



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου HPLC για ποσοτικό προσδιορισμό και έλεγχο προσμίξεων του βαλπροϊκού νατρίου και προσδιορισμό EDTA σε ενέσιμο διάλυμα

**ΔΗΜΟΥ ΑΡΓΥΡΩ-ΙΩΑΝΝΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ
ΙΟΥΛΙΟΣ 2017**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου HPLC για ποσοτικό προσδιορισμό και έλεγχο προσμίξεων του βαλπροϊκού νατρίου και προσδιορισμό EDTA σε ενέσιμο διάλυμα

ΔΗΜΟΥ ΑΡΓΥΡΩ-ΙΩΑΝΝΑ

A.M.: 11203

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Μιχαήλ Κουτπάρης, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μιχαήλ Κουτπάρης, Καθηγητής Τμήματος Χημείας ΕΚΠΑ

Νικόλαος Θωμαΐδης, Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Χημείας ΕΚΠΑ

Αναστάσιος Οικονόμου, Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Χημείας ΕΚΠΑ

ΙΟΥΛΙΟΣ 2017

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα ερευνητική εργασία έγινε ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδων για τον προσδιορισμό του βαλπροϊκού νατρίου και των προσμίξεων του και του δινάτριου άλατος EDTA, σε φαρμακευτικό σκεύασμα. Το βαλπροϊκό οξύ ανήκει στην κατηγορία των καρβοξυλικών οξέων. Συνήθως συνιστάται η χρήση του για την αντιμετώπιση της επιληψίας και γενικότερα ως σταθεροποιητής διάθεσης σε διάφορες ψυχιατρικές ασθένειες.

Οι μέθοδοι βασίζονται στην τεχνική της υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων. Για τον προσδιορισμό του βαλπροϊκού νατρίου και των προσμίξεων του χρησιμοποιήθηκε στήλη BDS Hypersil C18 με ισοκρατική έκλουση. Η κινητή φάση περιείχε μεθανόλη και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με $pH=5,0$. Η ροή της κινητής φάσης ρυθμίστηκε στο $1,0 \text{ mL}/\text{min}$, ενώ το μήκος κύματος ποσοτικοποίησης ρυθμίστηκε στα 210 nm . Για τον προσδιορισμό του δινάτριου άλατος EDTA (μετα την παραγωγωποίηση με Cu^{+2}) χρησιμοποιήθηκε στήλη Spherisorb ODS2, κινητή φάση που περιείχε ακετονιτρίλιο και υδροξείδιο του τετραβουτυλαμμωνίου με $pH=6,5$, ροή στα $2,0 \text{ mL}/\text{min}$ και μήκος κύματος 254 nm , στο οποίο ανιχνεύεται το σύμπλοκο του EDTA με το δισθενή χαλκό.

Κατά την επικύρωση των μεθόδων αξιολογήθηκαν οι παράμετροι της γραμμικότητας, της ακρίβειας, της ειδικότητας, της πιστότητας και της ανθεκτικότητας, καθώς και τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Φαρμακευτική Ανάλυση

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: βαλπροϊκό νάτριο, δινάτριο άλας EDTA, προσμίξεις, HPLC, επικύρωση μεθόδων

ABSTRACT

In this research project three HPLC methods with photodiode array detector for the determination of sodium valproate and its related substances and disodium edetate were developed and validated. Valproic acid is a carboxylic acid and commonly used for the treatment of epilepsy and as a mood stabilizing agent for a variety of psychiatric disorders.

For the sodium valproate and its related substances a BDS Hypersil C18 column with isocratic elution was applied using mobile phase consisting of a mixture of phosphate buffer pH=5,0 and methanol. The flow rate was 1,0 *ml/min* and the quantification wavelength was set at 210 nm. For the disodium edetate a Spherisorb ODS2 column was used, with isocratic elution using a mobile phase consisting of acetonitrile and tetrabutylammonium hydroxide solution with *pH*= 6,5, flow rate at 2,0 *mL/min* and the quantification wavelength was set at 254 *nm*.

For the validation of all the developed methods analytical characteristics, such as linearity, accuracy, specificity, precision and robustness were investigated, along with detection and quantification limits.

SUBJECT AREA: Pharmaceutical Analysis

KEYWORDS: sodium valproate, disodium edetate, impurities, HPLC, method validation

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος ειδίκευσης «Αναλυτική Χημεία» στο εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή Μιχαήλ Κουππάρη για την πολύτιμη καθοδήγησή, την εμπιστοσύνη και κατανόηση που έδειξε στο προσωπό μου καθώς και τους ερευνητικούς συνεργάτες Αικατερίνη Γκρεμιλογιάννη, Χριστίνα Τσώλη και Ειρήνη Φέγκα για την πολύτιμη συμβολή τους στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	20
1.1 Εισαγωγή στην HPLC	20
1.2 Αρχή της τεχνικής	20
1.3 Οργανολογία HPLC	21
1.4 Χαρακτηριστικές παράμετροι και χαρακτηριστικά απόδοσης χρωματογραφικού διαχωρισμού	22
1.5 Είδη χρωματογραφίας	27
1.5.1 Χρωματογραφία κατανομής κανονικής φάσης.....	27
1.5.2 Χρωματογραφία κατανομής αντίστροφης φάσης.....	28
1.6 Διάχυση επιφάνειας στην αντίστροφη φάσης υγρή χρωματογραφία	31
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΛΕΓΧΟΥ ΦΑΡΜΑΚΩΝ.....	34
2.1 Αξιολόγηση.....	34
2.1.1 Ακρίβεια (Accuracy)	35
2.1.2 Πιστότητα (Precision).....	35
2.1.3 Ευαισθησία (Sensitivity).....	37
2.1.4 Ανιχνευσιμότητα (Detectability).....	37
2.1.5 Εκλεκτικότητα (Selectivity) / Ειδικότητα (Specificity).....	38
2.1.6 Αντοχή (Ruggedness) και Ανθεκτικότητα (Robustness)	39
2.2 Επικύρωση μεθόδου.....	39
2.2.1 Ειδικότητα (Specificity) / Εκλεκτικότητα (Selectivity).....	42
2.2.2 Γραμμικότητα (Linearity)	44
2.2.3 Περιοχή Συγκεντρώσεων (Range)	46
2.2.4 Όριο Ανίχνευσης /Όριο Ποσοτικοποίησης (LOD / LOQ)	46

2.2.5 Ακρίβεια (Accuracy)	48
2.2.6 Πιστότητα (Precision)	50
3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ Βαλπροϊκό νάτριο	52
3.1 Ονοματολογία και χημική δομή	52
3.2 Ιστορική αναδρομή	52
3.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες.....	53
3.4 Βαλπροϊκό οξύ και τα ανάλογα του	53
3.5 Δομή και λειτουργία των νευρικών κυττάρων	53
3.6 Μηχανισμοί αντιεπιληπτικών φαρμάκων	55
3.7 Πεδία μελέτης και παρενέργειες	57
3.8 Μέθοδοι προσδιορισμού	59
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΣΚΟΠΟΣ	61
4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ Εξοπλισμός - Αντιδραστήρια.....	62
5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού της δραστικής ουσίας βαλπροϊκό νάτριο σε ενέσιμο διάλυμα	65
5.1 Ανάπτυξη μεθόδου	65
5.2 Επιλογή χρωματογραφικών παραμέτρων για την προς επικύρωση μέθοδο ..	65
5.3 Επικύρωση μεθόδου.....	66
5.3.1 Παρασκευή διαλυμάτων.....	66
5.3.1.1 Πρότυπο διάλυμα βαλπροϊκού νατρίου	66
5.3.1.2 Αραιωμένο ορθοφωσφορικό οξύ 10%	66
5.3.1.3 Διάλυμα ελέγχου (test solution)	66
5.3.2 Διάλυμα καταλληλότητας συστήματος (system suitability solution)	66
5.3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός	67
5.4 Πρωτόκολλο επικύρωσης- Αποτελέσματα	67

