διάστημα εμπιστοσύνης (CI – confidence interval) για το λόγο των παραμέτρων υπολογίζεται με βάση τις ακόλουθες μαθηματικές σχέσεις που υπολογίζουν το κατώτερο (ρ_L) και το ανώτερο όριο (ρ_U) του διαστήματος εμπιστοσύνης.

$$\rho_L = \frac{(\bar{X}\bar{Y} - t_{1-\alpha, v}^2 S_{12}/n) - \sqrt{(\bar{X}\bar{Y} - t_{1-\alpha, v}^2 S_{12}/n)^2 - (\bar{X}^2 - t_{1-\alpha, v}^2 S_1^2/n)(\bar{Y}^2 - t_{1-\alpha, v}^2 S_2^2/n)}}{(\bar{Y}^2 - t_{1-\alpha, v}^2 S_2^2/n)} \quad (B7)$$

$$\rho_U = \frac{(\bar{X}\bar{Y} - t_{1-\alpha, v}^2 S_{12}/n) + \sqrt{(\bar{X}\bar{Y} - t_{1-\alpha, v}^2 S_{12}/n)^2 - (\bar{X}^2 - t_{1-\alpha, v}^2 S_1^2/n)(\bar{Y}^2 - t_{1-\alpha, v}^2 S_2^2/n)}}{(\bar{Y}^2 - t_{1-\alpha, v}^2 S_2^2/n)} \quad (B8)$$

Όπου

\bar{X}	Η μέση τιμή των παρατηρήσεων για το σκεύασμα ελέγχου
\bar{Y}	Η μέση τιμή των παρατηρήσεων για το σκεύασμα αναφοράς
S_1	Η τυπική απόκλιση των παρατηρήσεων για το σκεύασμα ελέγχου
S_2	Η τυπική απόκλιση των παρατηρήσεων για το σκεύασμα αναφοράς
S_{12}	Η συνδιακύμανση μεταξύ των παρατηρήσεων για το σκεύασμα ελέγχου και το σκεύασμα αναφοράς
n	Ο αριθμός των ζευγών των παρατηρήσεων
v	Οι βαθμοί ελευθερίας $v = n - 1$
α	Η στάθμη εμπιστοσύνης για τον έλεγχο ισοδυναμίας ($\alpha = 0,05$)
$t_{1-\alpha, v}$	Η άνω $1 - \alpha$ κρίσιμη τιμή της κατανομής Student για v βαθμούς ελευθερίας

3. Κριτήριο ισοδυναμίας

Εάν το διάστημα (ρ_L, ρ_U) βρίσκεται εξ' ολοκλήρου εντός του διαστήματος $(0,80, 1,20)$ τότε το σκεύασμα αναφοράς θεωρείται ισοδύναμο με το σκεύασμα ελέγχου.

B.1.5. Στοιχεία πρωτοτυπίας της αναλυτικής μεθόδου ³⁹⁻⁴³

Η παρούσα αναλυτική μέθοδος στηρίζεται σε μελέτες κινητικής του σκευάσματος σακχαρούχου σιδήρου, όπως περιγράφονται στη βιβλιογραφία και ιδίως στα δύο διπλώματα ευρεσιτεχνίας US 8,058,076 B2 In-Vitro Method For Testing Bioequivalence Of Iron-Sucrose Formulation και US 7,169,359 B2 Bioequivalence Test For Iron-Containing Formulations. ^{39,40} Ωστόσο η παρούσα αναλυτική μέθοδος περιλαμβάνει τροποποιήσεις και στοιχεία πρωτοτυπίας που τη διακρίνουν από τις άλλες αναλυτικές τεχνικές. Αυτά συνοψίζονται κυρίως στα ακόλουθα σημεία:

- i. Για τη μελέτη της κινητικής εκτός από την παράμετρο T_{75} αξιολογήθηκε και η ψευδοπρωτοταξική σταθερά k_{obs} , καθώς και η γραμμικότητα της καμπύλης παλινδρόμησης που δείχνει ότι η κινητική που παρατηρείται είναι πρώτης τάξης.
- ii. Η αξιολόγηση της ισοδυναμίας μεταξύ του σκευάσματος αναφοράς και του σκευάσματος ελέγχου γίνεται μέσω ενός στατιστικού ελέγχου, με τη χρήση διπλής δοκιμασίας t ενός άκρου (two one sided t-test – TOST) για τις παραμέτρους T_{75} και k_{obs} . Στα διπλώματα ευρεσιτεχνίας η αξιολόγηση της ισοδυναμίας γίνεται θέτοντας ένα αποδεκτό χρονικό διάστημα για την παράμετρο T_{75} (25 – 50 min).
- iii. Αντί ενός συμβατικού φασματοφωτομέτρου χρησιμοποιήθηκε ένα φασματοφωτόμετρο (microplate reader) με σύστημα θερμορύθμισης και τη δυνατότητα να μετρά απορροφήσεις σε πολλαπλές θέσεις συγχρόνως σε μια μικροπλάκα 96-θέσεων. Το γεγονός αυτό ήταν καθοριστικό ώστε η αναλυτική μέθοδος να είναι ταχεία και να παρέχει αξιόπιστα αποτελέσματα.

B.1.6. Διερεύνηση της διεργασίας – Ερμηνεία της χημικής αντίδρασης

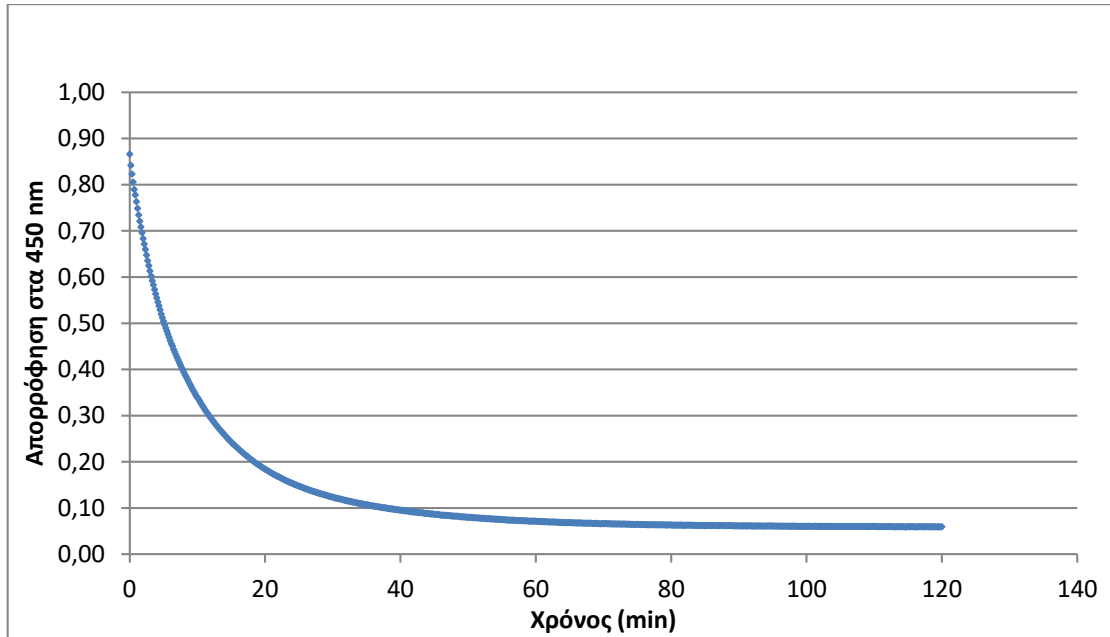
39-43

Στα πλαίσια της ανάπτυξης της παρούσας αναλυτικής μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν διάφορα αντιδραστήρια για τη μελέτη της κινητικής της αποικοδόμησης των συμπλόκων του σακχαρούχου σιδήρου. Βιβλιογραφικά, η μελέτη της κινητικής της διάσπασης των συμπλόκων σακχαρούχου σιδήρου πραγματοποιείται με μεθόδους, όπου εξετάζεται η αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου σε δισθενή παρουσία ενός αναγωγικού παράγοντα με κυριότερο το ασκορβικό οξύ ή η αποικοδόμηση του συμπλόκου παρουσία ενός ισχυρού ανόργανου οξέος (όπως το υδροχλωρικό, το νιτρικό ή το φωσφορικό οξύ). Ακολουθούν οι εξισώσεις των χημικών αντιδράσεων για την αντίδραση με το ασκορβικό οξύ και με το υδροχλωρικό οξύ (με P και L συμβολίζονται τα μόρια υδατάνθρακα που υπάρχουν στα σύμπλοκα).^{40, 43}

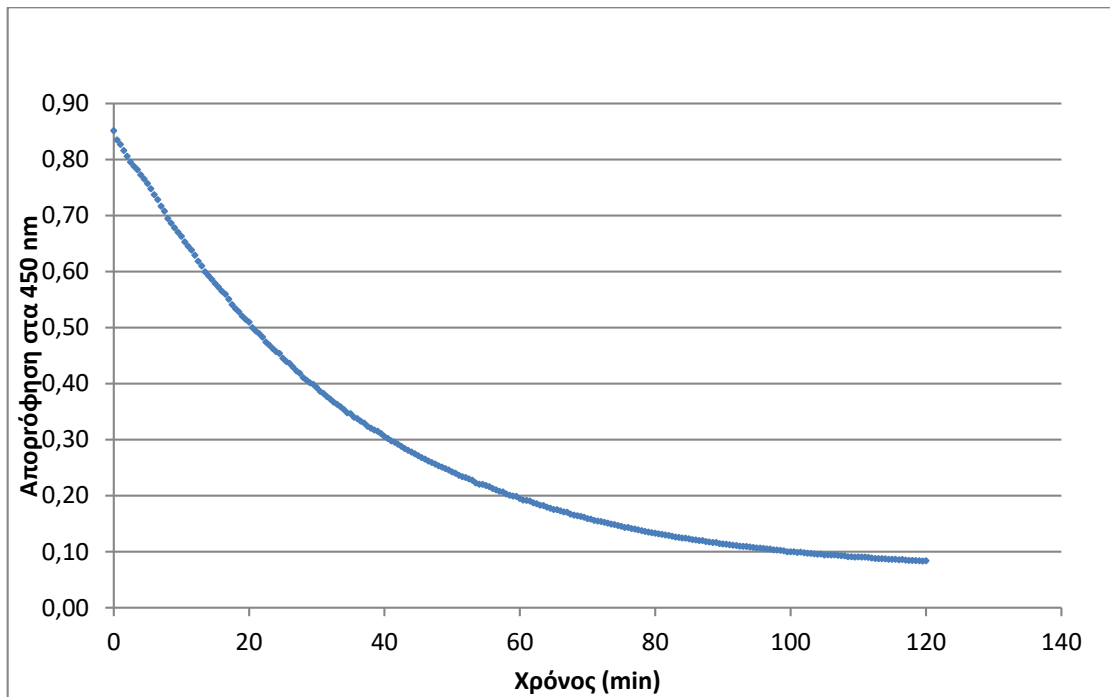


Κατά την αποικοδόμηση του συμπλόκου το διάλυμα αποχρωματίζεται και γίνεται τελικώς διαυγές από το αρχικό έντονο καφέ χρώμα. Αυτό επιτρέπει την παρατήρηση της διάσπασης με τη μέτρηση της απορρόφησης με φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους στο μήκος κύματος 450 nm.

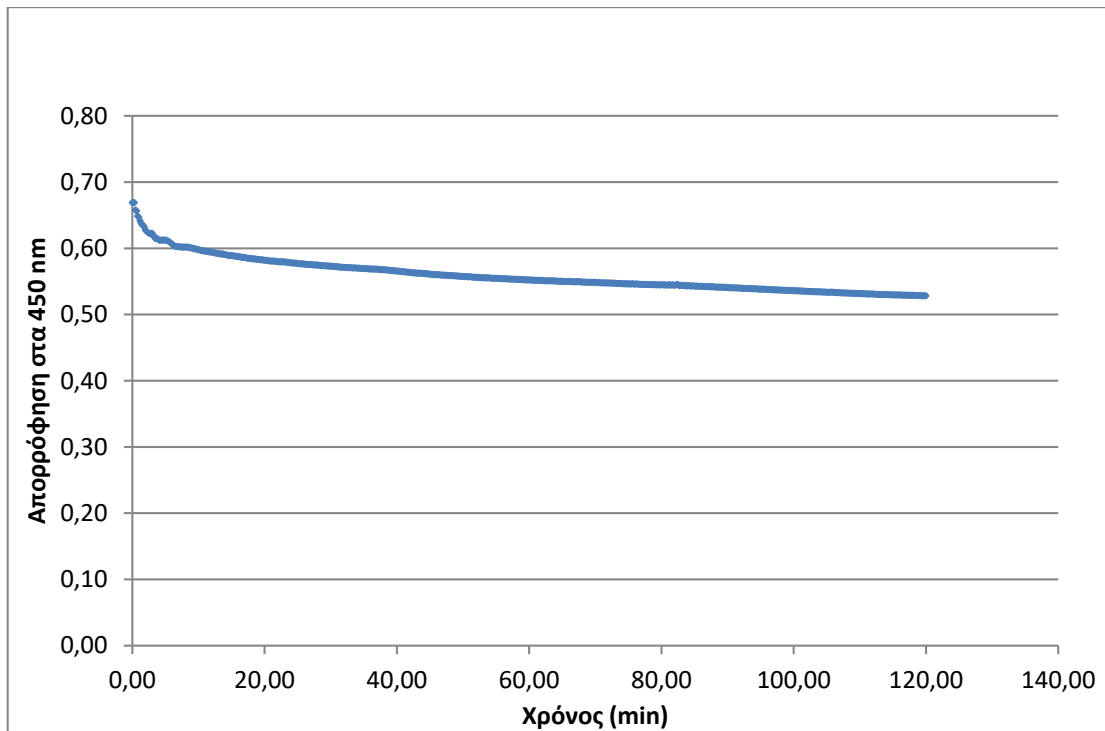
Ακολουθούν οι καμπύλες απορρόφησης συναρτήσει του χρόνου με την επίδραση των κυριότερων αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανάπτυξη της παρούσας μεθόδου. Γίνεται επίσης αναφορά στις τιμές T_{75} και k_{obs} που υπολογίστηκαν σε κάθε περίπτωση μετά από γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης. Η τιμή T_{75} αντιστοιχεί στο χρόνο στον οποίο τουλάχιστον το 75 % του σιδήρου έχει αποδεσμευτεί από το σύμπλοκο του σακχαρούχου σιδήρου και λαμβάνεται από τα πειραματικά δεδομένα χωρίς ανάλυση παλινδρόμησης υπολογίζοντας το % ποσοστό του σιδήρου που βρίσκεται στην συμπλοκοποιημένη του μορφή (εξίσωση B3). Η τιμή k_{obs} αντιστοιχεί στην ψευδοπρωτοταξική σταθερά που υπολογίζεται με γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης από την κλίση της καμπύλης παλινδρόμησης (εξισώσεις B1, B2).



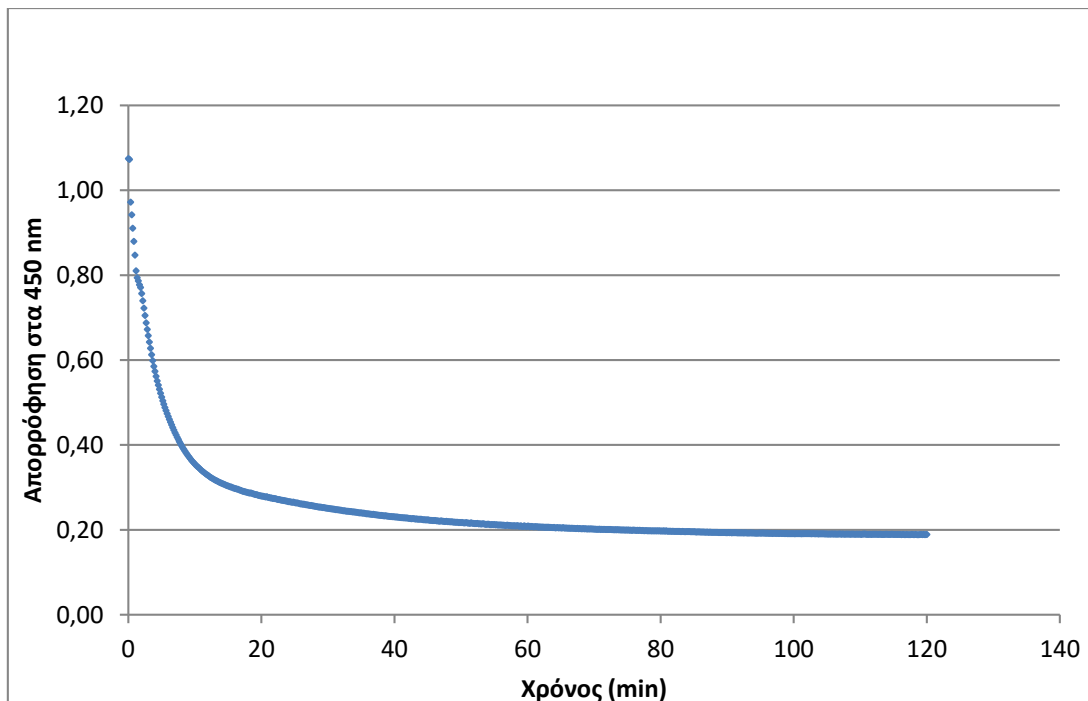
Εικόνα 9: Καμπύλη της απορρόφησης των συμπλόκων σακχαρούχου σιδήρου με την επίδραση υδατικού διαλύματος ασκορβικού οξέος 3 % w/v. Υπολογιζόμενες τιμές: $T_{75} = 14,3 \text{ min}$, $k_{\text{obs}} = 0,10 \text{ min}^{-1}$, $\nu = 4$.