5.4.1	Ειδικότητα	67
5.4.2	Γραμμικότητα	69
5.4.3	Εύρος	73
5.4.4	Πιστότητα.....	74
5.4.5	Ακρίβεια	76
5.4.6	Ανθεκτικότητα	78
5.5	Συμπέρασμα.....	80
6.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού δινάτριου άλατος EDTA (disodium edetate) σε ενέσιμο διάλυμα βαλπροϊκού νατρίου	81
6.1	Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού EDTA.....	81
6.2	Επιλογή χρωματογραφικών παραμέτρων για την προς επικύρωση μέθοδο ..	81
6.3	Επικύρωση μεθόδου.....	82
6.3.1	Παρασκευή διαλυμάτων	82
6.3.1.1	Πρότυπο διάλυμα δινάτριου άλατος EDTA.....	82
6.3.1.2	Διάλυμα 0,02% δισθενούς νιτρικού χαλκού	82
6.3.1.3	Διάλυμα ελέγχου (test solution)	82
6.3.1.4	Έλεγχος καταλληλότητας συστήματος	82
6.3.2	Ποσοτικός προσδιορισμός	83
6.4	Πρωτόκολλο επικύρωσης- Αποτελέσματα	83
6.4.1	Ειδικότητα	83
6.4.2	Γραμμικότητα	85
6.4.3	Εύρος	87
6.4.4	Πιστότητα	88
6.4.5	Ακρίβεια	89
6.4.6	Ανθεκτικότητα	91
6.5	Συμπέρασμα.....	95

7. ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού προσμίξεων του βαλπροϊκού νατρίου σε ενέσιμο διάλυμα	96
7.0 Εισαγωγή.....	96
7.1 Ανάπτυξη μεθόδου	98
7.2 Επιλογή χρωματογραφικών παραμέτρων για την προς επικύρωση μέθοδο	100
7.3 Επικύρωση μεθόδου.....	100
7.3.1 Παρασκευή διαλυμάτων.....	100
7.3.1.1 Πρότυπο διάλυμα 0,10%.....	100
7.3.1.2 Διάλυμα ελέγχου (test solution)	100
7.3.1.3 Αραιωμένο όρθο-φωσφορικό οξύ 10%.....	100
7.3.1.4 Διάλυμα καταλληλότητας συστήματος (system suitability solution)	101
7.3.2 Ποσοτικός προσδιορισμός	101
7.4 Πρωτόκολλο επικύρωσης- Αποτελέσματα	102
7.4.1 Ειδικότητα.....	102
7.4.2 Γραμμικότητα	105
7.4.3 Εύρος	106
7.4.4 Πιστότητα.....	111
7.4.5 Ακρίβεια	112
7.4.6 Όριο ανίχνευσης	115
7.4.7 Όριο ποσοτικοποίησης.....	116
7.4.8 Ανθεκτικότητα	115
7.5 Συμπέρασμα.....	117
8. ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ.....	118
9. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	123
10. ΑΝΑΦΟΡΕΣ	125

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Χρωματογράφημα placebo από μελέτη ειδικότητας στον ποσοτικού προσδιορισμού βαλπροϊκού.	68
Σχήμα 2: Χρωματογράφημα διαλύματος ελέγχου καταλληλότητας συστήματος στον ποσοτικό προσδιορισμό βαλπροϊκού	68
Σχήμα 3: Φάσμα ελέγχου καθαρότητας της κορυφής του βαλπροϊκού	69
Σχήμα 4: Γραφική παράσταση της καμπύλης βαθμονόμησης για το βαλπροϊκό	72
Σχήμα 5: Διαγραμματική απεικόνιση υπολοίπων καμπύλης βαθμονόμησης του βαλπροϊκού	72
Σχήμα 6: Χρωματογράφημα placebo από μελέτη ειδικότητας στον προσδιορισμό EDTA	84
Σχήμα 7: Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος EDTA	84
Σχήμα 8: Γραφική παράσταση καμπύλης βαθμονόμησης για τον προσδιορισμό EDTA	87
Σχήμα 9: Διαγραμματική απεικόνιση υπολοίπων καμπύλης για τον προσδιορισμό EDTA	87
Σχήμα 10: Χρωματογράφημα διαλύματος γνωστών προσμίξεων.....	102
Σχήμα 11: Χρωματογράφημα μεθυλο-βαλερικού οξέος	103
Σχήμα 12: Χρωματογράφημα αμιδίου βαλπροϊκού οξέος.....	104
Σχήμα 13: Διαγραμματική απεικόνιση της καμπύλης βαθμονόμησης για την πρόσμιξη C	108
Σχήμα 14: Διαγραμματική απεικόνιση υπολοίπων για την πρόσμιξη C	108
Σχήμα 15: Καμπύλη αναφοράς του βαλπροϊκού στον έλεγχο προσμίξεων	110

Σχήμα 16: Διαγραμματική απεικόνιση υπολοίπων για το βαλπροϊκό στον έλεγχο προσμίξεων	110
--	-----

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Αντίδραση σιλανολικών ομάδων με οργανοχλωριωμένο σιλάνιο.....	28
Εικόνα 2: Μεταφορά μάζας που πραγματοποιείται στο εσωτερικό πόρου πληρωτικού υλικού.....	30
Εικόνα 3: Διάγραμμα εξάρτησης του H από την ταχύτητα ροής	31
Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση των θερμοδυναμικών ιδιοτήτων που σχετίζονται με την κατακράτηση και την επιφανειακή διάχυση σε δείγμα μορίων στην επιφάνεια της στατικής φάσης.....	33
Εικόνα 5: Χημική δομή του 2-προπυλοπεντανοϊκό νάτριο.....	52
Εικόνα 6: Δομή νευρώνα	54
Εικόνα 7: Νευρικό σήμα ανάμεσα στις συνάψεις.....	55
Εικόνα 8: Διαγραμματική απεικόνιση ροής ιόντων στις προσυναπτικές νευρικές απολήξεις	56
Εικόνα 9: Δομή EDTA.....	81