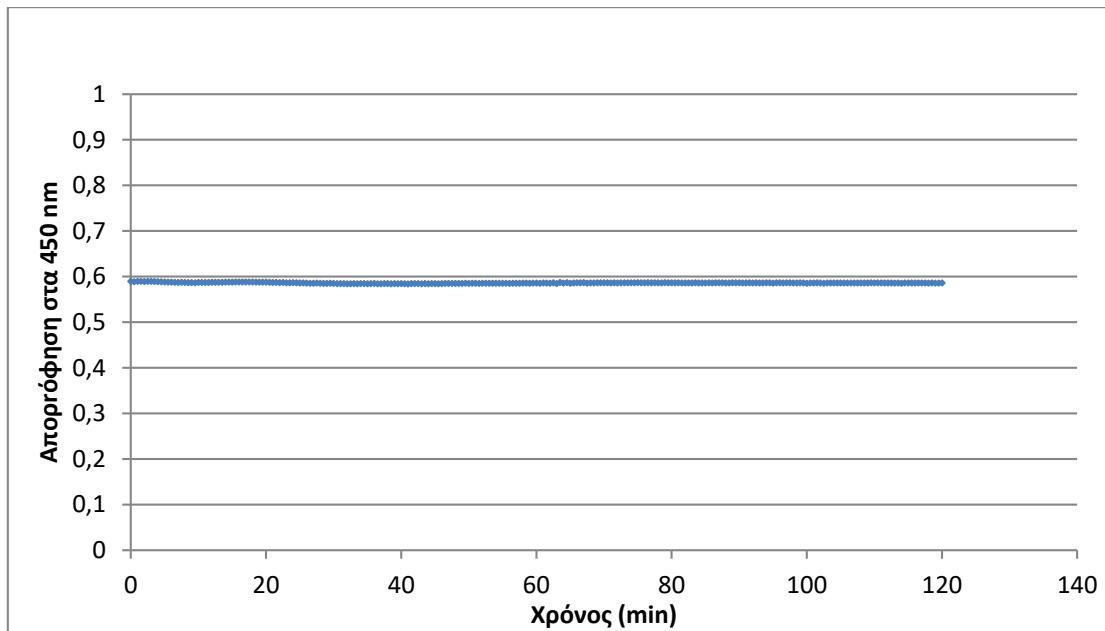
Εικόνα 10: Καμπύλη της απορρόφησης των συμπλόκων σακχαρούχου σιδήρου με την επίδραση υδροχλωρικού οξέος 0,75 M. Υπολογιζόμενες τιμές: $T_{75} = 46,3 \text{ min}$, $k_{\text{obs}} = 0,03 \text{ min}^{-1}$, $\nu = 10$.



Εικόνα 11: Καμπύλη της απορρόφησης των συμπλόκων σακχαρούχου σιδήρου με την επίδραση οξικού οξέος 0,75 M. Με την επίδραση ενός ασθενούς οξέος ($pK_a = 4,76$) παρατηρείται μόνο μερική αποικοδόμηση του συμπλόκου.



Εικόνα 12: Καμπύλη της απορρόφησης των συμπλόκων σακχαρούχου σιδήρου με την επίδραση όξινου μίγματος ασκορβικού οξέος. Εδώ παρατηρείται ταχύτερη αποικοδόμηση λόγω ταυτόχρονης οξειδοαναγωγής και όξινης διάσπασης των συμπλόκων σιδήρου.
Υπολογιζόμενες τιμές: $T_{75} = 5,0 \text{ min}$, $k_{obs} = 0,19 \text{ min}^{-1}$, $\nu = 10$.



Εικόνα 13: Καμπύλη της απορρόφησης των συμπλόκων σακχαρούχου σιδήρου με απλή αραίωση με απιονισμένο νερό. Εδώ δεν παρατηρείται αποικοδόμηση των συμπλόκων μορίων.

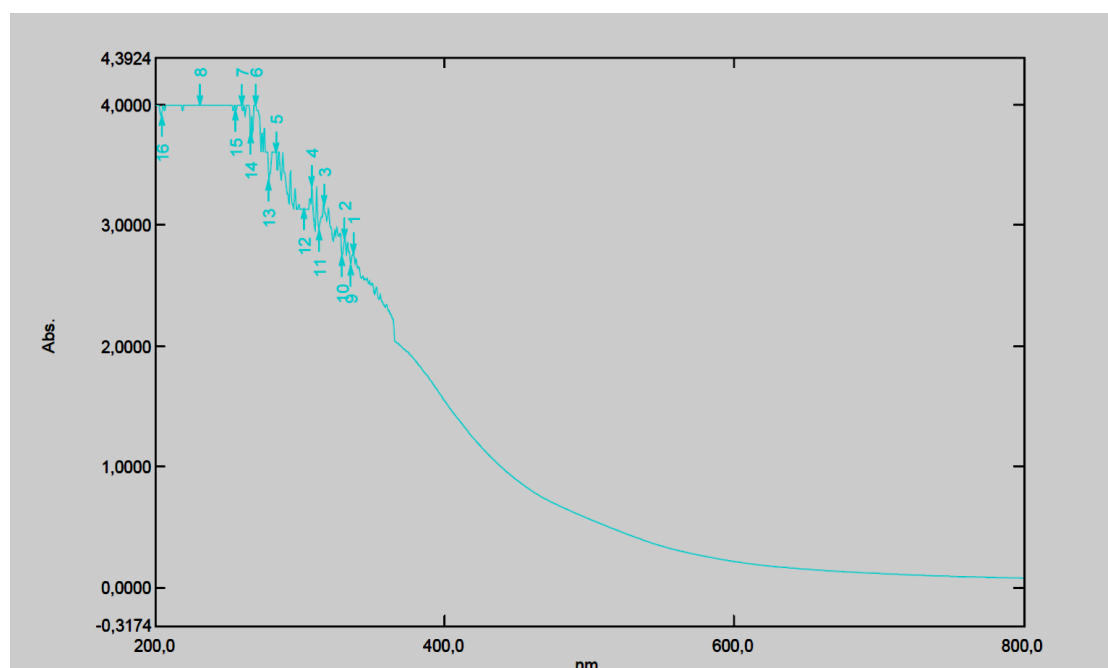
Από τις προηγούμενες αντιδράσεις για την περαιτέρω ανάπτυξη και επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου για τη μελέτη της κινητικής αποικοδόμησης των συμπλόκων σακχαρούχου σιδήρου καταλληλότερη κρίθηκε η αντίδραση με το υδροχλωρικό οξύ για τους ακόλουθους λόγους:

1. Γραμμικότητα: Η καμπύλη παλινδρόμησης της εξίσωσης B1 είναι γραμμική με συντελεστή συσχέτισης (correlation coefficient – r) πάνω από 0,99 σε απόλυτη τιμή για το ευρύ χρονικό διάστημα των 90 min.
2. Επαναληψιμότητα: Η επαναληψιμότητα είναι αρκετά ικανοποιητική στην αντίδραση με το υδροχλωρικό οξύ με το % RSD να είναι μικρότερο από 5% για τον χρόνο T_{75} και μικρότερο από 7% για τη σταθερά k_{obs} .
3. Η παρατηρούμενη αντίδραση είναι απλή, καθώς η αποικοδόμηση του συμπλόκου γίνεται μόνο με την επίδραση του υδροχλωρικού οξέος και δεν εμπλέκονται περισσότερα του ενός αντιδρώντα σώματα, γεγονός που θα περιέπλεκε τη μελέτη της κινητικής αποικοδόμησης του συμπλοκοποιημένου σιδήρου με αποτέλεσμα να υπάρχει κακή γραμμικότητα που υποδηλώνει απόκλιση από την πρωτοταξική κινητική ή και μεγάλη μεταβλητότητα στις τιμές T_{75} και k_{obs} . Για την επιβεβαίωση της υπόθεσης αυτής, δηλαδή ότι δεν υπάρχουν δευτερεύουσες αντιδράσεις που να επηρεάζουν το φαινόμενο διεξήχθησαν επιπλέον πειράματα κινητικής.

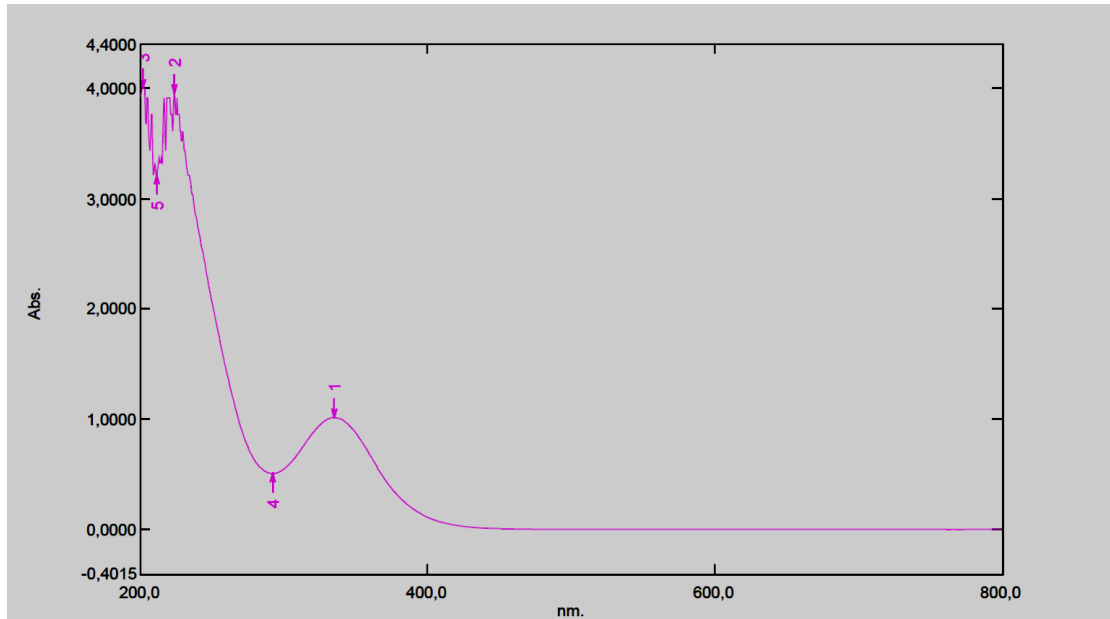
Το πυκνό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος λόγω του ισχυρά όξινου χαρακτήρα του αποσταθεροποιεί και διασπά τα σύμπλοκα μόρια του σακχαρούχου σιδήρου. Ωστόσο μια ακόμα πιθανή ερμηνεία είναι το υδροχλωρικό οξύ να διασπά τη σακχαρόζη σε γλυκόζη και φρουκτόζη που μπορούν να δρουν ως αναγωγικά σώματα και να προκαλούν την αναγωγή του τρισθενούς σε δισθενή σίδηρο. Για τη διερεύνηση της υπόθεσης αυτής πραγματοποιήθηκαν πειράματα κινητικής στα οποία χρησιμοποιήθηκε τριχλωριούχος σίδηρος αντί του σκευάσματος του σακχαρούχου σιδήρου και πραγματοποιήθηκαν πειράματα κινητικής για τα ακόλουθα διαλύματα:

- i. Διάλυμα τριχλωριούχου σιδήρου (FeCl_3) σε υδροχλωρικό οξύ (HCl) 0,75 M.
- ii. Διάλυμα τριχλωριούχου σιδήρου (FeCl_3) σε υδροχλωρικό οξύ (HCl) 0,75 M και ανάμειξη με διάλυμα σακχαρόζης.
- iii. Διάλυμα τριχλωριούχου σιδήρου (FeCl_3) σε υδροχλωρικό οξύ (HCl) 0,75 M και ανάμειξη με διάλυμα φρουκτόζης.
- iv. Διάλυμα τριχλωριούχου σιδήρου (FeCl_3) σε υδροχλωρικό οξύ (HCl) 0,75 M και ανάμειξη με διάλυμα γλυκόζης.

Μια σημαντική παρατήρηση είναι ότι το φάσμα των διαλυμάτων τριχλωριούχου σιδήρου είναι σημαντικά διαφορετικό από το φάσμα των διαλυμάτων σακχαρούχου σιδήρου. Ο τριχλωριούχος σίδηρος βρίσκεται σε όξινα υδατικά διαλύματα με τη μορφή $[\text{FeCl}_4]^-$ και παρουσιάζει ασθενές κίτρινο χρώμα και εμφανίζει μέγιστο στα 336 nm, ενώ η απορρόφηση στα 450 nm είναι ιδιαίτερα χαμηλή. Στη συνέχεια παρατίθενται τα φάσματα απορρόφησης για τα διαλύματα τριχλωριούχου σιδήρου και σακχαρούχου σιδήρου.

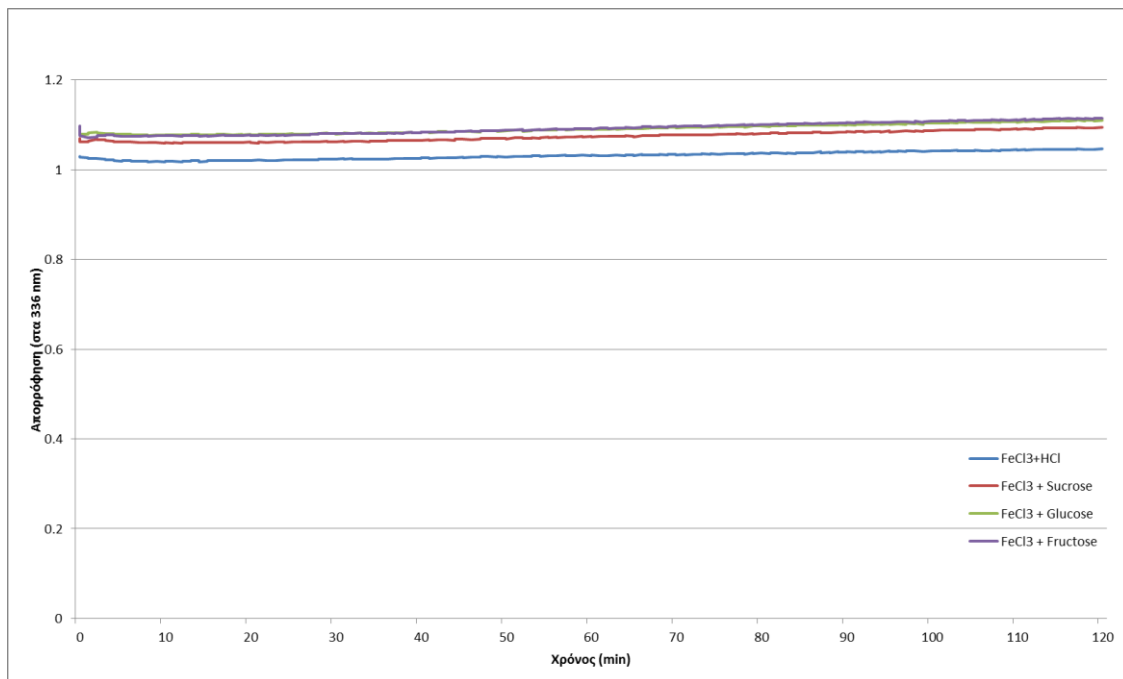


Εικόνα 14: Φάσμα απορρόφησης διαλύματος σακχαρούχου σιδήρου. Η μετρούμενη απορρόφηση για $\lambda = 450 \text{ nm}$ είναι $\text{Abs} = 0,888$, ενώ για $\lambda = 336 \text{ nm}$ είναι $\text{Abs} = 2,752$.