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Έκταση αξιολόγησης αναλυτικών μεθόδων για επικύρωση.....	41
Πίνακας 2: Αποτελέσματα ελέγχου γραμμικότητας για τον ποσοτικό προσδιορισμό βαλπροϊκού	71
Πίνακας 3: Αποτελέσματα πιστότητας για τον ποσοτικό προσδιορισμό βαλπροϊκού νατρίου	75
Πίνακας 4: Αποτελέσματα ακρίβειας για τον ποσοτικό προσδιορισμό βαλπροϊκού	77
Πίνακας 5: Παράγοντες ανθεκτικότητας για τον ποσοτικό προσδιορισμό βαλπροϊκού νατρίου	78
Πίνακας 6: Πειράματα ανθεκτικότητας για τον ποσοτικό προσδιορισμό βαλπροϊκού....	78
Πίνακας 7: Αποτελέσματα διαχωριστότητας ανάμεσα στις κορυφές βαλπροϊκού και της πρόσμιξης C	79
Πίνακας 8: Αποτελέσματα σταθερότητας βαλπροϊκού σε διάλυμα ημέρας και μετά από 24 ώρες για τον ποσοτικό προσδιορισμό του βαλπροϊκού	79
Πίνακας 9: Αποτελέσματα %λόγων ανακτήσης που προκύπτουν από διάλυμα ημέρας και του ίδιου μετά από 24 ώρες	80
Πίνακας 10: Αποτελέσματα γραμμικότητας για τον προσδιορισμό του EDTA	86
Πίνακας 11: Αποτελέσματα πιστότητας για τον προσδιορισμό του EDTA.....	89
Πίνακας 12: Αποτελέσματα ακρίβειας για τον προσδιορισμό του EDTA.....	91
Πίνακας 13: Παράγοντες ανθεκτικότητας για τον προσδιορισμό του EDTA.....	92
Πίνακας 14: Πειράματα ανθεκτικότητας για τον προσδιορισμό του EDTA	92
Πίνακας 15: Αποτελέσματα ανθεκτικότητας για τον προσδιορισμό του EDTA.....	93

Πίνακας 16: Αποτελέσματα σταθερότητας δειγμάτων ελέγχου EDTA	94
Πίνακας 17: Αποτελέσματα % λόγων ανακτήσης διαλυμάτων EDTA	94
Πίνακας 18: Προσμίξεις βαλπροϊκού νατρίου σύμφωνα με την ευρωπαϊκή φαρμακοποιία	96
Πίνακας 19: Δοκιμές βελτιστοποίησης της συγκέντρωσης εργασίας στον έλεγχο γραμμικότητας	98
Πίνακας 20: Δοκιμές παρασκευής βέλτιστων διαλυμάτων εργασίας.....	99
Πίνακας 21: Βελτιστοποίηση όγκου έγχυσης.....	99
Πίνακας 22: Παράγοντες απόκρισης προσμίξεων βαλπροϊκού νατρίου	101
Πίνακας 23: Χρόνοι ανάσχεσης προσμίξεων βαλπροϊκού νατρίου	103
Πίνακας 24: Σχετικοί χρόνοι ανάσχεσης προσμίξεων βαλπροϊκού νατρίου	105
Πίνακας 25: Αποτελέσματα γραμμικότητας, εύρους και επαναληψιμότητας για την πρόσμιξη C.....	107
Πίνακας 26: Αποτελέσματα γραμμικότητας για το βαλπροϊκό νάτριο στον προσδιορισμό προσμίξεων	109
Πίνακας 27: Αποτελέσματα πιστότητας στον προσδιορισμό προσμίξεων	112
Πίνακας 28: Αποτελέσματα ακρίβειας προσδιορισμού της πρόσμιξης C σε εμβολιασμένα δείγματα στον προσδιορισμό προσμίξεων	114
Πίνακας 29: Παράγοντες ανθεκτικότητας στον προσδιορισμό προσμίξεων.....	115
Πίνακας 30: Πειράματα ανθεκτικότητας στον προσδιορισμό προσμίξεων	116
Πίνακας 31: Αποτελέσματα ανθεκτικότητας διαλύματος στον προσδιορισμό προσμίξεων	116

Πίνακας 32: Αποτελέσματα %λόγων ανάκτησης που προκύπτουν από διάλυμα ημέρας και του ίδιου μετά από 24 ώρες	117
Πίνακας 33: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων.....	118

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

1.1 Εισαγωγή στην HPLC (1,2)

Από την εποχή που ο Ρώσος βοτανολόγος Mikhail Tswett, στις αρχές του εικοστού αιώνα, χρησιμοποίησε ένα γυάλινο σωλήνα γεμάτο με εξαιρετικά λεπτόκοκκη κιμωλία για να διαχωρίσει φυτικές χρωστικές, όπως είναι οι ξανθοφύλλες και οι χλωροφύλλες, μέχρι τις μέρες μας οι χρωματογραφία έχει εξελιχθεί σε μία πανίσχυρη τεχνική διαχωρισμού.

Η υγροχρωματογραφία υψηλής πίεσης ή υψηλής απόδοσης (HPLC) χρησιμοποιείται στη φαρμακευτική βιομηχανία για τις αξιολογήσεις μιας μεγάλης ποικιλίας δειγμάτων. Είναι μία τεχνική κατάλληλη για έλεγχο προσμίξεων, αξιολόγηση νέων συνθέσεων και διεξαγωγή ελέγχου ποιότητας τελικού προϊόντος.

Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί βασίζονται στην εξαναγκασμένη διέλευση ενός υγρού μεταφέροντας τον αναλύτη διαμέσου του πληρωτικού υλικού και στις διαφορές των αλληλεπιδράσεων των αναλυτών με την επιφάνεια αυτού του μέσου που προκύπτουν σε διαφορετικούς χρόνους της μετανάστευσης των διάφορων συστατικών.

1.2 Αρχή της τεχνικής (2,3)

Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με μερισμό των συστατικών μεταξύ δύο μη μιγνυόμενων φάσεων, μιας στατικής και μιας κινητής. Ο διαχωρισμός βασίζεται στις διαφορές, που υπάρχουν σε ορισμένες ιδιότητες των συστατικών ενός μίγματος, όπως είναι η πολικότητα, τα ηλεκτρικά φορτία (για ιοντικές ενώσεις), το μέγεθος των μορίων, κλπ. Οι διαφορές αυτές διαφοροποιούν τη σχετική φυσικοχημική συγγένεια κάθε συστατικού προς τις δύο φάσεις.

Ορισμένη ποσότητα δείγματος, προστίθεται στην κινητή φάση στην κορυφή ή αρχή της στήλης. Καθώς το δείγμα μετακινείται στη στήλη, τα συστατικά του μερίζονται, με κάποιο μηχανισμό, μεταξύ της στατικής και κινητής φάσεως. Τα κλάσμα κάθε συστατικού που βρίσκεται στην κινητή φάση, μετακινείται στη στήλη, ερχόμενο σε επαφή με το νέο τμήμα της στατικής φάσης, οπότε συμβαίνει νέος μερισμός. Κατά τον ίδιο χρόνο, το κλάσμα του συστατικού, που βρισκόταν στη στατική φάση, έρχεται σε επαφή με νέο τμήμα της κινητής φά-

σης, οπότε υφίσταται περαιτέρω μερισμό. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται πολλές φορές, καθώς διαβιβάζεται συνεχώς, και συνήθως με σταθερή παροχή, νέα κινητή φάση στη στήλη. Τα συστατικά μετακινούνται μέσα από τη στήλη, μόνο όταν βρίσκονται στην κινητή φάση και η ταχύτητα μετακινήσεώς τους εξαρτάται από το κλάσμα του χρόνου παραμονής τους σε αυτή, το οποίο είναι συνάρτηση του συντελεστή μερισμού τους στις δύο φάσεις. Έτσι, συστατικά με διαφορετικούς συντελεστές μερισμού θα μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες μέσα από τη στήλη, με αποτέλεσμα να διαχωρίζονται σε ζώνες. Στο τέλος τα διαχωρισμένα συστατικά εξέρχονται από τη στήλη, όπου μπορούν να ανιχνευθούν ή και να συλλεγούν.