Εικόνα 15: Φάσμα απορρόφησης διαλύματος τριχλωριούχου σιδήρου. Η μετρούμενη απορρόφηση για $\lambda = 450 \text{ nm}$ είναι $\text{Abs} = 0,006$, ενώ εμφανίζει μέγιστο (θέση 1) για $\lambda = 336 \text{ nm}$ όπου η απορρόφηση είναι $\text{Abs} = 1,013$.

Έτσι για τη μελέτη των επιπλέον πειραμάτων κινητικής με τη χρήση τριχλωριούχου σιδήρου μετρήθηκε η απορρόφηση σε μήκος κύματος 336 nm. Ακολουθεί διάγραμμα με τις απορροφήσεις των διαλυμάτων αυτών συναρτήσει του χρόνου.



Εικόνα 16: Διάγραμμα της απορρόφησης διαλυμάτων τριχλωριούχου σιδήρου με υδροχλωρικό οξύ, σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη συναρτήσει του χρόνου.

Από το προηγούμενο διάγραμμα (εικόνα 16) παρατηρούμε ότι η απορρόφηση παραμένει σταθερή συναρτήσει του χρόνου και δεν υπάρχει αλλαγή της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του σιδήρου. Το δεδομένο αυτό αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι η διάσπαση του συμπλόκου του σακχαρούχου σιδήρου παρουσία υδροχλωρικού οξέος γίνεται λόγω του ισχυρά όξινου χαρακτήρα του οξέος και όχι λόγω κάποιας οξειδοαναγωγής διαδικασίας, αφού απουσιάζουν αναγωγικοί παράγοντες, αλλά και η ύπαρξη της σακχαρόζης και των μονομερών της δεν επιδρά πάνω στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του σιδήρου.

Κεφάλαιο Β.2. Μελέτη της επίδρασης των πειραματικών συνθηκών με τη χρήση τεχνικών πειραματικού σχεδιασμού

Β.2.1. Γενικά – Διεξαγωγή των πειραμάτων

Βασικός σκοπός του τμήματος της εργασίας αυτής είναι να μελετηθούν οι κύριες επιδράσεις και οι αλληλεπιδράσεις των κυριότερων πειραματικών παραγόντων στο αναλυτικό αποτέλεσμα με τη χρήση τεχνικών πειραματικού σχεδιασμού. Αυτό στοχεύει στην καλύτερη κατανόηση της αναλυτικής μεθόδου και της κινητικής αποικοδόμησης των συμπλόκων σακχαρούχου σιδήρου.

Με τη χρήση του πειραματικού σχεδιασμού μπορεί να μελετηθεί και η ανθεκτικότητα της μεθόδου σε μικρές και ελεγχόμενες μεταβολές των πειραματικών συνθηκών.

Ο πειραματικός σχεδιασμός που επιλέχθηκε για τη μελέτη αυτή είναι ένας πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός τριών παραγόντων σε δύο επίπεδα, δηλαδή με οκτώ συνολικά πειράματα. Αυτός ο πειραματικός σχεδιασμός είναι κατάλληλος για τη μελέτη της σημαντικότητας των επιδράσεων και την διερεύνηση τυχόν αλληλεπιδράσεων μεταξύ των παραγόντων, αλλά δεν αποσκοπεί στην πρόβλεψη των αποκρίσεων ή στη δημιουργία επιφανειών απόκρισης (response surface methodology).

Οι κυριότεροι πειραματικοί παράγοντες των οποίων θα μελετηθεί η επίδρασή τους στις αποκρίσεις είναι η θερμοκρασία, η συγκέντρωση του υδροχλωρικού οξέος, αλλά και ο αριθμός των μμολ του τρισθενούς σιδήρου που βρίσκεται στο τελικό διάλυμα ελέγχου. Οι παράγοντες αυτοί θα κυμανθούν σε δύο επίπεδα σύμφωνα με τον πίνακα 3 που ακολουθεί.

Πίνακας 3: Οι παράγοντες και οι τιμές τους στον πειραματικό σχεδιασμό

Παράγοντας	Χαμηλό Επίπεδο (-1)	Υψηλό Επίπεδο (+1)	Κανονικές πειραματικές συνθήκες
A: Θερμοκρασία (°C)	36	38	37
B: Συγκέντρωση HCl (M)	0,74	0,76	0,75
C: Ποσότητα τρισθενούς σιδήρου (μμολ)	0,39	0,47	0,43

Πίνακας 4: Τα πειράματα που αποτελούν τον παραγοντικό σχεδιασμό 2³

Πειράματα	Παράγοντας A: Θερμοκρασία	Παράγοντας B: Συγκέντρωση HCl	Παράγοντας C: Ποσότητα τρισθενούς σιδήρου
1 ^ο Πείραμα (-)	-1	-1	-1
2 ^ο Πείραμα (a)	1	-1	-1
3 ^ο Πείραμα (b)	-1	1	-1
4 ^ο Πείραμα (ab)	1	1	-1
5 ^ο Πείραμα (c)	-1	-1	1
6 ^ο Πείραμα (ac)	1	-1	1
7 ^ο Πείραμα (bc)	-1	1	1
8 ^ο Πείραμα (abc)	1	1	1

Για τα πειράματα αυτά οι μελετώμενες αποκρίσεις που επιλέχθηκαν είναι ο χρόνος T_{75} (min), όπως υπολογίζεται κατευθείαν από τα πειραματικά δεδομένα ως ο χρόνος στον οποίο τουλάχιστον το 75 % του σιδήρου έχει απελευθερωθεί από την συμπλοκοποιημένη του μορφή (εξίσωση B3) και η ψευδοπρωτοταξική σταθερά k_{obs} (min⁻¹), όπως υπολογίζεται από την κλίση της ευθείας που προκύπτει από την γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης (εξισώσεις B1 και B2). Κάθε πείραμα του πειραματικού σχεδιασμού γίνεται με τρεις επαναλήψεις τόσο για το σκεύασμα αναφοράς, όσο και για το σκεύασμα ελέγχου και ως αποτέλεσμα λαμβάνεται ο μέσος όρος των επαναλήψεων αυτών. Ακολουθεί ο πίνακας 5 που παραθέτει συνοπτικά τα αποτελέσματα του πειραματικού σχεδιασμού, την μέση τιμή, την τυπική απόκλιση των αποκρίσεων, αλλά και τη σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) για το συνολικό αριθμό των πειραμάτων. Ένα αρχικό συμπέρασμα που λαμβάνεται από τα πρώτα αυτά αποτελέσματα είναι ότι υπάρχει σημαντική μεταβλητότητα στις αποκρίσεις, καθώς το % RSD είναι μεγαλύτερο από τα όρια που έχουν τεθεί κατά την ανάπτυξη της μεθόδου του 5 % για την τιμή T_{75} και 7 % για την τιμή k_{obs} . Αναμένεται λογικά η μεταβλητότητα αυτή να ερμηνεύεται από την επίδραση κάποιου παράγοντα στην απόκριση.

Πίνακας 5: Συνοπτικός πίνακας των τιμών των αποκρίσεων για τα πειράματα του παραγοντικού σχεδιασμού

Πειράματα	Σκεύασμα αναφοράς: T ₇₅ (min)	Σκεύασμα αναφοράς: k _{obs} (min ⁻¹)	Σκεύασμα ελέγχου: T ₇₅ (min)	Σκεύασμα ελέγχου: k _{obs} (min ⁻¹)
1 ^ο Πείραμα (-)	49,0	0,0317	49,0	0,0345
2 ^ο Πείραμα (a)	42,3	0,0370	42,0	0,0417
3 ^ο Πείραμα (b)	49,0	0,0319	49,8	0,0340
4 ^ο Πείραμα (ab)	43,0	0,0369	43,7	0,0403
5 ^ο Πείραμα (c)	49,7	0,0309	51,2	0,0324
6 ^ο Πείραμα (ac)	43,5	0,0353	44,7	0,0385
7 ^ο Πείραμα (bc)	49,5	0,0316	46,7	0,0369
8 ^ο Πείραμα (abc)	41,2	0,0386	40,8	0,0439
Μέση τιμή	45,9	0,0342	46,0	0,0378
Τυπική Απόκλιση	3,7	0,0031	3,8	0,0040
% RSD	8,05	8,92	8,25	10,71

B.2.2. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων του πειραματικού σχεδιασμού

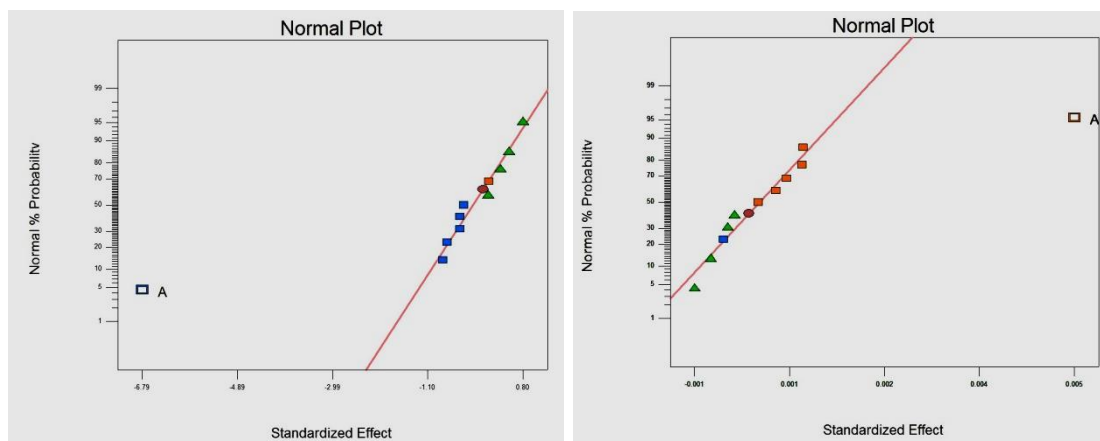
Για να εξαχθούν περισσότερα συμπεράσματα από τον πειραματικό σχεδιασμό σχετικά με τις επιδράσεις και τις αλληλεπιδράσεις των παραγόντων στις μελετώμενες αποκρίσεις απαιτείται στατιστική ανάλυση με τη βοήθεια λογισμικού. Τα αποτελέσματα που παρατίθενται στον προηγούμενο πίνακα 5 εισήχθησαν στο λογισμικό Design-Expert 7.0.0 (Stat-Ease, Inc.) για περαιτέρω επεξεργασία και ανάλυση. Για τη στατιστική ανάλυση και την εξαγωγή συμπερασμάτων αναφέρονται για συντομία δεδομένα από το σκεύασμα αναφοράς, ενώ δεν γίνεται αναφορά στα δεδομένα από το σκεύασμα ελέγχου

καθώς είναι παραπλήσια και δεν υπάρχει διαφορά στα συμπεράσματα που εξάγονται.

Η ανάλυση του πειραματικού σχεδιασμού γίνεται με τα ακόλουθα στάδια.

- 1) Εύρεση των σημαντικών παραγόντων και των σημαντικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των παραγόντων στις αποκρίσεις. Αυτό πραγματοποιείται με τη χρήση γραφικών εργαλείων, όπως διαγράμματα κανονικής πιθανότητας (normal probability plot), αλλά και διαγράμματα Pareto.

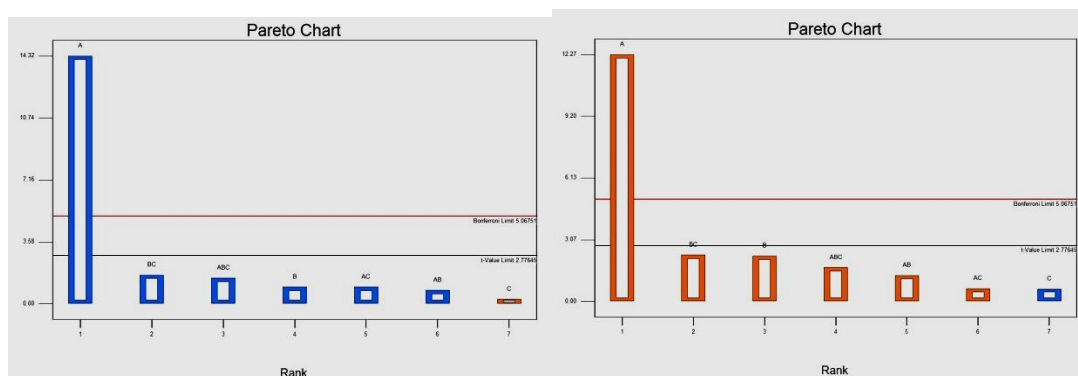
Στα διαγράμματα κανονικής πιθανότητας αξιολογείται εάν οι τιμές των κυρίων επιδράσεων και των αλληλεπιδράσεων των παραγόντων (standardized effects) σε σχέση με τις θεωρητικές τιμές ακολουθούν κανονική κατανομή. Εφόσον οι τιμές ακολουθούν κανονική κατανομή, τότε απεικονίζονται σε μία ευθεία γραμμή. Εάν κάποια τιμή εμφανίζεται να αποκλίνει από την ευθεία γραμμή (εμφανίζεται ως έκτροπη τιμή), τότε αυτή αντιστοιχεί σε στατιστικά σημαντική κύρια επίδραση ή αλληλεπίδραση. Ακολουθούν τα διαγράμματα κανονικής πιθανότητας για τις παραμέτρους T_{75} και k_{obs} , αντίστοιχα που δείχνουν ότι μόνο ο παράγοντας A που αντιστοιχεί στη θερμοκρασία ασκεί σημαντική επίδραση στις αποκρίσεις T_{75} και k_{obs} .



Εικόνα 17: Διαγράμματα κανονικής πιθανότητας (normal probability plot) για τις αποκρίσεις T_{75} (αριστερά) και k_{obs} (δεξιά). Μόνο ο παράγοντας της θερμοκρασίας (A) εμφανίζεται ως στατιστικά σημαντικός.

Τα διαγράμματα Pareto ονομάστηκαν έτσι προς τιμή του Ιταλού οικονομολόγου Vilfredo Pareto (1848-1923), ο οποίος παρατήρησε ότι το 20% του πληθυσμού της Ιταλίας κατείχε το 80% της ιδιοκτησίας της γης. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στην αρχή του Pareto (Pareto principle) ότι ένας μικρός αριθμός σημαντικών παραγόντων μπορεί να ασκεί τη μεγαλύτερη επίδραση πάνω στο

αποτελεσμα. Τα διαγράμματα αυτά απεικονίζουν τους παράγοντες με φθίνουσα σειρά σημασίας ως προς την επίδρασή τους στην απόκριση που μελετάται. Ακολουθεί η Εικόνα 18 με τα διαγράμματα Pareto για τις αποκρίσεις T_{75} και k_{obs} , όπου εμφανίζονται οι τιμές t (κατανομή Student) των κύριων επιδράσεων των παραγόντων και των αλληλεπιδράσεων. Μόνο ο παράγοντας A που αντιστοιχεί στη θερμοκρασία φαίνεται και εδώ να ασκεί σημαντική επίδραση στις αποκρίσεις T_{75} και k_{obs} .



Εικόνα 18: Διαγράμματα Pareto για τις αποκρίσεις T_{75} (αριστερά) και k_{obs} (δεξιά). Μόνο ο παράγοντας της θερμοκρασίας (A) εμφανίζεται ως στατιστικά σημαντικός.

- 2) Εύρεση του μαθηματικού μοντέλου που συνδέει τις επιδράσεις των παραγόντων και των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων με τις αποκρίσεις

Ο πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός 2^3 που περιέχει οκτώ πειραματικά σημεία μπορεί να περιγραφεί από το ακόλουθο μαθηματικό μοντέλο που περιλαμβάνει όλους τους όρους που αντιστοιχούν στις κύριες επιδράσεις των παραγόντων και τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις.

$$Y = b_0 + b_1A + b_2B + b_3C + b_{12}AB + b_{13}AC + b_{23}BC + b_{123}ABC$$

Οι οκτώ συντελεστές των παραγόντων μπορούν να υπολογιστούν από τα αποτελέσματα των οκτώ πειραμάτων, καθώς δημιουργείται ένα γραμμικό σύστημα οκτώ εξισώσεων με οκτώ αγνώστους. Με τη χρήση του λογισμικού Design Expert η προηγούμενη σχέση γράφεται ως εξής:

$$T_{75} \text{ (min)} = 45,9 - 3,4A - 0,23B + 0,063C - 0,19AB - 0,23AC - 0,40BC - 0,35ABC$$

$$k_{obs} \text{ (min}^{-1}\text{)} = 0,034 + 0,0027A + 0,0005B - 0,0001C + 0,0003AB + 0,0001AC + 0,0005BC + 0,0004ABC$$

Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι ο παράγοντας A αντιστοιχεί στη θερμοκρασία, ο παράγοντας B στη συγκέντρωση του υδροχλωρικού οξέος και ο παράγοντας C στην ποσότητα του τρισθενούς σιδήρου. Οι τιμές που λαμβάνουν οι παράγοντες αυτοί στα προηγούμενα μοντέλα είναι οι κωδικοποιημένες τιμές -1 ή +1 και όχι οι πραγματικές τους τιμές. Αυτό συμβαίνει για να είναι εφικτή η εκτίμηση της σημασίας του κάθε παράγοντα στην απόκριση όταν αυτός είναι απαλλαγμένος από την επίδραση των μονάδων του. Έτσι οι απόλυτες τιμές των συντελεστών των παραγόντων στις δύο προηγούμενες μαθηματικές εξισώσεις φανερώνουν και τη σημαντικότητα της επίδρασης κάθε παράγοντα στην απόκριση. Παρατηρείται ότι τόσο για την απόκριση T_{75} , όσο και για την απόκριση k_{obs} ο παράγοντας της θερμοκρασίας εμφανίζει το μεγαλύτερο συντελεστή σε απόλυτες τιμές και επιβεβαιώνει τα αρχικά συμπεράσματα.

- 3) Ανάλυση διασποράς (analysis of variance - ANOVA) του μαθηματικού μοντέλου με σκοπό την εκτίμηση του τυχαίου σφάλματος (pure error), της καλής ή μη προσαρμογής του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα (model's lack of fit) και της στατιστικής σημασίας του κάθε όρου.

Ο πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός είναι ένας κορεσμένος σχεδιασμός (saturated design), καθώς περιλαμβάνει τόσα πειράματα όσοι και συντελεστές του μαθηματικού μοντέλου που πρέπει να προσδιοριστούν. Έτσι δεν επιτρέπει την εκτίμηση του σφάλματος και της καλής ή μη προσαρμογής του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα. Έτσι προστέθηκαν 5 ακόμα επαναλήψεις πειραμάτων στο κεντρικό σημείο του σχεδιασμού (0,0,0), δηλαδή πειράματα στα οποία οι παράγοντες θα εμφανίζουν τις κανονικές συνθήκες που προβλέπονται από την αναλυτική μέθοδο (θερμοκρασία 37 °C, συγκέντρωση υδροχλωρικού οξέος 0,75 M, ποσότητα τρισθενούς σιδήρου 0,43 μmol). Ακολουθεί ο πίνακας 6 των αποτελεσμάτων για τα επιπλέον πειράματα που διεξήχθησαν.

Πίνακας 6: Συνοπτικός πίνακας των τιμών των αποκρίσεων για τα επιπλέον πειράματα που διεξήχθησαν στο κεντρικό σημείο του σχεδιασμού (0,0,0).

Πειράματα Κεντρικού σημείου	Σκεύασμα αναφοράς: T ₇₅ (min)	Σκεύασμα αναφοράς: k _{obs} (min ⁻¹)	Σκεύασμα ελέγχου: T ₇₅ (min)	Σκεύασμα ελέγχου: k _{obs} (min ⁻¹)
1	45,5	0,0341	44,5	0,0377
2	46,5	0,0327	43,5	0,0399
3	45,5	0,0338	45,0	0,0371
4	46,5	0,0331	46,5	0,0364
5	47,0	0,0327	46,5	0,0356

Μετά την προσθήκη των επιπλέον κεντρικών σημείων εκτελείται ανάλυση διασποράς για την απόκριση T₇₅ και ακολούθως για την απόκριση k_{obs} και λαμβάνονται οι ακόλουθοι πίνακες.

Πίνακες 7 και 8: Αποτελέσματα ανάλυσης διασποράς (ANOVA) για το μαθηματικό μοντέλο που περιγράφει την απόκριση T₇₅ (Design-Expert)

Source	Sum of Squares	Degrees of Freedom	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	Statistically significant?
Model	95.66	7	13.67	30.37	0.0026	Yes
Factor A Temperature	92.25	1	92.25	205.01	0.0001	Yes
Factor B [HCl]	0.42	1	0.42	0.93	0.3886	No
Factor C $\mu\text{mol Fe (III)}$	0.03	1	0.03	0.07	0.8052	No
Interaction AB	0.28	1	0.28	0.62	0.4734	No
Interaction AC	0.42	1	0.42	0.93	0.3886	No
Interaction BC	1.25	1	1.25	2.79	0.1704	No
Interaction ABC	1.00	1	1.00	2.23	0.4709	No

Standard Deviation	Mean	% C.V.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Adequate Precision (Signal to noise ratio)
0.67	46.01	1.46	0.9815	0.9492	15.23

Πίνακες 9 και 10: Αποτελέσματα ανάλυσης διασποράς (ANOVA) για το μαθηματικό μοντέλο που περιγράφει την απόκριση k_{obs} (Design-Expert)

Source	Sum of Squares	Degrees of Freedom	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	Statistically significant?
Model	6.53E-05	7	9.33E-06	23.74	0.0042	Yes
Factor A Temperature	5.92E-05	1	5.91E-05	150.43	0.0003	Yes
Factor B [HCl]	2.01E-06	1	2.00E-06	5.10	0.0869	No
Factor C $\mu\text{mol Fe (III)}$	1.52E-07	1	1.52E-07	0.39	0.5676	No
Interaction AB	6.58E-07	1	6.58E-07	1.67	0.2655	No
Interaction AC	1.62E-07	1	1.62E-07	0.41	0.5554	No
Interaction BC	2.09E-06	1	2.09E-06	5.32	0.0823	No
Interaction ABC	1.12E-06	1	1.12E-06	2.84	0.1671	No

Standard Deviation	Mean	% C.V.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Adequate Precision (Signal to noise ratio)
6.27E-04	0.034	1.85	0.9765	0.9354	14.85

Από τους προηγούμενους πίνακες μπορούμε να εξάγουμε τα εξής συμπεράσματα:

- i. Ο μόνος παράγοντας που ασκεί στατιστικά σημαντική επίδραση και στις δύο αποκρίσεις (T_{75} και k_{obs}) είναι η θερμοκρασία. Οι υπόλοιποι παράγοντες (συγκέντρωση του υδροχλωρικού οξέος και ποσότητα του τρισθενούς σιδήρου) είναι στατιστικώς ασήμαντοι, καθώς και όλες οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων είναι στατιστικώς ασήμαντες.

- ii. Τα μαθηματικά μοντέλα προσαρμόζονται καλά στα πειραματικά δεδομένα. Οι τιμές F για τα μοντέλα που περιγράφουν τις αποκρίσεις T_{75} και k_{obs} είναι 30,37 και 23,74, αντίστοιχα. Σύμφωνα με τους πίνακες 7 και 9, υπάρχει μόνο 0,26% και 0,42% πιθανότητα, αντίστοιχα να ισχύει η μηδενική υπόθεση (δηλαδή να μην υπάρχει σημαντική επίδραση του αντίστοιχου παράγοντα).
- iii. Οι τιμές R-Squared, Adjusted R-Squared είναι μεγαλύτερες από 0,90 και κρίνονται ικανοποιητικές για τα μαθηματικά μοντέλα. Σκοπός των μοντέλων αυτών είναι να κατανοηθεί η επίδραση των παραγόντων στις αποκρίσεις και δεν αποσκοπούν στην πρόβλεψη της απόκρισης για δεδομένες τιμές παραγόντων ούτε στη βελτιστοποίηση της διεργασίας. Για αυτό το σκοπό τα στατιστικά μεγέθη είναι ικανοποιητικά.

B.2.3. Θεωρητική ερμηνεία των αποτελεσμάτων του πειραματικού σχεδιασμού – Συμπεράσματα για την ανθεκτικότητα της μεθόδου

Το κυριότερο συμπέρασμα που εξάγεται από τον πειραματικό σχεδιασμό είναι ότι ο παράγοντας της θερμοκρασίας ασκεί ιδιαίτερα σημαντική επίδραση στις αποκρίσεις T_{75} και k_{obs} , ενώ οι άλλοι δύο παράγοντες δηλαδή η συγκέντρωση του υδροχλωρικού οξέος και η ποσότητα του τρισθενούς σιδήρου, δεν ασκούν στατιστικά σημαντική επίδραση. Ακόμα με βάση τα αποτελέσματα του παραγοντικού σχεδιασμού οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων δεν εμφανίζουν ουσιαστική επίδραση στις αποκρίσεις.

Τα αποτελέσματα του πειραματικού σχεδιασμού είναι λογικά και επεξηγούνται εύκολα από τη θεωρία της κινητικής. Οι δύο αποκρίσεις δεν είναι ανεξάρτητες αλλά αλληλένδετες και εφόσον η αντίδραση ακολουθεί ψευδοπρωτοταξική κινητική ισχύει η ακόλουθη σχέση όπως και αναφέρεται στο κεφάλαιο A.2.1. (εξίσωση A8)

$$T_{75} = \frac{\ln 4}{k_{obs}} = \frac{1,386}{k_{obs}}$$

Η σταθερά της αντίδρασης είναι ανεξάρτητη από τις συγκεντρώσεις των αντιδρώντων σωμάτων και για αυτό μικρές μεταβολές στα αντιδρώντα σώματα, όπως η συγκέντρωση του υδροχλωρικού οξέος και η ποσότητα του τρισθενούς σιδήρου δεν επιδρούν στις αποκρίσεις. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι είναι σημαντικό το υδροχλωρικό οξύ να βρίσκεται σε μεγάλη περίσσεια σε σχέση με τον τρισθενή σίδηρο, ώστε να μην υπάρχουν αποκλίσεις από την πρωτοταξική κινητική.

Ωστόσο η θερμοκρασία ασκεί μεγάλη επίδραση στις αποκρίσεις, καθώς επηρεάζει τη σταθερά της αντίδρασης και μάλιστα ακολουθώντας εκθετική σχέση όπως δηλώνεται από την εξίσωση του Arrhenius (εξίσωση A18).

Έτσι είναι καθοριστικής σημασίας το πείραμα της κινητικής να διεξάγεται σε συγκεκριμένη θερμοκρασία και να μην υπάρχουν κατά το δυνατόν αποκλίσεις από αυτήν, ενώ η μεταβολή ακόμα και κατά 1 °C αυξάνει σημαντικά την μεταβλητότητα στο αποτέλεσμα.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τον συντελεστή μεταβλητότητας (% RSD) που εμφανίζεται στον πειραματικό σχεδιασμό και κυμαίνεται από 8 – 11 %, κρίνεται σκόπιμο στη μελέτη της ανθεκτικότητας κατά την επικύρωση της μεθόδου να οριστεί ένα μικρότερο εύρος για να διαπιστωθεί η ανθεκτικότητα της μεθόδου στους $37 \pm 0,5$ °C.

Κεφάλαιο B.3. Επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου

B.3.1. Διαδικασίες επικύρωσης της μεθόδου

Κατά την επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου ελέγχθηκαν η γραμμικότητα – πρωτοταξική κινητική, η πιστότητα, η ισοδυναμία και η ανθεκτικότητα της αναλυτικής μεθόδου με βάση τις ακόλουθες διαδικασίες και τα ακόλουθα κριτήρια:

1. Πρωτοταξική κινητική – Γραμμικότητα (First order kinetics – Linearity)

Εκτελείται το πείραμα κινητικής με 10 επαναλήψεις για το σκεύασμα ελέγχου και για το σκεύασμα αναφοράς. Υπολογίζεται ο συντελεστής συσχέτισης (correlation coefficient – r) για την καμπύλη παλινδρόμησης για το χρονικό διάστημα 0 - 90 min (εξισώσεις B1 και B2).

Κριτήριο αποδοχής: Ο συντελεστής συσχέτισης r σε απόλυτη τιμή δεν θα πρέπει να είναι μικρότερος από 0,99.

2. Πιστότητα (Precision)

A) Επαναληψιμότητα (Repeatability)

Εκτελείται το πείραμα κινητικής με 10 επαναλήψεις για το σκεύασμα ελέγχου και για το σκεύασμα αναφοράς. Υπολογίζονται οι τιμές των παραμέτρων T_{75} και k_{obs} , καθώς και οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις για τις παραμέτρους αυτές.

Κριτήριο αποδοχής: Πρέπει η σχετική τυπική απόκλιση % RSD να είναι μικρότερη ή ίση του 5% για την παράμετρο T_{75} και μικρότερη ή ίση του 7% για την παράμετρο k_{obs} .

B) Ενδιάμεση Πιστότητα (Intermediate Precision)

Εκτελούνται 4 πειράματα κινητικής με 5 επαναλήψεις για το σκεύασμα ελέγχου και 5 επαναλήψεις για το σκεύασμα αναφοράς σε δύο διαφορετικές ημέρες από δύο διαφορετικούς αναλυτές.

Προσδιορίζονται οι τιμές των παραμέτρων T_{75} και k_{obs} και τα αποτελέσματα αναλύονται με ANOVA ενός παράγοντα (One Way Analysis of Variance).

Η τυπική απόκλιση της ενδιάμεσης πιστότητας (S_R) υπολογίζεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$S_R = \sqrt{S_r^2 + S_g^2} \quad (B9)$$

Όπου

S_r^2 : Διακύμανση εντός των ομάδων (within groups variance)

S_g^2 : Διακύμανση μεταξύ των ομάδων (between groups variance) η οποία υπολογίζεται με την ακόλουθη σχέση:

$$S_g^2 = (between\ MS \times (k, n) - S_r^2 \times (k, n)) \quad (B10)$$

Εάν όμως ισχύει η ακόλουθη σχέση $S_r^2 \times (k, n) > between\ MS \times (k, n)$

Τότε η διακύμανση μεταξύ των ομάδων θα δίνεται από την ακόλουθη σχέση:

$$S_g^2 = (between\ MS \times (k, n)) \quad (B11)$$

Στις προηγούμενες σχέσεις ο παράγοντας (k, n) δίνεται από την ακόλουθη σχέση:

$$(k, n) = \frac{(k-1) \sum n_j}{(\sum n_j)^2 - \sum (n_j^2)} \quad (B12)$$

Όπου

k = αριθμός των ομάδων

n = αριθμός των παρατηρήσεων στην j ομάδα

Οι παράγοντες $\%RSD_r$ και $\%RSD_R$ υπολογίζονται διαιρώντας τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις S_r και S_R με την ολική μέση τιμή και πολλαπλασιάζοντας επί 100%.

Κριτήριο αποδοχής: Πρέπει οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις $\%RSD_r$ και $\%RSD_R$ να είναι μικρότερες ή ίσες του 5% για την παράμετρο T_{75} και μικρότερες ή ίσες του 10% για την παράμετρο k_{obs} .

3. Ισοδυναμία (Equivalence)

Εκτελείται το πείραμα κινητικής με 10 επαναλήψεις για το σκεύασμα ελέγχου και για το σκεύασμα αναφοράς και υπολογίζονται οι τιμές των παραμέτρων T_{75} και k_{obs} . Εκτελείται έλεγχος ισοδυναμίας με διπλή δοκιμασία t ενός άκρου σύμφωνα με το εδάφιο B.1.4.

Κριτήριο αποδοχής: Πρέπει το διάστημα εμπιστοσύνης που υπολογίζεται για το λόγο των παραμέτρων του σκευάσματος ελέγχου προς το σκεύασμα αναφοράς να βρίσκεται εξ ολοκλήρου εντός του διαστήματος (0,80, 1,20) για να θεωρούνται τα αποτελέσματα ισοδύναμα.

4. Ανθεκτικότητα (Robustness)

A) Ο σκοπός της μελέτης της ανθεκτικότητας της μεθόδου είναι να αποδειχθεί η αξιοπιστία της μεθόδου και να προσδιοριστούν οι παράμετροι που επηρεάζουν περισσότερο την ανάλυση.

Εκτελείται το πείραμα κινητικής με 4 επαναλήψεις για το σκεύασμα ελέγχου και για το σκεύασμα αναφοράς και υπολογίζονται οι τιμές των παραμέτρων T_{75} και k_{obs} . Τα πειράματα εκτελούνται στις παρακάτω συνθήκες:

Παράμετρος I: Θερμοκρασία ($^{\circ}\text{C}$)

Επίπεδο (-): 36,5

Επίπεδο (0): 37,0

Επίπεδο (+): 37,5

Παράμετρος II: Συγκέντρωση διαλύματος υδροχλωρικού οξέος (M)

Επίπεδο (-): 0,74

Επίπεδο (0): 0,75

Επίπεδο (+): 0,76

Παράμετρος III: Ποσότητα τρισθενούς σιδήρου (μmol)

Επίπεδο (-): 0,39

Επίπεδο (0): 0,43

Επίπεδο (+): 0,47

Για την παράμετρο III οι ποσότητες αυτές αντιστοιχούν σε όγκους 11, 12 και 13 μL του διαλύματος 2 που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του τελικού διαλύματος ελέγχου.