Η βάση της χρωματογραφίας εκλούσεως είναι ο μερισμός των συστατικών ενός δείγματος μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσεως, η οποία είναι μία διαδικασία ισορροπίας, που περιγράφεται με το λόγο ή συντελεστή μερισμού K , που ορίζεται με τη σχέση:

$$K = \frac{C_S}{C_M} [1]$$

όπου C_S είναι η γραμμομοριακή συγκέντρωση της ουσίας στη στατική φάση και C_M η γραμμομοριακή συγκέντρωση της ουσίας στην κινητή φάση. Η σταθερά K ονομάζεται σταθερά κατανομής (μερισμού) της ουσίας.

1.3 Οργανολογία HPLC (2)

Ένα τυπικό σύστημα HPLC αποτελείται από τα εξής τμήματα:

1. Φιάλες διαλυτών (solvent reserver): αποθήκη επαρκούς ποσότητας HPLC διαλυτών για τη διαρκή λειτουργία του συστήματος. Συνηθίζεται να εξοπλίζεται με ένα σύστημα απαερωτή (degasser) και ειδικών φίλτρων έτσι ώστε να απομονωθεί κάθε είδους επίδραση του περιβάλλοντος και των σωματιδίων των διαλυτών.
2. Αντλία (pump): αυτή παρέχει συνεχή και διαρκή ροή της κινητής φάσης στο χρωματογραφικό σύστημα. Πιο σύγχρονες αντλίες επιτρέπουν ελεγχόμενη ανάμιξη διαλυτών από διαφορετικές φιάλες. Οι διακυμάνσεις στην πίεση πρέπει να ελαχιστοποιούνται για παράδειγμα με τη διέλευση του πεπιεσμένου διαλύτη μέσω μιας συσκευής παλμών απόσβεσης. Οι

- σωληνώσεις και οι συνδέσεις είναι ικανά να αντέχουν τις πιέσεις από το σύστημα άντλησης.
3. Δειγματολήπτης (injector): επιτρέπουν την εισαγωγή μίγματος αναλυτών στη ροή της κινητής φάσης πριν εισέλθουν στη στήλη χρησιμοποιώντας ένα έγχυμα, σύστημα το οποίο μπορεί να λειτουργήσει σε υψηλή πίεση. Σύγχρονοι δειγματολήπτες είναι αυτόματοι και επιτρέπουν προγραμματισμένες ενέσεις διαφορετικών όγκων των δειγμάτων από φιαλίδια (vials).
 4. Στήλη (column): είναι η καρδιά του χρωματογραφικού συστήματος διότι διαχωρίζει τους αναλύτες από ένα μίγμα. Η στήλη είναι ο χώρος όπου η κινητή φάση βρίσκεται σε επαφή με τη στατική φάση, σχηματίζοντας μία επιφάνεια με πολύ μεγάλο εμβαδόν. Τα τελευταία χρόνια μέρος της ανάπτυξης της χρωματογραφίας αφιερώθηκε στο σχεδιασμό ώστε να ενισχυθεί η διεπιφανειακή επαφή.
 5. Ανιχνευτής: αυτή η συσκευή επιτρέπει τη συνεχή παρακολούθηση φυσικοχημικών ιδιοτήτων των εκλουσμάτων της στήλης. Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής στη φαρμακευτική ανάλυση είναι ο φωτομετρικός ανιχνευτής UV (ultraviolet), ο οποίος επιτρέπει τη συνεχή καταγραφή της απορρόφησης σε ένα δεδομένο μήκος κύματος ή εύρους μηκών κύματος (πολυδιαυλική ανίχνευση, ανιχνευτές σειράς φωτοδιόδων, DAD). Η εμφάνιση του αναλύτη στην κυψελίδα του ανιχνευτή προκαλεί αλλαγή στην απορρόφηση. Αν ο αναλύτης απορροφά περισσότερο από το υπόβαθρο (κινητή φάση), λαμβάνεται θετικό σήμα.
 6. Καταγραφέας-σύστημα ελέγχου και επεξεργασίας αποτελεσμάτων: λογισμικό σε υπολογιστή, το οποίο ελέγχει το σύστημα της HPLC (σύσταση κινητής φάσης που θα εισέλθει στο χρωματογραφικό σύστημα, θερμοκρασία, σειρά ενέσεων) και συλλέγει δεδομένα από τον ανιχνευτή για τις δημιουργίες χρωματογραφημάτων.

1.4 Χαρακτηριστικές παράμετροι και χαρακτηριστικά απόδοσης χρωματογραφικού διαχωρισμού (2,4)

Αυτή η ενότητα περιέχει ορισμούς και υπολογισμούς των πιο κοινών παραμέτρων και γενικά αποδεκτών απαιτήσεων για τον έλεγχο καταλληλότητας συστήματος (system suitability).

Χρόνος και όγκος ανάσχεσης (retention time and retention volume): ως χρόνος ανάσχεσης (t_R) ορίζεται ο χρόνος όπου εμφανίζεται το μέγιστο μιας κορυφής σε ένα χρωματογράφημα. Από το χρόνο ανάσχεσης υπολογίζεται ο όγκος ανάσχεσης (V_R) σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

$$V_R = u \times t_R [2]$$

όπου u η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης και t_R ο χρόνος ανάσχεσης ή η απόσταση κατά μήκος της γραμμής βάσης από το σημείο της ένεσης μέχρι την κάθετο που διέρχεται από το μέγιστο της κορυφής που αντιστοιχεί στο προσδιοριζόμενο συστατικό.

Λόγος κατανομής μάζας (mass distribution ratio), ο λόγος κατανομής μάζας (D_m) (επίσης γνωστός ως παράγοντας χωρητικότητας ή παράγοντας κατακράτησης) ορίζεται ως:

$$D_m = \frac{\text{ποσότητα διαλύτη στη στατική φάση}}{\text{ποσότητα διαλύτη στη κινητή φάση}} = K_C \frac{V_S}{V_M} [3]$$

- K_C = συντελεστής ισορροπίας κατανομής ή συντελεστής κατανομής (μερισμού)
- V_S = όγκος στατικής φάσης
- V_M = όγκος κινητής φάσης

Ο λόγος κατανομής μάζας μπορεί να προσδιοριστεί από το χρωματογράφημα σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

$$D_m = \frac{t_R - t_M}{t_M} [4]$$

όπου, t_R ο χρόνος ανάσχεσης ή η απόσταση κατά μήκος της γραμμής βάσης από το σημείο της ένεσης μέχρι την κάθετο που διέρχεται από το μέγιστο της κορυφής που αντιστοιχεί στο προσδιοριζόμενο συστατικό και t_M ο νεκρός χρόνος ή όγκος (χρόνος ή απόσταση κατά μήκος της γραμμής βάσης από το σημείο της ένεσης μέχρι την κάθετο που διέρχεται από το μέγιστο της κορυφής η οποία αντιστοιχεί σε μη κατακρατούμενη ουσία).

Παράγοντας συμμετρίας (symmetry factor ή tailing factor). Ο παράγοντας συμμετρίας μίας κορυφής υπολογίζεται από την έκφραση:

$$A = \frac{W_{0,05}}{2d} [5]$$

Όπου $W_{0,05}$ είναι το εύρος κορυφής στο ένα εικοστό του συνολικού ύψους της κορυφής και d η απόσταση ανάμεσα στην κάθετο που διέρχεται από το μέγιστο του ύψους της κορυφής και το άκρο στο ένα εικοστό του ύψους της κορυφής.