Στα πειράματα αυτά υπολογίζεται ο συντελεστής συσχέτισης της καμπύλης παλινδρόμησης για το χρονικό διάστημα 0 – 90 min. Επίσης, υπολογίζονται οι παράμετροι T_{75} και k_{obs} για κάθε περίπτωση. Με μονόδρομη ανάλυση διασποράς ενός παράγοντα (one-way analysis of variance) υπολογίζονται οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις $\%RSD_r$ και $\%RSD_R$, όπως περιγράφεται στο εδάφιο για την ενδιάμεση πιστότητα.

Κριτήριο αποδοχής: Ο συντελεστής συσχέτισης r σε απόλυτη τιμή δεν θα πρέπει να είναι μικρότερος από 0,99. Πρέπει οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις $\%RSD_r$ και $\%RSD_R$ να είναι μικρότερες ή ίσες του 5% για την παράμετρο T_{75} και μικρότερες ή ίσες του 10% για την παράμετρο k_{obs} .

B) Σταθερότητα διαλυμάτων (Solutions Stability)

Εκτελείται το πείραμα κινητικής με 10 επαναλήψεις για το σκεύασμα ελέγχου και για το σκεύασμα αναφοράς χρησιμοποιώντας διάλυμα παρακαταθήκης σακχαρούχου σιδήρου (διάλυμα 2) που έχει παρασκευαστεί άμεσα και διάλυμα παρακαταθήκης σακχαρούχου σιδήρου που έχει παρασκευαστεί προ 48 ωρών και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

Στα πειράματα αυτά υπολογίζεται ομοίως ο συντελεστής συσχέτισης της καμπύλης παλινδρόμησης για το χρονικό διάστημα 0 – 90 min. Επίσης, υπολογίζονται οι παράμετροι T_{75} και k_{obs} για κάθε περίπτωση. Με μονόδρομη ανάλυση διασποράς ενός παράγοντα (one-way analysis of variance) υπολογίζονται οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις $\%RSD_r$ και $\%RSD_R$, όπως περιγράφεται στο εδάφιο για την ενδιάμεση πιστότητα.

Κριτήριο αποδοχής: Ο συντελεστής συσχέτισης r σε απόλυτη τιμή δεν θα πρέπει να είναι μικρότερος από 0,99. Πρέπει οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις $\%RSD_r$ και $\%RSD_R$ να είναι μικρότερες ή ίσες του 5% για την παράμετρο T_{75} και μικρότερες ή ίσες του 10% για την παράμετρο k_{obs} .

Γ) Μακροπρόθεσμη μεταβλητότητα (Long-term Variation)

Εκτελείται το πείραμα κινητικής με 10 επαναλήψεις για το σκεύασμα ελέγχου και για το σκεύασμα αναφοράς, 8 εβδομάδες μετά τη μελέτη επαναληψιμότητας με σκοπό να διαπιστωθεί εάν υπάρχουν μεταβολές στα αποτελέσματα. Στα πειράματα αυτά υπολογίζεται ο συντελεστής συσχέτισης της καμπύλης παλινδρόμησης για το χρονικό διάστημα 0 – 90 min. Επίσης, υπολογίζονται οι παράμετροι T_{75} και k_{obs} για κάθε περίπτωση και το συνολικό $\%RSD$ των 20 επαναλήψεων, λαμβάνοντας υπ' όψιν τις αρχικές 10 επαναλήψεις που πραγματοποιήθηκαν κατά τη μελέτη επαναληψιμότητας της μεθόδου και τις τελικές 10 επαναλήψεις για κάθε σκεύασμα.

Κριτήριο αποδοχής: Ο συντελεστής συσχέτισης r σε απόλυτη τιμή δεν θα πρέπει να είναι μικρότερος από 0,99. Πρέπει η σχετική τυπική απόκλιση %RSD να είναι μικρότερη ή ίση του 5% για την παράμετρο T_{75} και μικρότερη ή ίση του 7% για την παράμετρο k_{obs} . Η συνολική σχετική τυπική απόκλιση % RSD πρέπει να είναι μικρότερη ή ίση του 5% για το T_{75} και μικρότερη ή ίση του 7% για το k_{obs} .

B.3.2. Δεδομένα για την επικύρωση της μεθόδου

1) Πρωτοταξική κινητική – Γραμμικότητα

Πίνακας 11: Πειραματικά δεδομένα σχετικά με τη γραμμικότητα της μεθόδου και την πρωτοταξική κινητική.

Συντελεστής συσχέτισης (σε απόλυτη τιμή) - $ r $		
	Δείγμα Αναφοράς	Δείγμα Ελέγχου
1	0,998	0,995
2	0,998	0,995
3	0,998	0,995
4	0,998	0,995
5	0,998	0,995
6	0,998	0,995
7	0,998	0,995
8	0,998	0,995
9	0,997	0,994
10	0,997	0,994
Μέση Τιμή	0,998	0,995
% RSD	0,023	0,041

Συντελεστής συσχέτισης $|r| \geq 0,994$

Τα κριτήρια αποδοχής πληρούνται.

2) Πιστότητα

A. Επαναληψιμότητα

Πίνακας 12: Πειραματικά δεδομένα σχετικά με την επαναληψιμότητα της μεθόδου.

Μελέτη επαναληψιμότητας της αναλυτικής μεθόδου				
	Δείγμα Αναφοράς		Δείγμα Ελέγχου	
	k_{obs} (min^{-1})	T_{75} (min)	k_{obs} (min^{-1})	T_{75} (min)
1	0,03516	44,5	0,0398	43,0
2	0,03405	45,0	0,0417	43,0
3	0,03408	45,5	0,0377	44,5
4	0,03269	46,5	0,0399	43,5
5	0,03378	45,5	0,0371	45,0
6	0,03315	46,5	0,0364	46,5
7	0,03272	47,0	0,0356	46,5
8	0,03232	48,0	0,0348	47,5
9	0,03242	48,0	0,0349	47,5
10	0,03385	46,0	0,0370	46,0
Μέση Τιμή	0,03342	46,3	0,0375	45,3
Τυπική Απόκλιση	0,00091	1,2	0,0023	1,8
% RSD	2,7	2,6	6,2	3,9

k_{obs} (min^{-1}): % RSD \leq 6,2

T_{75} (min): % RSD \leq 3,9

Τα κριτήρια αποδοχής πληρούνται.

B. Ενδιάμεση Πιστότητα

Πίνακας 13: Πειραματικά δεδομένα σχετικά με την ενδιάμεση πιστότητα της μεθόδου.

Μελέτη ενδιάμεσης πιστότητας της αναλυτικής μεθόδου (1 ^{ος} Αναλυτής – 1 ^η και 2 ^η μέρα)				
	Δείγμα Αναφοράς		Δείγμα Ελέγχου	
	k_{obs} (min ⁻¹)	T_{75} (min)	k_{obs} (min ⁻¹)	T_{75} (min)
Αναλυτής 1 Ημέρα 1	0,03516	44,50	0,03979	43,00
	0,03405	45,00	0,04167	43,00
	0,03408	45,50	0,03768	44,50
	0,03269	46,50	0,03992	43,50
	0,03378	45,50	0,03712	45,00
Αναλυτής 1 Ημέρα 2	0,03563	44,00	0,04019	43,00
	0,03398	45,50	0,04082	42,00
	0,03445	45,00	0,03800	44,00
	0,03354	45,50	0,04027	42,00
	0,03471	44,50	0,03975	43,00

Πίνακας 14: Πειραματικά δεδομένα σχετικά με την ενδιάμεση πιστότητα της μεθόδου.

Μελέτη ενδιάμεσης πιστότητας της αναλυτικής μεθόδου (2^{ος} Αναλυτής – 1^η και 2^η μέρα)				
	Δείγμα Αναφοράς		Δείγμα Ελέγχου	
	k_{obs} (min⁻¹)	T₇₅ (min)	k_{obs} (min⁻¹)	T₇₅ (min)
Αναλυτής 2 Ημέρα 1	0,03315	46,50	0,03642	46,50
	0,03272	47,00	0,03563	46,50
	0,03232	48,00	0,03475	47,50
	0,03242	48,00	0,03486	47,50
	0,03385	46,00	0,03698	46,00
Αναλυτής 2 Ημέρα 2	0,03450	44,50	0,03966	43,00
	0,03424	45,00	0,03954	43,00
	0,03366	46,00	0,03889	43,50
	0,03391	46,00	0,03928	43,50
	0,03534	44,50	0,04206	42,00
%RSD_r	2,2	1,7	3,4	1,7
%RSD_R	2,9	2,6	6,0	4,5

Τα κριτήρια αποδοχής πληρούνται.

3) Ισοδυναμία

Τα αποτελέσματα που έχουν ληφθεί για τη μελέτη της ισοδυναμίας είναι κοινά με την μελέτη της Επαναληψιμότητας της μεθόδου και επεξεργάστηκαν με τον έλεγχο ισοδυναμίας σύμφωνα με το εδάφιο Β.1.4.

Τα αποτελέσματα του ελέγχου ισοδυναμίας δίνονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 15: Πειραματικά δεδομένα σχετικά με τον έλεγχο ισοδυναμίας της μεθόδου.

Έλεγχος ισοδυναμίας των παραμέτρων k_{obs} και T_{75}		
	k_{obs} (min^{-1})	T_{75} (min)
Μέσες τιμές για το σκεύασμα αναφοράς	0,03342	46,25
Μέσες τιμές για το σκεύασμα ελέγχου	0,03748	45,30
ρ_L	1,09	0,97
ρ_U	1,15	0,99
Αποτέλεσμα	Ισοδυναμία	Ισοδυναμία

Τα κριτήρια αποδοχής πληρούνται.

4) Ανθεκτικότητα

Α) Ακολουθούν τα αποτελέσματα για τον έλεγχο ανθεκτικότητας για τις παραμέτρους της θερμοκρασίας, της συγκέντρωσης του υδροχλωρικού οξέος και της ποσότητας τρισθενούς σιδήρου.

Πίνακας 16: Πειραματικά δεδομένα σχετικά με την ανθεκτικότητα της μεθόδου.

Παράμετρος I: Θερμοκρασία						
Επίπεδο		-	0	+	% RSD _r	% RSD _R
Σκεύασμα αναφοράς	r	0,997	0,998	0,998	-	-
		0,998	0,998	0,997		
		0,998	0,998	0,997		
		0,997	0,997	0,997		
	k _{obs} (min ⁻¹)	0,03662	0,03372	0,03629	5,1	6,0
		0,03384	0,03342	0,03483		
		0,03492	0,03246	0,03628		
		0,02992	0,03217	0,03535		
	T ₇₅ (min)	43,00	46,50	45,00	4,6	4,7
		46,50	47,00	46,50		
		45,00	48,50	44,00		
		50,50	49,50	47,00		
Σκεύασμα ελέγχου	r	0,994	0,995	0,993	-	-
		0,994	0,994	0,993		
		0,994	0,994	0,994		
		0,993	0,993	0,993		
	k _{obs} (min ⁻¹)	0,04266	0,03591	0,04246	4,5	9,6
		0,04204	0,03504	0,04174		
		0,03670	0,03362	0,04115		
		0,04075	0,03675	0,04198		
	T ₇₅ (min)	42,00	44,50	44,00	4,1	5,0
		42,50	48,00	44,50		
		47,50	49,00	44,50		
		44,00	46,50	44,50		

Τα κριτήρια αποδοχής πληρούνται. Η μέθοδος δεν επηρεάζεται σημαντικά από μεταβολή της θερμοκρασίας εντός του διαστήματος 36,5 – 37,5 °C.

Πίνακας 17: Πειραματικά δεδομένα σχετικά με την ανθεκτικότητα της μεθόδου.

Παράμετρος II: Συγκέντρωση Υδροχλωρικού Οξέος						
Επίπεδο		-	0	+	% RSD _r	% RSD _R
Σκεύασμα αναφοράς	r	0,998	0,998	0,998	-	-
		0,998	0,998	0,998		
		0,998	0,998	0,998		
		0,998	0,997	0,997		
	k _{obs} (min ⁻¹)	0,03523	0,03372	0,03536	2,8	2,9
		0,03321	0,03342	0,03381		
		0,03357	0,03246	0,03342		
		0,03326	0,03217	0,03288		
	T ₇₅ (min)	44,00	46,50	43,50	3,2	4,2
		45,50	47,00	46,00		
		44,50	48,50	45,00		
		47,00	49,50	47,50		
Σκεύασμα ελέγχου	r	0,995	0,995	0,995	-	-
		0,995	0,994	0,994		
		0,995	0,994	0,994		
		0,994	0,993	0,994		
	k _{obs} (min ⁻¹)	0,03778	0,03591	0,03697	2,9	3,8
		0,03693	0,03504	0,03602		
		0,03631	0,03362	0,03620		
		0,03824	0,03675	0,03807		
	T ₇₅ (min)	44,50	44,50	45,00	3,1	3,1
		46,00	48,00	47,00		
		47,00	49,00	46,50		
		45,00	46,50	45,00		

Τα κριτήρια αποδοχής πληρούνται. Η μέθοδος δεν επηρεάζεται σημαντικά από τροποποίηση της συγκέντρωσης του υδροχλωρικού οξέος εντός του διαστήματος 0,74 M – 0,76 M.

Πίνακας 18: Πειραματικά δεδομένα σχετικά με την ανθεκτικότητα της μεθόδου.

Παράμετρος III: Ποσότητα τρισθενούς σιδήρου						
Επίπεδο		-	0	+	% RSD _r	% RSD _R
Σκεύασμα αναφοράς	r	0,997	0,998	0,996	-	-
		0,997	0,997	0,998		
		0,998	0,998	0,997		
		0,997	0,997	0,997		
	k _{obs} (min ⁻¹)	0,03483	0,03448	0,038524	3,9	5,2
		0,03359	0,03200	0,034294		
		0,03353	0,03292	0,034908		
		0,03308	0,03273	0,034849		
	T ₇₅ (min)	45,50	46,50	43,00	3,4	3,9
		45,50	47,50	47,00		
		44,50	46,50	44,50		
		48,00	49,50	46,00		
Σκεύασμα ελέγχου	r	0,991	0,995	0,994	-	-
		0,993	0,995	0,994		
		0,994	0,994	0,994		
		0,994	0,994	0,993		
	k _{obs} (min ⁻¹)	0,03876	0,03683	0,04026	3,0	5,5
		0,03738	0,03591	0,03976		
		0,03677	0,03498	0,03890		
		0,03912	0,03785	0,04147		
	T ₇₅ (min)	46,00	45,50	44,50	2,6	3,0
		47,00	44,50	44,00		
		45,50	48,00	44,50		
		44,50	44,50	43,50		

Τα κριτήρια αποδοχής πληρούνται. Η μέθοδος δεν επηρεάζεται σημαντικά από τροποποίηση της ποσότητας του τρισθενούς σιδήρου εντός του διαστήματος 0,39 μmol – 0,47 μmol (αντιστοιχούν σε μεταβολή του όγκου του διαλύματος 2 από 11 – 13 μl).

B) Σταθερότητα των διαλυμάτων

Πίνακας 19: Πειραματικά δεδομένα σχετικά με τη σταθερότητα των διαλυμάτων.

Σκεύασμα αναφοράς						
	Άμεσα παρασκευασμένο			Παρασκευασμένο προ 48 ωρών		
	r	k _{obs} (min ⁻¹)	T ₇₅ (min)	r	k _{obs} (min ⁻¹)	T ₇₅ (min)
1	0,998	0,03563	44,00	0,997	0,03455	46,00
2	0,998	0,03398	45,50	0,998	0,03352	46,00
3	0,998	0,03445	45,00	0,997	0,03350	46,00
4	0,998	0,03354	45,50	0,998	0,03289	47,00
5	0,998	0,03471	44,50	0,998	0,03371	46,00
6	0,998	0,03450	44,50	0,998	0,03437	45,50
7	0,998	0,03424	45,00	0,997	0,03419	46,00
8	0,997	0,03366	46,00	0,997	0,03440	45,50
9	0,997	0,03391	46,00	0,997	0,03449	45,00
10	0,997	0,03534	44,50	0,997	0,03636	43,50
Μέση Τιμή	-	0,03420	45,65	-	0,03420	45,65
Τυπική Απόκλιση	-	0,00093	0,91	-	0,00093	0,91
% RSD	-	2,7	2,0	-	2,7	2,0

k_{obs} (min⁻¹):

% RSD_r = 2,4

% RSD_R = 2,4

T₇₅ (min):

% RSD_r = 1,8

% RSD_R = 1,9

Πίνακας 20: Πειραματικά δεδομένα σχετικά με τη σταθερότητα των διαλυμάτων.

Σκεύασμα ελέγχου						
	Άμεσα παρασκευασμένο			Παρασκευασμένο προ 48 ωρών		
	r	k _{obs} (min ⁻¹)	T ₇₅ (min)	r	k _{obs} (min ⁻¹)	T ₇₅ (min)
1	0,995	0,0402	43,00	0,995	0,0393	44,0
2	0,995	0,0408	42,00	0,995	0,0422	41,5
3	0,995	0,0380	44,00	0,995	0,0381	44,5
4	0,995	0,0403	42,00	0,995	0,0424	42,0
5	0,995	0,0398	43,00	0,994	0,0404	43,0
6	0,995	0,0397	43,00	0,994	0,0418	42,0
7	0,995	0,0395	43,00	0,994	0,0418	42,5
8	0,995	0,0389	43,50	0,994	0,0423	42,0
9	0,994	0,0393	43,50	0,994	0,0412	43,0
10	0,994	0,0421	42,00	0,993	0,0439	41,0
Μέση Τιμή	-	0,0398	42,90	-	0,0413	42,6
Τυπική Απόκλιση	-	0,0011	0,70	-	0,0017	1,1
% RSD	-	2,8	1,6	-	4,0	2,6

k_{obs} (min⁻¹):

% RSD_r = 3,5

% RSD_R = 4,2

T₇₅ (min):

% RSD_r = 2,1

% RSD_R = 2,2

Τα κριτήρια αποδοχής πληρούνται.

C) Μακροπρόθεσμη μεταβλητότητα

Πίνακας 21: Πειραματικά δεδομένα σχετικά με την μακροπρόθεσμη μεταβλητότητα.

Πρωτοταξική κινητική – Γραμμικότητα		
Συντελεστής συσχέτισης (σε απόλυτη τιμή) - r		
	Σκεύασμα Αναφοράς	Σκεύασμα Ελέγχου
1	0,998	0,995
2	0,998	0,995
3	0,998	0,995
4	0,998	0,995
5	0,998	0,995
6	0,998	0,995
7	0,998	0,995
8	0,998	0,995
9	0,997	0,994
10	0,997	0,994
Μέση Τιμή	0,998	0,995
% RSD	0,023	0,041

Συντελεστής συσχέτισης |r|: $\geq 0,993$

Τα κριτήρια αποδοχής πληρούνται.

Πίνακας 22: Πειραματικά δεδομένα σχετικά με την μακροπρόθεσμη μεταβλητότητα.

Αποτελέσματα των παραμέτρων T_{75} και k_{obs}				
	Σκεύασμα αναφοράς		Σκεύασμα ελέγχου	
	k_{obs} (min^{-1})	T_{75} (min)	k_{obs} (min^{-1})	T_{75} (min)
1	0,0364	42,5	0,0412	41,0
2	0,0353	44,5	0,0408	43,0
3	0,0346	44,5	0,0401	43,0
4	0,0339	46,0	0,0399	43,5
5	0,0336	47,0	0,0404	43,5
6	0,0331	47,5	0,0384	45,0
7	0,0364	42,5	0,0380	46,0
8	0,0341	46,0	0,0393	45,0
9	0,0362	42,0	0,0453	39,0
10	0,0348	45,5	0,0435	41,0
Μέση Τιμή	0,0349	44,8	0,0407	43,0
Τυπική Απόκλιση	0,0011	1,8	0,0021	2,0
% RSD	3,3	4,1	5,2	4,7
Συνολικό % RSD	3,7	3,8	7,0	5,1

k_{obs} (min^{-1}):

% RSD \leq 5,2

Συνολικό % RSD \leq 5

T₇₅ (min):

% RSD ≤ 4,7

Συνολικό % RSD ≤ 7

Τα κριτήρια αποδοχής πληρούνται.

B.3.3. Σύνοψη της επικύρωσης της μεθόδου

Γραμμικότητα

Συντελεστής συσχέτισης σε απόλυτη τιμή $|r| \geq 0,994$

Τα κριτήρια αποδοχής πληρούνται.

Πιστότητα

A) Επαναληψιμότητα

k_{obs} (min⁻¹): % RSD ≤ 6,2

T₇₅ (min): % RSD ≤ 3,9

B) Συνολική Επαναληψιμότητα

k_{obs} (min⁻¹): % RSD_r ≤ 3,4

T₇₅ (min): % RSD_r ≤ 1,7

Γ) Ενδιάμεση Πιστότητα

k_{obs} (min⁻¹): % RSD_R ≤ 6,0

T₇₅ (min): % RSD_R ≤ 4,5

Τα κριτήρια αποδοχής πληρούνται.

Ισοδυναμία

Το διάστημα εμπιστοσύνης που ορίζεται για τον λόγο των αποκρίσεων ευρίσκεται εντός του διαστήματος (0,80, 1,20).

Τα κριτήρια αποδοχής πληρούνται.

Ανθεκτικότητα

A) Έλεγχος της επίδρασης σημαντικών παραγόντων στην απόκριση.

Η μέθοδος δεν επηρεάζεται σημαντικά από τροποποίηση της θερμοκρασίας εντός του διαστήματος 36,5 – 37,5 °C.

Η μέθοδος δεν επηρεάζεται σημαντικά από τροποποίηση της συγκέντρωσης του υδροχλωρικού οξέος εντός του διαστήματος 0,74 M – 0,76 M.

Η μέθοδος δεν επηρεάζεται σημαντικά από τροποποίηση της ποσότητας του τρισθενούς σιδήρου εντός του διαστήματος 0,39 μmol – 0,47 μmol.

Τα κριτήρια αποδοχής πληρούνται.

B) Σταθερότητα διαλυμάτων.

Τα διαλύματα παρακαταθήκης είναι σταθερά για τουλάχιστον 48 ώρες.

Τα κριτήρια αποδοχής πληρούνται.

Γ) Μακροπρόθεσμη μεταβλητότητα

Συντελεστής συσχέτισης σε απόλυτη τιμή $|r| \geq 0,993$

k_{obs} (min⁻¹):

% RSD $\leq 5,2$

Συνολικό % RSD ≤ 5

T_{75} (min):

% RSD $\leq 4,7$

Συνολικό % RSD ≤ 7

B.3.4. Επίλογος - Γενικά συμπεράσματα

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η κινητικής αποικοδόμησης των συμπλόκων σακχαρούχου σιδήρου σε παρεντερικά σκευάσματα σακχαρούχου σιδήρου. Τα κυριότερα συμπεράσματα που εξήχθηκαν από την παρούσα μελέτη συνοψίζονται στα ακόλουθα:

α) Αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε κατάλληλη φωτομετρική μέθοδος για τη μελέτη της κινητικής αποικοδόμησης του συμπλόκου σακχαρούχου σιδήρου. Με την μέθοδο αυτή προσδιορίζεται ο χρόνος που απαιτείται για την αποδέσμευση του 75 % του σιδήρου και η ψευδοπρωτοταξική σταθερά k_{obs} . Η αποικοδόμηση του συμπλόκου παρουσία διαλύματος υδροχλωρικού οξέος εμφανίζει κινητική πρώτης τάξης.

β) Η αναλυτική αυτή μέθοδος είναι κατάλληλη για τον έλεγχο ποιότητας και τη διασφάλιση της ποιότητας μεταξύ διαφορετικών παρτίδων του ίδιου σκευάσματος. Με αυτό τον επιπλέον έλεγχο εξασφαλίζεται ότι η παραγωγική διεργασία, η οποία είναι ιδιαίτερα σημαντική για την περίπτωση του σακχαρούχου σιδήρου, είναι σταθερή και επαναλήψιμη.

γ) Με τη χρήση αυτής της αναλυτικής μεθόδου είναι εφικτή η σύγκριση της κινητικής μεταξύ του πρωτοτύπου σκευάσματος σακχαρούχου σιδήρου και γενοσήμων σκευασμάτων. Η σύγκριση αυτή μπορεί να δώσει μια αρχική ένδειξη για τη βιοϊσοδυναμία – βιοομοιότητα του υπό εξέταση γενοσήμου φαρμάκου με το πρωτότυπο. Αυτό συμβαίνει γιατί η σταθερότητα του συμπλόκου του σακχαρούχου σιδήρου είναι ο καθοριστικότερος παράγοντας που ρυθμίζει τη φαρμακοκινητική του σακχαρούχου σιδήρου και κατ' επέκτασιν τη βιοδιαθεσιμότητά του. Ωστόσο η μελέτη αυτή δεν μπορεί να αποδείξει τη βιοϊσοδυναμία – βιοομοιότητα, καθώς αποτελεί έναν *in vitro* έλεγχο και δεν μπορεί να εξομοιώσει πλήρως τον ανθρώπινο οργανισμό.

δ) Η χρήση τεχνικών πειραματικού σχεδιασμού και κυρίως του παραγοντικού σχεδιασμού κρίνεται ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για την αξιολόγηση των σημαντικών παραγόντων που επιδρούν στο αναλυτικό αποτέλεσμα. Στην παρούσα αναλυτική μέθοδο, η θερμοκρασία αποτελεί κρίσιμο παράγοντα που ασκεί σημαντική επιρροή στο αποτέλεσμα της αναλυτικής διαδικασίας, ενώ η διαφοροποίηση στην συγκέντρωση των αντιδρώντων σωμάτων δεν ασκούσε σημαντική επίδραση. Έτσι με τη χρήση πειραματικού σχεδιασμού εξήχθησαν χρήσιμα συμπεράσματα για την ανθεκτικότητα της μεθόδου και κατανοήθηκε καλύτερα η αναλυτική διαδικασία.

Εν τέλει, η παρούσα αναλυτική μέθοδος κρίνεται κατάλληλη για τους σκοπούς για τους οποίους προορίζεται.

Περίληψη

Εισαγωγή

Ο σακχαρούχος σίδηρος (iron sucrose) αποτελεί ένα σύμπλοκο μόριο υδροξειδίου του τρισθενούς σιδήρου με σακχαρόζη με σχετικό μοριακό τύπο $[\text{Na}_2\text{Fe}_5\text{O}_8(\text{OH})\cdot 3\text{H}_2\text{O}]_n \cdot x(\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11})$. Το τελικό φαρμακευτικό προϊόν περιέχει 20 mg/ml στοιχειακού σιδήρου και 300 mg/ml σακχαρόζης και είναι ένα αλκαλικό υδατικό διάλυμα με βαθύ καφέ χρώμα.

Ο σακχαρούχος σίδηρος χορηγείται παρεντερικά με βραδεία ένεση ή με ενδοφλέβια στάγδην έγχυση και δεν πρέπει να χορηγείται ενδομυϊκά. Στη θεραπευτική ο σακχαρούχος σίδηρος εμφανίζει τις ακόλουθες ενδείξεις. Χρησιμοποιείται κυρίως όταν είναι κλινικά αναγκαία η ταχεία προσφορά σιδήρου στις αποθήκες σιδήρου. Χρησιμοποιείται σε ασθενείς με δυσανεξία στην από του στόματος χορηγούμενη σιδηροθεραπεία ή μη συμμορφούμενους με αυτήν. Ακόμα χρησιμοποιείται στην ενεργό φλεγμονώδη νόσο του εντέρου, όπου τα χορηγούμενα από του στόματος σκευάσματα σιδήρου είναι αναποτελεσματικά.

Ο σακχαρούχος σίδηρος αποτελείται από σύμπλοκα μόρια με πυρήνες υδροξειδίου του τρισθενούς σιδήρου και ένα υδατανθρακικό περίβλημα χωρίς απόλυτα καθορισμένη χημική δομή. Είναι δηλαδή ένα σύνολο μορίων με παραπλήσιες χημικές δομές. Η χημική δομή και οι φυσικοχημικές ιδιότητες των συμπλόκων μορίων σακχαρούχου σιδήρου που είναι καθοριστικής σημασίας για τη φαρμακολογική δράση και τη φαρμακοκινητική του, εξαρτώνται σημαντικά από την παραγωγική διεργασία, η οποία πρέπει να είναι αυστηρά ορισμένη και ελεγχόμενη. Η πολυπλοκότητα του συμπλόκου αυτού καθιστά αναγκαία την ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων για το έλεγχο ποιότητας του φαρμάκου αυτού.

Η παρούσα εργασία αποσκοπεί στην ανάπτυξη και την επικύρωση αναλυτικής μεθόδου για τη μελέτη της κινητικής αποικοδόμησης των συμπλόκων σακχαρούχου σιδήρου παρουσία διαλύματος υδροχλωρικού οξέος. Οι κυριότερες εφαρμογές της αναλυτικής αυτής μεθόδου είναι οι ακόλουθες. Πρώτον, η χρήση της στον έλεγχο ποιότητας των σκευασμάτων σακχαρούχου σιδήρου. Δεύτερον, για την εκτίμηση της ισοδυναμίας μεταξύ δύο διαφορετικών σκευασμάτων σακχαρούχου σιδήρου, ενός σκευάσματος αναφοράς και ενός σκευάσματος ελέγχου, ως προς την κινητική αποικοδόμησης των συμπλόκων. Έτσι παρέχει και μια αρχική ένδειξη για την ύπαρξη ή μη βιοϊσοδυναμίας – βιοομοιότητας μεταξύ των δύο σκευασμάτων. Ακόμα με τη χρήση τεχνικών πειραματικού σχεδιασμού εξετάστηκε η ανθεκτικότητα της μεθόδου και διερευνήθηκαν οι επιδράσεις και οι αλληλεπιδράσεις διαφόρων παραγόντων στο αναλυτικό αποτέλεσμα.

Πειραματικό μέρος

Η αναλυτική μέθοδος βασίζεται στο φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της κινητικής αποικοδόμησης των συμπλόκων σακχαρούχου σιδήρου σε όξινο περιβάλλον. Τα κολλοειδή διαλύματα σακχαρούχου σιδήρου έχουν βαθύ καφέ χρώμα και απορροφούν ισχυρά στα 450 nm, ενώ μετά την αποικοδόμηση των συμπλόκων αποχρωματίζονται και η απορρόφηση στα 450 nm μειώνεται. Έτσι, η κινητική αποικοδόμησης του σακχαρούχου σιδήρου μελετάται παρουσία όξινου διαλύματος υδροχλωρικού οξέος 0,75 M σε φασματοφωτόμετρο με δυνατότητα ρύθμισης της θερμοκρασία στους $37 \pm 0,5$ °C. Καταγράφονται οι τιμές της απορρόφησης κάθε 30 s για χρονικό διάστημα των 2 ωρών.

Η αντίδραση που μελετάται εμφανίζει ψευδοπρωτοταξική κινητική και περιγράφεται από την ακόλουθη εξίσωση. Η ψευδοπρωτοταξική σταθερά προσδιορίζεται μέσω γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης.

$$\log \left[\frac{A_t - A_\infty}{A_0 - A_\infty} \right] = -\frac{k_{obs}}{2,303} t$$

Στην παρούσα αναλυτική μέθοδο η κινητική της αντίδρασης μελετάται με δύο παραμέτρους, τη ψευδοπρωτοταξική σταθερά της αντίδρασης k_{obs} και το χρόνο T_{75} που αντιστοιχεί στο χρόνο στον οποίο τουλάχιστον το 75 % του σιδήρου έχει αποδεσμευτεί από το σύμπλοκο του σακχαρούχου σιδήρου.

Ο έλεγχος της ισοδυναμίας (equivalence testing) γίνεται με έλεγχο των παραμέτρων k_{obs} και T_{75} του σκευάσματος αναφοράς και του σκευάσματος ελέγχου μέσω μιας διπλής δοκιμασίας t ενός άκρου (Two one-sided t-test, TOST).

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση των πειραματικών συνθηκών στο αναλυτικό αποτέλεσμα με τη χρήση ενός πλήρους παραγοντικού πειραματικού σχεδιασμού τριών παραγόντων σε δύο επίπεδα. Οι παράγοντες που εξετάστηκαν ως προς την επίδρασή τους στην απόκριση είναι η θερμοκρασία, η συγκέντρωση υδροχλωρικού οξέος και η ποσότητα τρισθενούς σιδήρου που βρίσκεται στο τελικό διάλυμα ελέγχου. Μετά από στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων του πειραματικού σχεδιασμού εξήχθηκε το συμπέρασμα ότι η θερμοκρασία ασκεί ιδιαίτερα σημαντική επίδραση στις μελετώμενες επιδράσεις. Λόγω της κρισιμότητας του παράγοντα αυτού κρίνεται ιδιαίτερα σημαντικό η θερμοκρασία να διατηρείται σταθερή στους 37 °C. Μικρές μεταβολές στη συγκέντρωση του υδροχλωρικού οξέος ή στην ποσότητα του τρισθενούς σιδήρου, καθώς και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων δεν επηρεάζουν σημαντικά τις αποκρίσεις.