Απόδοση της στήλης: Η απόδοση της στήλης μπορεί να υπολογίζεται από δεδομένα που λαμβάνονται κάτω από τις ίδιες συνθήκες, ανάλογα με την τεχνική, από τον αριθμό των θεωρητικών πλακών. Κατά τη μετακίνηση της ζώνης του δείγματος στη χρωματογραφική στήλη, η κατανομή των μορίων γύρω από το κέντρο της ζώνης συνεχώς αυξάνει αναλογικά με τη διανυθείσα εντός της στήλης απόσταση. Αυτό προκαλεί διεύρυνση της ζώνης η οποία είναι ανεπιθύμητη στη χρωματογραφία λόγω μείωσης της ικανότητας (αποτελεσματικότητας ή αποδοτικότητας) της στήλης να διαχωρίσει. Η διεύρυνση αυτή οφείλεται στη διάχυση των μορίων του αναλύτη και εξαρτάται από το συντελεστή διάχυσης της ουσίας καθώς και από το χρόνο παραμονής στη στήλη. Το κλάσμα των μορίων το οποίο διαχέεται είναι ανάλογο της βαθμίδας συγκέντρωσης, καθώς και του συντελεστή διάχυσης. Μέτρο της διασποράς των μορίων ή των ιόντων των ουσιών κατά τη διέλευσή τους από τη στήλη αποτελεί ο αριθμός των θεωρητικών πλακών N ή παράμετρος N .

Υπολογίζεται με δεδομένα που λαμβάνονται σε ισοκρατικές συνθήκες, από τον τύπο:

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_h} \right)^2 [6]$$

t_R : όπως περιγράφεται παραπάνω, W_h : εύρος κορυφής στο μισό του ύψους.

Ο παράγοντας εκλεκτικότητας (α) αποτελεί ποσοτικό μέτρο της εκλεκτικότητας της χρωματογραφικής στήλης δηλαδή της ικανότητας αυτής να διακρίνει δύο συστατικά μεταξύ τους. Για δύο ουσίες A και B ο παράγοντας εκλεκτικότητας ορίζεται ως:

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} [7]$$

όπου K_A και K_B οι συντελεστές κατανομής των ουσιών.

Η ουσία Β είναι η ισχυρότερα κατακρατούμενη και έτσι εξ ορισμού ο παράγοντας εκλεκτικότητας είναι πάντα μεγαλύτερος της μονάδας. Όταν $\alpha = 1$ πρακτικά σημαίνει πως οι δύο ουσίες συνεκλούνται. Η τιμή του παράγοντα εκλεκτικότητας εξαρτάται από τη φύση της στατικής και της κινητής φάσης, την αναλογία των φάσεων και τη θερμοκρασία της στήλης. Επιπλέον η αύξηση της τιμής α επιτυγχάνεται και με τη μεταβολή του pH της κινητής φάσης εφόσον οι προς διαχωρισμό ουσίες ιοντίζονται.

Ο παράγοντας εκλεκτικότητας προσδιορίζεται από δεδομένα κατακράτησης σύμφωνα με την παρακάτω σχέση:

$$\alpha = \frac{K'_B}{k'_A} [8]$$

όπου k' ο συντελεστής κατακράτησης,

Η διαχωριστική ικανότητα R_s μιας στήλης αποτελεί ένα ποσοτικό μέτρο της ικανότητάς της να διαχωρίσει δύο αναλύτες. Η διαχωριστικότητα (resolution) (R_s) ανάμεσα στις κορυφές δύο συστατικών υπολογίζεται από την έκφραση:

$$R_s = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}} [9]$$

όπου ο χρόνος ανάσχεσης του δεύτερου συστατικού είναι μεγαλύτερος από του πρώτου και w_{h1} , w_{h2} είναι τα εύρη κορυφών στο μισό του ύψους. Διαχωριστικότητα τάξης 1,5, θεωρείται ικανοποιητική εφόσον οι κορυφές από τη γραμμή βάσης είναι διαχωρισμένες.

Ο λόγος ύψος κορυφής προς κοιλάδα (peak to valley ratio), $\left(\frac{p}{v} = \frac{H_p}{H_v}\right)$, εφαρμόζεται ως κριτήριο της σταθερότητας του συστήματος για προσμίξεις, όταν ο διαχωρισμός της γραμμής βάσης δύο κορυφών δεν είναι ικανοποιητικός.

- H_p : ύψος υπεράνω προέκτασης γραμμής βάσης της μικρής κορυφής
- H_v : ύψος υπεράνω προέκτασης γραμμής βάσης του χαμηλότερου σημείου της κοιλάδας που χωρίζει τη μικρή και μεγάλη κορυφή

Ο λόγος σήμα προς θόρυβο (signal to noise) επηρεάζει την πιστότητα της ποσοτικοποίησης και υπολογίζεται:

$$\frac{S}{N} = \frac{2H}{h} [10]$$

όπου H είναι το ύψος κορυφής που αντιστοιχεί στο συστατικό μετρούμενο από τη ζώνη της γραμμής βάσης του σήματος που παρατηρήθηκε σε μία απόσταση ίση με είκοσι φορές το εύρος του μισού ύψους και h είναι το φάσμα του θορύβου υποβάθρου σε ένα χρωματογράφημα που λαμβάνεται μετά από μία ένεση ή την εισαγωγή ενός λευκού δείγματος, παρατηρούμενο σε μία απόσταση ίση με είκοσι φορές το εύρος του μισού ύψους της κορυφής από ένα διάλυμα αναφοράς και τοποθετείται γύρω από την περιοχή που υπάρχει η κορυφή.

Η επαναληψιμότητα (repeatability) ($RSD\%$) μίας διαδοχικής σειράς ενέσεων από ένα διάλυμα αναφοράς, υπολογίζεται με τη βοήθεια της παρακάτω έκφρασης:

$$RSD\% = \frac{100}{\bar{y}} \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n - 1}} \quad [11]$$

y_i : μεμονομένες μεταβλητές εκφρασμένες ως εμβαδόν κορυφής, ύψος κορυφής, ή λόγος εμβαδών από εσωτερική επικυρωμένη μέθοδο, \bar{y} : μέσος όρος μεμονωμένων μεταβλητών, n : πλήθος μεμονωμένων μεταβλητών

Η μέγιστη επιτρεπόμενη σχετική απόκλιση στην περίπτωση ανάλυσης με HPLC πρώτης ύλης υπολογίζεται από μία σειρά ενέσεων του διαλύματος αναφοράς για συγκεκριμένα όρια χρησιμοποιώντας την ακόλουθη έκφραση:

$$RSD\% = \frac{KB\sqrt{n}}{t_{90\%,n-1}} \quad [12]$$

K : σταθερά ίση με 0,349 υπολογιζόμενη από την έκφραση:

$$K = \frac{0,6}{\sqrt{2}} \times \frac{t_{90\%,5}}{\sqrt{6}} \quad [13]$$

όπου $\frac{0,6}{\sqrt{2}}$ αντιπροσωπεύει το απαιτούμενο $RSD\%$ μετά από έξι ενέσεις για $B=1,0$.

B : είναι το ανώτερο επιτρεπόμενο όριο το οποίο δίνεται από την μονογραφία πρώτης ύλης μείον το 100%.

n : πλήθος των διαδοχικών ενέσεων του διαλύματος αναφοράς ($3 \leq n \leq 6$)
 $t_{90\%,n-1}$: το t Student's σε πιθανότητα 90% δύο άκρων με $n-1$ βαθμούς ελευθερίας.

1.5 Είδη χρωματογραφίας

Το κύριο χαρακτηριστικό που καθορίζει την ταυτότητα κάθε τεχνικής, είναι ο τύπος των μοριακών αλληλεπιδράσεων που χρησιμοποιούνται. Υπάρχουν τρεις βασικοί τύποι μοριακών δυνάμεων: ιοντικές δυνάμεις (χρωματογραφία ιονανταλλαγής), πολικές δυνάμεις (χρωματογραφία κατανομής κανονικής φάσης) και δυνάμεις διασποράς (χρωματογραφία κατανομής αντίστροφης φάσης).

1.5.1 Χρωματογραφία κατανομής κανονικής φάσης (2)

Η HPLC κανονικής φάσης βασίζεται στις διαφορές στη δύναμη των πολικών αλληλεπιδράσεων των αναλυτών στο μίγμα με τη στατική φάση. Όσο πιο ισχυρή είναι η αλληλεπίδραση του αναλύτη με τη στατική φάση, τόσο περισσότερο κατακρατείται ο αναλύτης. Όπως συμβαίνει σε κάθε υγροχρωματογραφική τεχνική, η κανονικής φάσης HPLC είναι μία ανταγωνιστική διαδικασία. Τα μόρια του αναλύτη ανταγωνίζονται τα μόρια της κινητής φάσης ως προς τα σημεία αλληλεπίδρασης στην επιφάνεια της στατικής φάσης. Όσο ισχυρότερες είναι οι αλληλεπιδράσεις της κινητής φάσης με τη στατική, τόσο ασθενέστερες είναι οι αλληλεπιδράσεις της στατικής φάσης με τον αναλύτη και, επομένως, τόσο μικρότερη η κατακράτηση του αναλύτη.

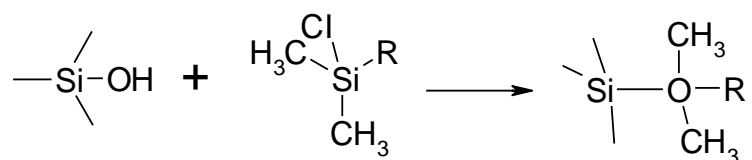
Οι κινητές φάσεις στην κανονικής φάσης HPLC είναι μη πολικοί διαλύτες (εξάνιο, επτάνιο κ.ά.) με μία μικρή προσθήκη πολικού τροποποιητή (μεθανόλη, αιθανόλη κ.ά.). Μεταβολή της συγκέντρωσης του πολικού τροποποιητή στην κινητή φάση επιτρέπει τον έλεγχο της κατακράτησης του αναλύτη στη στήλη. Τυπικά πολικά πρόσθετα είναι οι αλκοόλες (μεθανόλη, αιθανόλη ή ισοπροπανόλη), οι οποίες προστίθενται στην κινητή φάση σε σχετικά μικρές ποσότητες. Εφόσον οι δυνάμεις που επικρατούν είναι κυρίως πολικές και αυτές οι δυνάμεις είναι σχετικά ισχυρές, συνήθως αρκεί μεταβολή του πολικού τροποποιητή σε ποσοστό 1% v/v, για να οδηγήσει σε σημαντική αλλαγή στο χρόνο κατακράτησης του αναλύτη.

Η επιλογή του κατάλληλου τύπου HPLC εξαρτάται από τη διαλυτότητα του αναλύτη σε συγκεκριμένες κινητές φάσεις. Εφόσον στην HPLC κανονικής φάσης χρησιμοποιούνται κυρίως μη πολικοί διαλύτες, επιλέγεται ως χρωματογραφική τεχνική για τον προσδιορισμό εξαιρετικά υδρόφοβων ενώσεων, οι οποίες είναι αδιάλυτες σε πολικούς ή υδατικούς διαλύτες.

1.5.2 Χρωματογραφία κατανομής αντίστροφης φάσης (2,6)

Η HPLC αντίστροφης φάσης είναι μακράν το πιο δημοφιλές είδος χρωματογραφίας. Σχεδόν το 90% των αναλύσεων δειγμάτων μικρού μοριακού βάρους, πραγματοποιούνται με αυτήν. Ένας από τους βασικούς λόγους για την τεράστια δημοτικότητα της, είναι η ικανότητά της να διαχωρίζει ενώσεις που σχετίζονται άμεσα και η ευκολία της διακύμανσης στην κατακράτηση και στην εκλεκτικότητα.

Στην υγροχρωματογραφία κατανομής αντίστροφης φάσης η στατική φάση αποτελείται συνήθως από αλυσίδες υδρογονανθράκων χημικά συνδεδεμένων πάνω σε υλικό πλήρωσης από σωματίδια διοξειδίου του πυριτίου. Το πλέγμα του διοξειδίου του πυριτίου αποτελείται από άτομα πυριτίου τα οποία συνδέονται με γέφυρες οξυγόνου και στην επιφάνεια του πλέγματος υπάρχουν ελεύθερες σιλανολικές ομάδες $-SiOH$. Η χημικά συνδεδεμένη φάση προκύπτει με αντίδραση των σιλανολικών ομάδων με ένα οργανοχλωριωμένο σιλάνιο, σύμφωνα με την αντίδραση που περιγράφεται παρακάτω. Συνήθως η ομάδα R είναι το κανονικό δεκαοκτύλιο. Συχνά ακολουθεί επιπλέον αντίδραση με χλωροτριμεθυλο-σιλάνιο για την κάλυψη των ελευθέρων ομάδων σιλανόλης (endcapping), οι οποίες δεν αντέδρασαν λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης από την ομάδα R και οι οποίες προκαλούν ανεπιθύμητη πολικότητα στην επιφάνεια της στατικής φάσης.



Εικόνα 1: Αντίδραση των σιλανολικών ομάδων με ένα οργανοχλωριωμένο σιλάνιο

Υπάρχουν πολλοί τύποι στατικών φάσεων στην υγροχρωματογραφία όπως:

(5)

Σίλικα, αλουμίνα ή πορώδης γραφίτης, οι οποίες χρησιμοποιούνται σε κανονικής φάσης διαχωρισμούς που βασίζονται σε διαφορές στην προσρόφηση ή και σε κατανομή μάζας.

Ρητίνες ή πολυμερή με όξινες ή βασικές ομάδες οι οποίες χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία ιονανταλλαγής, στην οποία ο διαχωρισμός βασίζεται στον ανταγωνισμό μεταξύ των ιόντων που διαχωρίζονται και εκείνων που βρίσκονται στην κινητή φάση.