Κατά την επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου ελέγχθηκε η γραμμικότητα, η πιστότητα της μεθόδου (επαναληψιμότητα και ενδιάμεση πιστότητα), η

ισοδυναμία, η ανθεκτικότητα, η σταθερότητα των διαλυμάτων και η μακροπρόθεσμη μεταβλητότητα της μεθόδου.

Επίλογος – Συμπεράσματα

Στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε αναλυτική μέθοδος για τη μελέτη της κινητικής αποικοδόμησης των συμπλόκων σακχαρούχου σιδήρου. Τα σκευάσματα σακχαρούχου σιδήρου παρουσία όξινου περιβάλλοντος εμφανίζουν ψευδοπρωτοταξική κινητική.

Αυτή η αναλυτική μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί στον έλεγχο ποιότητας σκευασμάτων σακχαρούχου σιδήρου. Ακόμη, η μέθοδος είναι κατάλληλη για τη σύγκριση μεταξύ ενός σκευάσματος αναφοράς και ενός σκευάσματος ελέγχου ώστε να αποδειχθεί η ισοδυναμία ή μη σε σχέση με την κινητική των δυο σκευασμάτων. Η μέθοδος αυτή παρέχει μια αρχική ένδειξη για την βιοϊσοδυναμία των δύο σκευασμάτων.

Τέλος, με την επικύρωση της μεθόδου αποδεικνύεται η καταλληλότητα της για τους σκοπούς για τους οποίους προορίζεται.

Summary

Introduction

Iron sucrose is a complex of polynuclear iron(III) hydroxide ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) in sucrose. It has an average molecular weight of 34,000 – 60,000 Daltons (Da), with an observable dark brown color, and a proposed structural formula of $[\text{Na}_2\text{Fe}_5\text{O}_8(\text{OH})\cdot 3\text{H}_2\text{O}]_n \cdot x(\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11})$. The drug product contains 20 mg/mL of elemental iron in a basic solution with approximately 300 mg/mL sucrose in water and its pH ranges from 10.5 to 11.0.

The pharmaceutical form for iron sucrose is a solution for injection or concentrate for solution for infusion. Iron sucrose is indicated for the treatment of iron deficiency, where there is a clinical need for a rapid iron supply. It is also indicated in patients who cannot tolerate or who are noncompliant with oral iron therapy. The therapeutic indications also include active inflammatory bowel disease where oral iron preparations are less effective.

Iron sucrose consists of complex molecules of iron hydroxide nuclei with a carbohydrate shell. Iron sucrose does not have a specific structural formula. Therefore, it is an aggregate of molecules with similar chemical structures. The chemical structure and physicochemical properties of iron sucrose complexes that are critical for pharmacological action and pharmacokinetic properties, greatly depend on the production process, which must be strictly defined and controlled. The complexity of this pharmaceutical product requires the development of analytical methods suitable for quality control.

This dissertation aims to the development and validation of an analytical method for monitoring the iron sucrose degradation kinetics in the presence of an acidic solution of hydrochloric acid.

The main applications of this analytical method are the following. Firstly, it is intended for the quality control of iron sucrose formulations. Secondly, for assessing the equivalence between two different formulations iron sucrose, a reference formulation and a test formulation, based on the degradation kinetics of the complexes. This provides an initial indication of the existence or not of bioequivalence (biosimilarity) between the two formulations.

Moreover, with the use of experimental design, the robustness of the analytical method and the effects and interactions of various factors on the analytical result are examined.

Experimental

This analytical method is based on the photometric determination of iron sucrose degradation kinetics in an acidic solution.

The colloidal solutions of iron sucrose have a deep brown color and exhibit a strong absorption at 450 nm. As the complex dissociates, the color is discharged, resulting in a decrease in absorbance. Thus, the kinetics of degradation of the iron sucrose is monitored in the acidic solution of hydrochloric acid 0.75 M in a spectrophotometer capable of maintaining temperature at 37 ± 0.5 °C. The absorption values are recorded every 30 s for a period of two hours.

The degradation kinetics is expressed by the following mathematical relation:

$$\log \left[\frac{A_t - A_\infty}{A_0 - A_\infty} \right] = -\frac{k_{obs}}{2.303} t$$

The responses examined in this analytical method are the pseudofirst order reaction k_{obs} , which is calculated through linear regression analysis of the previous equation and T_{75} interval, which is the time (in min) when not less than 75% of iron sucrose solution's colloidal ferric hydroxide is dissociated.

The responses of the reference sample are compared to the responses of the test sample with equivalence testing. This is performed with the use of a two one-sided t-test (TOST).

Afterwards, the effects of the experimental conditions to the response are examined with the use of a full factorial design of three factors at two levels. The factors tested in this experimental design were temperature, the concentration of hydrochloric acid and the quantity of trivalent iron in the final test solution. After a statistical analysis of the results of the experimental design it is concluded that only the effect of temperature is statistically significant. The other two factors and the interactions between the factors are considered insignificant. Because of this fact, temperature should be maintained constantly at 37 °C throughout the whole experimental process.

In the validation of the analytical method the following characteristics were examined: linearity, precision (repeatability and intermediate precision), equivalence, robustness, stability of solutions and long-term variation.

Conclusions

The primary aim of this dissertation is the development and validation of an analytical method in order to effectively monitor the iron sucrose complex

degradation kinetics. Iron sucrose formulations in the presence of an acidic environment exhibit pseudofirst order degradation kinetics.

This analytical method can be used for quality control purposes in different batches of iron sucrose products. Furthermore, this method is suitable for the comparison of a reference pharmaceutical product with a test product in order to examine whether the degradation kinetics are equivalent or not. This method provides an initial indication for the bioequivalence or not of these products.

Finally, the validation demonstrates that this analytical method is fit for its intended purpose.

Βιβλιογραφία

- [1] B. Danielson, Structure, Chemistry, and Pharmacokinetics of Intravenous Iron Agents, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 15 (2004), S93–S98.
- [2] A. Pai, Challenges in clinical use of IV iron formulations, <https://www.fda.gov/downloads/ForIndustry/UserFees/GenericDrugUserFees/UCM450801.pdf>.
- [3] R. Shah, Y. Yang, M. Khan, A. Raw, L. Yu, P. Faustino, Pharmaceutical characterization and thermodynamic stability assessment of a colloidal iron drug product: Iron sucrose, *Int. J. Pharm.*, 464 (2014), 46-52.
- [4] D. Kudasheva, J. Lai, A. Ulman, M. Cowman, Structure of carbohydrate-bound polynuclear iron oxyhydroxide nanoparticles in parenteral formulations, *J. Inorg. Biochem.*, 98 (2004), 1757-1769.
- [5] E. Somsook, D. Hinsin, P. Buakhrong, R. Teanchai, N. Mophan, M. Pohmakotr, J. Shiowatana, Interactions between iron (III) and sucrose, dextran, or starch in complexes, *Carbohydr. Polym.*, 61 (2005), 281-287.
- [6] Περίληψη των χαρακτηριστικών του προϊόντος - Venofer, Vifor France SA, Άδεια Κυκλοφορίας 50875/10/8-11-11, Ελλάδα (2015).
- [7] Summary of product characteristics – Venofer (iron sucrose), Vifor Pharma UK Limited, Marketing authorization number PL 15240/0001, UK (2016).
- [8] Product Monograph, Venofer (Iron Sucrose injection, USP), Luitpold Pharmaceuticals, Inc., Control number 159456, USA (2013).
- [9] Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων, Εθνικό Συνταγολόγιο, Ελλάδα (2007).
- [10] P. Geisser, S. Burckhardt, The Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Iron Preparations, *Pharmaceutics*, 3 (2011), 12-33.
- [11] D. Crommelin, V. Shah, I. Klebovich, S. McNeil, V. Weinstein, B. Flühmann, S. Mühlebach, J. de Vlieger, The similarity question for biologicals and non-biological complex drugs, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 76 (2015), 10-17.
- [12] M. Praschberger, C. Cornelius, M. Schitegg, H. Goldenberg, B. Scheiber-Mojdehkar, B. Sturm, Bioavailability and stability of intravenous iron sucrose originator versus generic iron sucrose AZAD, *Pharm. Dev. Technol.*, Early Online (2013), 1-7.

- [13] P. Nico, S. Fendorf, Redox Reactions, Kinetics, Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences, Encyclopedia of Soils in the Environment, Elsevier (2005), 372-378.
- [14] Γ. Πνευματικάκης, Χ. Μητσοπούλου, Κ. Μεθενίτης, Βασικές αρχές ανόργανης χημείας, Εκδόσεις Σταμούλη, Ελλάδα (2006).
- [15] Θ. Χατζηγιάννου, Χημική ισορροπία και ανόργανη ποιοτική ημιμικροανάλυση, Ελλάδα (1993).
- [16] Π. Μαχαίρας, Μ. Συμιλλίδου, Φαρμακοκινητική, Ελλάδα (2007).
- [17] T. Barker, Quality by experimental design, Marcel-Dekker, Inc., USA (1985).
- [18] G. Lewis, D. Mathieu, R. Luu, Pharmaceutical experimental design, Marcel-Dekker, Inc., USA (1999).
- [19] D. Montgomery, Design and analysis of experiments, John Wiley & Sons, Inc., USA (1997)
- [20] T. Prvan, D. Street, An annotated bibliography of application papers using certain classes of fractional factorial and related designs, J. Stat. Plan. Inference, 106 (2002), 245-269.
- [21] Guideline Q8 (R2) Pharmaceutical development, International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, ICH (2009)
- [22] Guidance for Industry PAT — A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, USA (2004)
- [23] Δ. Γεωργάκη, Κ. Κουρουπή, Σ. Πολίτης, Δ. Ρέκκας, Διαχείριση ολικής ποιότητας, Εκδόσεις Σιδέρη, Ελλάδα (2010)
- [24] Σ. Πολίτης, Εφαρμογή τεχνικών πειραματικού σχεδιασμού στην ανάπτυξη μιας ταχείας, ευέλικτης και λιτής διεργασίας παραγωγής σφαιριδίων ελεγχόμενης αποδέσμευσης, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Φαρμακευτικής, Ελλάδα (2010)
- [25] Σ. Κατσιβελή, Εφαρμογή τεχνικών πειραματικού σχεδιασμού στην ανάπτυξη μιας λιτής διεργασίας παραγωγής σφαιριδίων άμεσης αποδέσμευσης, Διπλωματική Εργασία, Τμήμα Φαρμακευτικής, Ελλάδα (2011)
- [26] T. Pyzdek, The Six Sigma Handbook, McGraw Hill, USA (2003)

- [27] National Institute of standards and technology, NIST Glossary, USA
<http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/glossary.htm>
- [28] National Institute of standards and technology, NIST/SEMATECH e-handbook, USA
<http://itl.nist.gov/div898/handbook/>
- [29] N. Armstrong, Pharmaceutical experimental design and interpretation, Taylor and Francis Group, LLC, UK (2006)
- [30] F. Yates, Complex experiments, J. R. Stat. Soc., Supplement 2 (1935), 181-247.
- [31] G. Limentani, M. Ringo, F. Ye, M. Bergquist, E. McSorley, Beyond the t-Test: Statistical equivalence testing, Anal. Chem., 77 (2005), 221–226.
- [32] R. Berger, J. Hsu, Bioequivalence Trials, Intersection-Union Tests and Equivalence Confidence Sets, Statistical Science, 11 (1996), 283-319.
- [33] D. Schuirmann, Pharmacometrics: A Comparison of the Two One-Sided Tests Procedure and the Power Approach for Assessing the Equivalence of Average Bioavailability, J. Pharmacokinet. Biopharm., 15 (1987), 657-680.
- [34] W. Westlake, Statistical Aspects of Comparative Bioavailability Trials, Biometrics, 35 (1979), 273-280.
- [35] S. Rani, A. Pargal, Bioequivalence: An overview of statistical concepts, Indian J. Pharmacol., 36 (2004), 209-216.
- [36] B. Jones, P. Jarvis, J. Lewis, A. Ebbutt, Trials to assess equivalence: the importance of rigorous methods, BMJ, 313 (1996), 36-39.
- [37] E. Walker, A. Nowacki, Understanding Equivalence and Noninferiority Testing, J. Gen. Intern. Med., 26 (2011), 192-196.
- [38] Methods and Formulas Manual, Minitab 17.1.0, Minitab Inc. (2013).
- [39] S. Shah, K. Patel, S. Dash, K. Karnik, A. Sehgal, B. Patel, J. Mandal, In-Vitro Method For Testing Bioequivalence Of Iron-Sucrose Formulation, United States Patent, No: US 8,058,076 B2, USA (2011).
- [40] M. Helenek, R. Lange, R. Lawrence, Bioequivalence Test For Iron-Containing Formulations, United States Patent, No: US 7,169,359 B2, USA (2007).
- [41] S. Shah, K. Patel, S. Dash, K. Karnik, A. Sehgal, B. Patel, J. Mandal, In-Vitro Method For Testing Bioequivalence Of Iron-Sucrose Formulation, United States Patent, No: US 2010/0248376 A1, USA (2010).

[42] Overview of comments received on reflection paper on the data requirements for intravenous iron-based nano-colloidal products developed with reference to an innovator medicinal product (EMA/CHMP/SWP/620008/2012), (Committee for medicinal products for human use, CHMP), UK (2014).

[43] M. Jahn, H. Andreasen, S. Futterer, T. Nawroth, V. Schünemann, U. Kolb, W. Hofmeister, M. Munoz, K. Bock, M. Meldal, P. Langguth, A comparative study of the physicochemical properties of iron isomaltoside 1000 (Monofer), a new intravenous iron preparation and its clinical implications, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 78 (2011), 480-491.

Παράρτημα

Πίνακας πειραματικών δεδομένων για πείραμα κινητικής σε σκεύασμα σακχαρούχου σιδήρου (1 επανάληψη).

Time (s)	A_t	$A_t - A_{inf}$	$A_0 - A_{inf}$	% Fe (III)	$\log [(A_t - A_{inf})/(A_0 - A_{inf})]$
0	0,8518	0,7677	0,7677	100,0	0,0000
30	0,8351	0,7510	0,7677	97,8	-0,0096
60	0,8271	0,7430	0,7677	96,8	-0,0142
90	0,8162	0,7321	0,7677	95,4	-0,0206
120	0,8059	0,7218	0,7677	94,0	-0,0268
150	0,7954	0,7113	0,7677	92,7	-0,0331
180	0,7881	0,7040	0,7677	91,7	-0,0376
210	0,7821	0,6980	0,7677	90,9	-0,0413
240	0,7729	0,6888	0,7677	89,7	-0,0471
270	0,7653	0,6812	0,7677	88,7	-0,0519
300	0,7575	0,6734	0,7677	87,7	-0,0569
330	0,7480	0,6639	0,7677	86,5	-0,0631
360	0,7374	0,6533	0,7677	85,1	-0,0701
390	0,7285	0,6444	0,7677	83,9	-0,0760
420	0,7168	0,6327	0,7677	82,4	-0,0840
450	0,7081	0,6240	0,7677	81,3	-0,0900
480	0,6949	0,6108	0,7677	79,6	-0,0993
510	0,6865	0,6024	0,7677	78,5	-0,1053
540	0,6784	0,5943	0,7677	77,4	-0,1112
570	0,6703	0,5862	0,7677	76,4	-0,1171
600	0,6631	0,5790	0,7677	75,4	-0,1225
630	0,6531	0,5690	0,7677	74,1	-0,1301
660	0,6454	0,5613	0,7677	73,1	-0,1360
690	0,6386	0,5545	0,7677	72,2	-0,1413
720	0,6294	0,5453	0,7677	71,0	-0,1486
750	0,6187	0,5346	0,7677	69,6	-0,1572
780	0,6103	0,5262	0,7677	68,5	-0,1640
810	0,5998	0,5157	0,7677	67,2	-0,1728
840	0,5930	0,5089	0,7677	66,3	-0,1786
870	0,5864	0,5023	0,7677	65,4	-0,1842
900	0,5789	0,4948	0,7677	64,5	-0,1908
930	0,5724	0,4883	0,7677	63,6	-0,1965
960	0,5652	0,4811	0,7677	62,7	-0,2030
990	0,5598	0,4757	0,7677	62,0	-0,2079
1020	0,5509	0,4668	0,7677	60,8	-0,2161
1050	0,5412	0,4571	0,7677	59,5	-0,2252
1080	0,5341	0,4500	0,7677	58,6	-0,2320
1110	0,5282	0,4441	0,7677	57,8	-0,2377
1140	0,5205	0,4364	0,7677	56,8	-0,2453
1170	0,5149	0,4308	0,7677	56,1	-0,2509
1200	0,5101	0,4260	0,7677	55,5	-0,2558
1230	0,5001	0,4160	0,7677	54,2	-0,2661
1260	0,4941	0,4100	0,7677	53,4	-0,2724
1290	0,4893	0,4052	0,7677	52,8	-0,2775
1320	0,4831	0,3990	0,7677	52,0	-0,2842
1350	0,4742	0,3901	0,7677	50,8	-0,2940
1380	0,4688	0,3847	0,7677	50,1	-0,3001
1410	0,4625	0,3784	0,7677	49,3	-0,3072
1440	0,4572	0,3731	0,7677	48,6	-0,3134