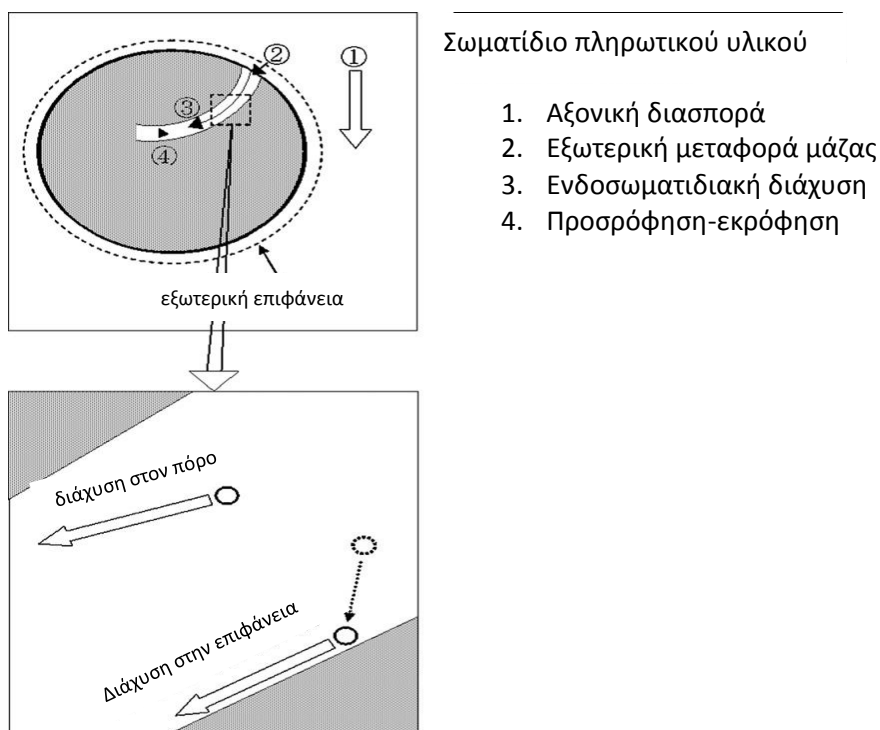
Πορώδης σίλικα ή πολυμερή που χρησιμοποιούνται στην χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, στην οποία ο διαχωρισμός βασίζεται στις διαφορές των όγκων των μορίων που αντιστοιχούν σε στερεοχημικούς αποκλεισμούς.

Μία μεγάλη ποικιλία από χημικά τροποποιημένα υλικά στήριξης παρασκευασμένα από πολυμερή, σίλικα ή πορώδη γραφίτη τα οποία χρησιμοποιούνται στην αντίστροφης φάσης χρωματογραφία, όπου σε αυτήν την περίπτωση ο διαχωρισμός βασίζεται στην κατανομή των μορίων μεταξύ κινητής και στατικής φάσης.

Ειδικά χημικά τροποποιημένες στατικές φάσεις, όπως παράγωγα κυτταρίνης ή αμυλόζης, πρωτεΐνες ή πεππίδια, κυκλοδεξτρίνες με σκοπό το διαχωρισμό εναντιομερών (chiral chromatography). Οι στήλες είναι πληρωμένες με πορώδη σωματίδια προσροφητικού υλικού, οι περισσότερες από τις οποίες είναι κατασκευασμένες από πλήρως πορώδεις γέλες πυριτίας, η επιφάνεια των οποίων είναι χημικά τροποποιημένη με σιλανολικές ομάδες ποικίλων υποκαταστατών. Το μεγάλο πλεονέκτημα των πόρων είναι το μεγάλο εμβαδόν επιφάνειας το οποίο παρέχει σημαντική κατακράτηση. Σημαντικό μειονέκτημα είναι ότι τα μόρια του αναλύτη πρέπει να μεταναστεύσουν από άκρη σε άκρη μεταξύ των πόρων του πληρωτικού υλικού επειδή θέσεις προσρόφησης έχουν τοποθετηθεί στο εσωτερικό των τοίχων των μεσο-πόρων και μικρο-πόρων. Το μέγεθος πόρου καθορίζει την ικανότητα των μορίων της αναλυόμενης ουσίας να διεισδύουν στο εσωτερικό του σωματιδίου και να αλληλεπιδρούν με την εσωτερική επιφάνεια. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό, καθώς η αναλογία της εξωτερικής επιφάνειας των σωματιδίων προς το εσωτερικό είναι 1:1000. Η ενδοσωματιδιακή μεταφορά μάζας στο υλικό πλήρωσης ελέγχει την διεύρυνση ζώνης και την αποδοτικότητα της στήλης. Η διάχυση στην επιφάνεια συμ-

βάλει σημαντικά στην ενδοσωματιδιακή μεταφορά μάζας στην αντίστροφη φάση υδροχρωματογραφία.

Το παρακάτω σχήμα απεικονίζει τα φαινόμενα μεταφοράς μάζας που συμβαίνουν μέσα σε μία στήλη και στα σωματίδια του πληρωτικού υλικού. Σύμφωνα με τις γενικές αρχές της χρωματογραφίας η διεύρυνση της ζώνης κορυφής οφείλεται σε τέσσερις κινητικές διαδικασίες όπως φαίνονται και στην εικόνα.



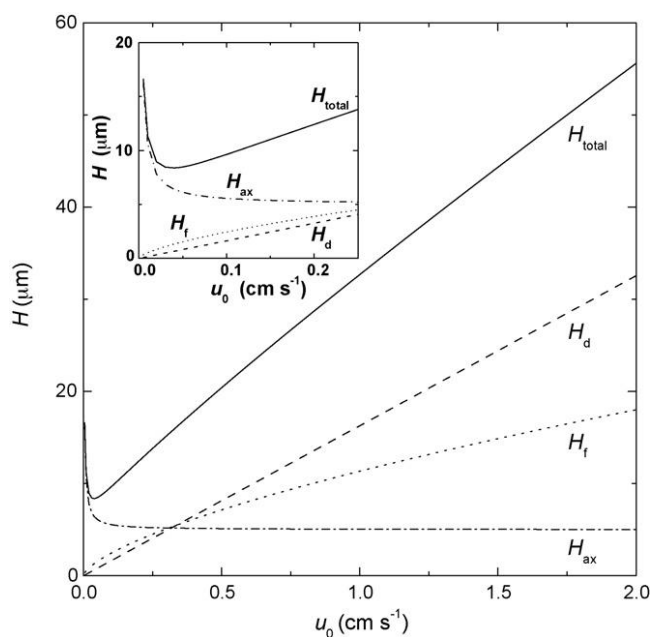
Εικόνα 2: Μεταφορά μάζας που πραγματοποιείται στο εσωτερικό πόρου πληρωτικού υλικού. (7)

- Αξονική διασπορά (H_{ax}).
- Εξωτερική μεταφορά μάζας των μορίων του αναλύτη ανάμεσα στην κινητή φάση και του διαλύματος που περιβάλλει το σωματίδιο (H_f).
- Διάχυση μετανάστευσης μέσα στα σωματίδια διαμέσου των πόρων, ενδοσωματιδιακή διάχυση (H_d).
- Προσρόφηση και εκρόφηση στις θέσεις προσρόφησης που βρίσκονται στην στατική φάση (H_{ads}).

Η πιο συμβατική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε σε μελέτες κινητικής χρωματογραφίας συνίσταται στην ανάλυση της εξάρτησης του H της στήλης (ύψος ισοδύναμο προς μία θεωρητική πλάκα) από την ταχύτητα ροής της κινητής

φάσης. Η εξάρτηση του ύψους από τον ρυθμό ροής παρέχει πληροφορίες για την κινητική μεταφοράς μάζας στη στήλη και τη στατική φάση.