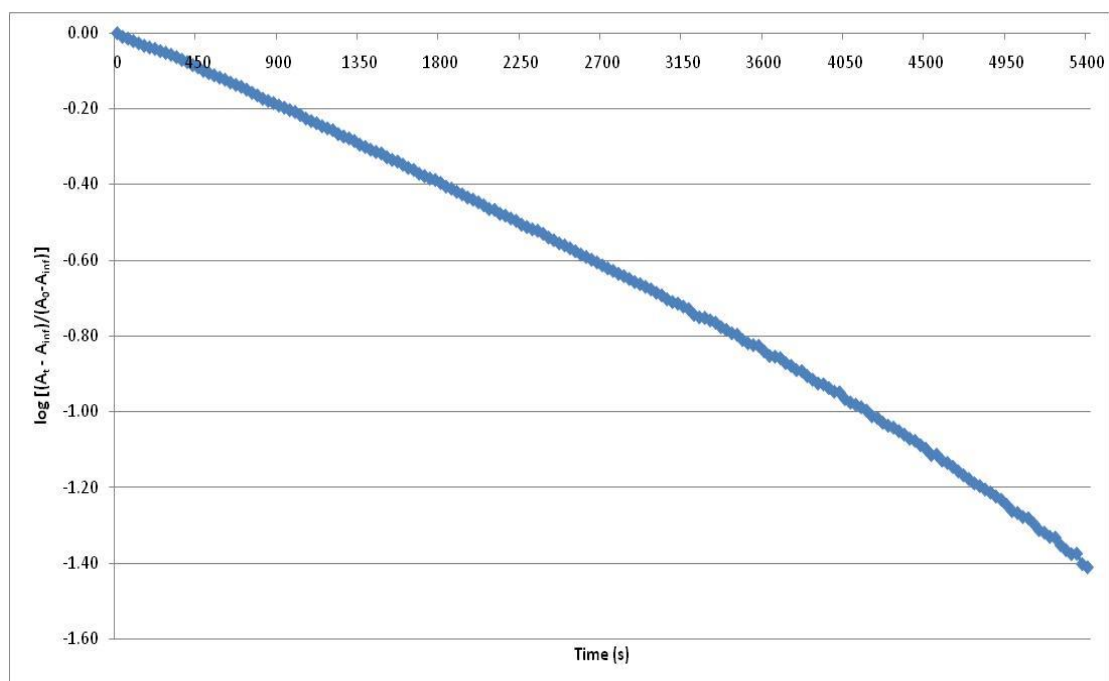
1470	0,4539	0,3698	0,7677	48,2	-0,3172
1500	0,4454	0,3613	0,7677	47,1	-0,3273
1530	0,4397	0,3556	0,7677	46,3	-0,3342
1560	0,4362	0,3521	0,7677	45,9	-0,3385
1590	0,4296	0,3455	0,7677	45,0	-0,3467
1620	0,4228	0,3387	0,7677	44,1	-0,3554
1650	0,4187	0,3346	0,7677	43,6	-0,3607
1680	0,4109	0,3268	0,7677	42,6	-0,3709
1710	0,4064	0,3223	0,7677	42,0	-0,3769
1740	0,4017	0,3176	0,7677	41,4	-0,3833
1770	0,3989	0,3148	0,7677	41,0	-0,3872
1800	0,3932	0,3091	0,7677	40,3	-0,3951
1830	0,3864	0,3023	0,7677	39,4	-0,4048
1860	0,3827	0,2986	0,7677	38,9	-0,4101
1890	0,3770	0,2929	0,7677	38,2	-0,4185
1920	0,3725	0,2884	0,7677	37,6	-0,4252
1950	0,3670	0,2829	0,7677	36,9	-0,4336
1980	0,3634	0,2793	0,7677	36,4	-0,4391
2010	0,3588	0,2747	0,7677	35,8	-0,4463
2040	0,3540	0,2699	0,7677	35,2	-0,4540
2070	0,3479	0,2638	0,7677	34,4	-0,4639
2100	0,3466	0,2625	0,7677	34,2	-0,4661
2130	0,3403	0,2562	0,7677	33,4	-0,4766
2160	0,3376	0,2535	0,7677	33,0	-0,4812
2190	0,3332	0,2491	0,7677	32,4	-0,4888
2220	0,3297	0,2456	0,7677	32,0	-0,4950
2250	0,3239	0,2398	0,7677	31,2	-0,5053
2280	0,3205	0,2364	0,7677	30,8	-0,5115
2310	0,3173	0,2332	0,7677	30,4	-0,5175
2340	0,3152	0,2311	0,7677	30,1	-0,5214
2370	0,3111	0,2270	0,7677	29,6	-0,5292
2400	0,3060	0,2219	0,7677	28,9	-0,5390
2430	0,3024	0,2183	0,7677	28,4	-0,5461
2460	0,2981	0,2140	0,7677	27,9	-0,5548
2490	0,2956	0,2115	0,7677	27,5	-0,5599
2520	0,2919	0,2078	0,7677	27,1	-0,5675
2550	0,2882	0,2041	0,7677	26,6	-0,5753
2580	0,2842	0,2001	0,7677	26,1	-0,5839
2610	0,2812	0,1971	0,7677	25,7	-0,5905
2640	0,2780	0,1939	0,7677	25,3	-0,5976
2670	0,2748	0,1907	0,7677	24,8	-0,6048
2700	0,2714	0,1873	0,7677	24,4	-0,6127
2730	0,2680	0,1839	0,7677	24,0	-0,6206
2760	0,2653	0,1812	0,7677	23,6	-0,6270
2790	0,2620	0,1779	0,7677	23,2	-0,6350
2820	0,2595	0,1754	0,7677	22,8	-0,6412
2850	0,2565	0,1724	0,7677	22,5	-0,6487
2880	0,2533	0,1692	0,7677	22,0	-0,6568
2910	0,2512	0,1671	0,7677	21,8	-0,6622
2940	0,2485	0,1644	0,7677	21,4	-0,6693
2970	0,2460	0,1619	0,7677	21,1	-0,6759
3000	0,2427	0,1586	0,7677	20,7	-0,6849
3030	0,2403	0,1562	0,7677	20,3	-0,6915
3060	0,2365	0,1524	0,7677	19,9	-0,7022
3090	0,2340	0,1499	0,7677	19,5	-0,7094
3120	0,2325	0,1484	0,7677	19,3	-0,7138
3150	0,2299	0,1458	0,7677	19,0	-0,7214
3180	0,2277	0,1436	0,7677	18,7	-0,7280

3210	0,2228	0,1387	0,7677	18,1	-0,7431
3240	0,2207	0,1366	0,7677	17,8	-0,7497
3270	0,2203	0,1362	0,7677	17,7	-0,7510
3300	0,2182	0,1341	0,7677	17,5	-0,7578
3330	0,2163	0,1322	0,7677	17,2	-0,7640
3360	0,2128	0,1287	0,7677	16,8	-0,7756
3390	0,2106	0,1265	0,7677	16,5	-0,7831
3420	0,2081	0,1240	0,7677	16,2	-0,7918
3450	0,2069	0,1228	0,7677	16,0	-0,7960
3480	0,2031	0,1190	0,7677	15,5	-0,8096
3510	0,2008	0,1167	0,7677	15,2	-0,8181
3540	0,1995	0,1154	0,7677	15,0	-0,8230
3570	0,1989	0,1148	0,7677	15,0	-0,8252
3600	0,1952	0,1111	0,7677	14,5	-0,8395
3630	0,1922	0,1081	0,7677	14,1	-0,8514
3660	0,1917	0,1076	0,7677	14,0	-0,8534
3690	0,1907	0,1066	0,7677	13,9	-0,8574
3720	0,1875	0,1034	0,7677	13,5	-0,8707
3750	0,1858	0,1017	0,7677	13,2	-0,8779
3780	0,1832	0,0991	0,7677	12,9	-0,8891
3810	0,1826	0,0985	0,7677	12,8	-0,8918
3840	0,1797	0,0956	0,7677	12,5	-0,9047
3870	0,1776	0,0935	0,7677	12,2	-0,9144
3900	0,1755	0,0914	0,7677	11,9	-0,9242
3930	0,1750	0,0909	0,7677	11,8	-0,9266
3960	0,1730	0,0889	0,7677	11,6	-0,9363
3990	0,1710	0,0869	0,7677	11,3	-0,9462
4020	0,1707	0,0866	0,7677	11,3	-0,9477
4050	0,1672	0,0831	0,7677	10,8	-0,9656
4080	0,1655	0,0814	0,7677	10,6	-0,9746
4110	0,1644	0,0803	0,7677	10,5	-0,9805
4140	0,1632	0,0791	0,7677	10,3	-0,9870
4170	0,1616	0,0775	0,7677	10,1	-0,9959
4200	0,1590	0,0749	0,7677	9,8	-1,0107
4230	0,1582	0,0741	0,7677	9,7	-1,0154
4260	0,1561	0,0720	0,7677	9,4	-1,0279
4290	0,1548	0,0707	0,7677	9,2	-1,0358
4320	0,1540	0,0699	0,7677	9,1	-1,0407
4350	0,1525	0,0684	0,7677	8,9	-1,0501
4380	0,1511	0,0670	0,7677	8,7	-1,0591
4410	0,1494	0,0653	0,7677	8,5	-1,0703
4440	0,1486	0,0645	0,7677	8,4	-1,0756
4470	0,1469	0,0628	0,7677	8,2	-1,0872
4500	0,1455	0,0614	0,7677	8,0	-1,0970
4530	0,1433	0,0592	0,7677	7,7	-1,1129
4560	0,1434	0,0593	0,7677	7,7	-1,1121
4590	0,1413	0,0572	0,7677	7,5	-1,1278
4620	0,1405	0,0564	0,7677	7,3	-1,1339
4650	0,1392	0,0551	0,7677	7,2	-1,1440
4680	0,1377	0,0536	0,7677	7,0	-1,1560
4710	0,1364	0,0523	0,7677	6,8	-1,1667
4740	0,1352	0,0511	0,7677	6,7	-1,1768
4770	0,1339	0,0498	0,7677	6,5	-1,1880
4800	0,1331	0,0490	0,7677	6,4	-1,1950
4830	0,1321	0,0480	0,7677	6,3	-1,2040
4860	0,1312	0,0471	0,7677	6,1	-1,2122
4890	0,1301	0,0460	0,7677	6,0	-1,2224
4920	0,1292	0,0451	0,7677	5,9	-1,2310

4950	0,1278	0,0437	0,7677	5,7	-1,2447
4980	0,1262	0,0421	0,7677	5,5	-1,2609
5010	0,1257	0,0416	0,7677	5,4	-1,2661
5040	0,1247	0,0406	0,7677	5,3	-1,2767
5070	0,1244	0,0403	0,7677	5,2	-1,2799
5100	0,1231	0,0390	0,7677	5,1	-1,2941
5130	0,1216	0,0375	0,7677	4,9	-1,3112
5160	0,1210	0,0369	0,7677	4,8	-1,3182
5190	0,1201	0,0360	0,7677	4,7	-1,3289
5220	0,1199	0,0358	0,7677	4,7	-1,3313
5250	0,1183	0,0342	0,7677	4,5	-1,3512
5280	0,1173	0,0332	0,7677	4,3	-1,3641
5310	0,1165	0,0324	0,7677	4,2	-1,3746
5340	0,1166	0,0325	0,7677	4,2	-1,3733
5370	0,1146	0,0305	0,7677	4,0	-1,4009
5400	0,1140	0,0299	0,7677	3,9	-1,4095
5430	0,1135	0,0294	0,7677	3,8	-1,4168
5460	0,1127	0,0286	0,7677	3,7	-1,4288
5490	0,1117	0,0276	0,7677	3,6	-1,4443
5520	0,1111	0,0270	0,7677	3,5	-1,4538
5550	0,1100	0,0259	0,7677	3,4	-1,4719
5580	0,1097	0,0256	0,7677	3,3	-1,4770
5610	0,1094	0,0253	0,7677	3,3	-1,4821
5640	0,1087	0,0246	0,7677	3,2	-1,4943
5670	0,1076	0,0235	0,7677	3,1	-1,5141
5700	0,1068	0,0227	0,7677	3,0	-1,5292
5730	0,1065	0,0224	0,7677	2,9	-1,5349
5760	0,1061	0,0220	0,7677	2,9	-1,5428
5790	0,1052	0,0211	0,7677	2,7	-1,5609
5820	0,1048	0,0207	0,7677	2,7	-1,5692
5850	0,1033	0,0192	0,7677	2,5	-1,6019
5880	0,1031	0,0190	0,7677	2,5	-1,6064
5910	0,1026	0,0185	0,7677	2,4	-1,6180
5940	0,1016	0,0175	0,7677	2,3	-1,6422
5970	0,1001	0,0160	0,7677	2,1	-1,6811
6000	0,1000	0,0159	0,7677	2,1	-1,6838
6030	0,1001	0,0160	0,7677	2,1	-1,6811
6060	0,0988	0,0147	0,7677	1,9	-1,7179
6090	0,0993	0,0152	0,7677	2,0	-1,7033
6120	0,0983	0,0142	0,7677	1,8	-1,7329
6150	0,0975	0,0134	0,7677	1,7	-1,7581
6180	0,0971	0,0130	0,7677	1,7	-1,7712
6210	0,0963	0,0122	0,7677	1,6	-1,7988
6240	0,0957	0,0116	0,7677	1,5	-1,8207
6270	0,0959	0,0118	0,7677	1,5	-1,8133
6300	0,0944	0,0103	0,7677	1,3	-1,8724
6330	0,0946	0,0105	0,7677	1,4	-1,8640
6360	0,0942	0,0101	0,7677	1,3	-1,8809
6390	0,0946	0,0105	0,7677	1,4	-1,8640
6420	0,0936	0,0095	0,7677	1,2	-1,9075
6450	0,0930	0,0089	0,7677	1,2	-1,9358
6480	0,0928	0,0087	0,7677	1,1	-1,9457
6510	0,0911	0,0070	0,7677	0,9	-2,0401
6540	0,0912	0,0071	0,7677	0,9	-2,0339
6570	0,0906	0,0065	0,7677	0,8	-2,0723
6600	0,0908	0,0067	0,7677	0,9	-2,0591
6630	0,0906	0,0065	0,7677	0,8	-2,0723
6660	0,0906	0,0065	0,7677	0,8	-2,0723

6690	0,0901	0,0060	0,7677	0,8	-2,1070
6720	0,0889	0,0048	0,7677	0,6	-2,2040
6750	0,0881	0,0040	0,7677	0,5	-2,2831
6780	0,0878	0,0037	0,7677	0,5	-2,3170
6810	0,0877	0,0036	0,7677	0,5	-2,3289
6840	0,0875	0,0034	0,7677	0,4	-2,3537
6870	0,0867	0,0026	0,7677	0,3	-2,4702
6900	0,0865	0,0024	0,7677	0,3	-2,5050
6930	0,0866	0,0025	0,7677	0,3	-2,4873
6960	0,0857	0,0016	0,7677	0,2	-2,6811
6990	0,0863	0,0022	0,7677	0,3	-2,5428
7020	0,0851	0,0010	0,7677	0,1	-2,8852
7050	0,0847	0,0006	0,7677	0,1	-3,1070
7080	0,0847	0,0006	0,7677	0,1	-3,1070
7110	0,0842	0,0001	0,7677	0,0	-3,8852
7140	0,0841	0,0000	0,7677	0,0	
7170	0,0835	-0,0006	0,7677	-0,1	
7200	0,0841	0,0000	0,7677	0,0	

Απεικόνιση της καμπύλης παλινδρόμησης



Πίνακας αποτελεσμάτων γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης

Αποτελέσματα γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης στην εξίσωση B1 για το χρονικό διάστημα 0 – 90 min	
Κλίση (a)	-0,0002544
Τομή (b)	0,04924
Συντελεστής προσδιορισμού (R ²)	0,995
Συντελεστής συσχέτισης (r)	- 0,998
Πρωτοταξική σταθερά k _{obs} (min ⁻¹)	0,03516
Χρονικό διάστημα T ₇₅ (min)	44,5