Η συνεισφορά του H_{ads} στο H_{total} αγνοείται συχνά στην αντίστροφης φάσης υγροχρωματογραφία επειδή ο ρυθμός προσρόφησης είναι πολύ γρήγορος στη φυσική προσρόφηση. Παρακάτω φαίνεται η συνεισφορά του H_{ax} στο H_{total} να μειώνεται με την αύξηση της ροής, αν και τα H_f και H_d αυξάνονται με την αύξηση της ροής. Το H_d είναι μεγαλύτερο από το H_f υπό την επίδραση μεγάλης ροής. Η επίδραση του H_d στο H_{total} πρέπει να μελετηθεί λεπτομερώς διότι διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην κινητική μεταφοράς μάζας στις στατικές φάσεις τις RPLC.



Εικόνα 3: Διάγραμμα εξάρτησης του H από την ταχύτητα ροής. (6)

1.6 Διάχυση στη επιφάνεια στην αντίστροφης φάσης υγρή χρωματογραφία (6)

Τα μόρια του αναλύτη όπως περιγράφηκε παραπάνω μεταναστεύουν κατά μήκος των σωματιδίων του πληρωτικού υλικού με δύο τρόπους είτε κατά μήκος του πορώδους υλικού είτε διαχέονται στην επιφάνεια.

Κινητική περιγραφή

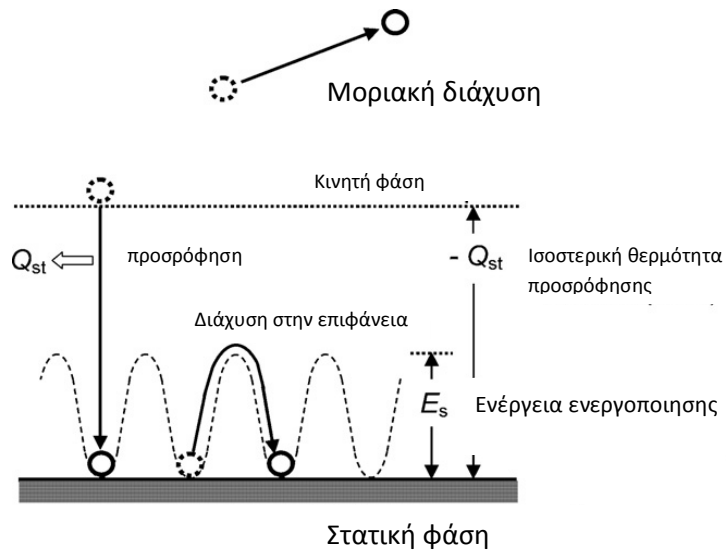
Όταν τα μόρια διαχέονται στους πόρους, τα μόρια διαχέονται με τη βοήθεια της κινητής φάσης στα σημεία των πόρων που επικαλύπτονται με κινητή φάση υπό την επίδραση της βαθμίδωσης συγκέντρωσης. Καμία αλληλεπίδραση δεν συμβαίνει μεταξύ των μορίων και των τοιχωμάτων στο εσωτερικό των πόρων. Όμως, τα μόρια που έχουν προσροφηθεί στα σημεία των τοιχωμάτων αυτών, στη συνέχεια μπορούν να διαχυθούν στην επιφάνεια, ενώ παραμένουν σε προσροφημένη κατάσταση. Η βαθμίδωση της συγκέντρωσής τους, ενώ είναι προσροφημένα αποτελεί την κινητήρια δύναμη για να ακολουθήσει η διάχυση στην επιφάνεια. Η ροή μάζας J_S του προσροφημένου υλικού μετακινούμενου μέσω της επιφανειακής διάχυσης δίνεται από τον παρακάτω τύπο:

$$J_S = -D_S p_p \frac{dq}{dx} [14]$$

όπου p_p είναι η πυκνότητα του πληρωτικού υλικού, q είναι η συγκέντρωση του προσροφημένου υλικού που βρίσκεται σε ισορροπία με την κινητή φάση και x είναι η απόσταση. Ο συντελεστής D_S στη χρωματογραφία χρησιμοποιείται ως κινητική παράμετρος και σχετίζεται με την διάχυση στη στατική φάση.

Θερμοδυναμική περιγραφή (7)

Όταν τα μόρια προσροφηθούν με τη βοήθεια ενός διαλύματος σε μια στατική φάση μία ποσότητα ενέργειας απελευθερώνεται μέσω θερμότητας και η ενθαλπία αλλάζει συνήθως αρνητικά. Αυτό το ποσό θερμότητας καλείται ισοστερική θερμότητα προσρόφησης, Q_{ST} . Ως εκ τούτου απαιτείται ένα ποσό θερμότητας ίσο με το προηγούμενο προκειμένου να απελευθερωθεί από τη στατική φάση το μόριο. Όμως, τα προσροφούμενα μόρια έχουν τη δυνατότητα να μεταναστεύουν, ενώ είναι προσδεμένα στη στατική φάση. Η μετανάστευση στην προσροφημένη επιφάνεια καλείται διάχυση στη επιφάνεια. Το σχήμα παρουσιάζει μερικά θερμοδυναμικά χαρακτηριστικά της προσρόφησης και της επιφανειακής διάχυσης.



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση των θερμοδυναμικών ιδιοτήτων που σχετίζονται με την κατακράτηση και επιφανειακή διάχυση σε δείγμα μορίων στην επιφάνεια της στατικής φάσης. (7)

Όταν τα προσροφημένα μόρια αποκτήσουν μία ενέργεια ενεργοποίησης (E_s) ίση με το ενεργειακό φράγμα που ορίζουν δύο θέσεις προσρόφησης, τότε μεταναστεύουν σε μία παρακείμενη θέση. Στην παραπάνω εικόνα παριστάνονται οι θερμοδυναμικές ιδιότητες που σχετίζονται με την κατακράτηση και την επιφανειακή διάχυση σε μόρια που βρίσκονται στη στατική φάση. Δεν είναι απαραίτητο η E_s να είναι μεγαλύτερη από την Q_{ST} δεδομένου ότι για να διαχυθεί ένα προσροφημένο μόριο δεν χρειάζεται να έχει εκροφηθεί τελείως.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΛΕΓΧΟΥ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

2.1 Αξιολόγηση (8)

Ως χαρακτηριστικά ποιότητας (quality characteristics) μιας μεθόδου, θεωρούνται οι παράμετροι, ιδιότητες, ή τα κριτήρια που εμφανίζει μια αναλυτική μέθοδος κατά την εφαρμογή της στην ανάλυση ενός δείγματος, επιτρέποντας να αξιολογηθεί για την καταλληλότητά της για τον σκοπό για τον οποίο έχει αναπτυχθεί.

Τα χαρακτηριστικά ποιότητας, κατά κανόνα ποσοτικοποιούν την καταλληλότητα της μεθόδου έτσι, ώστε να επιτρέπουν:

1. Τη βελτιστοποίηση κατά το στάδιο της ανάπτυξης της μεθόδου.
2. Τη σύγκριση μεταξύ των μεθόδων πριν την επιλογή για την επίλυση ενός αναλυτικού προβλήματος.
3. Την αποδοχή της μεθόδου από μία επιστημονική ένωση ή φορέα ως μέθοδο επιλογής/ρουτίνας.
4. Την επικύρωση για σκοπούς διαπίστευσης και αποδοχής από κανονιστικές αρχές.

Στη συνέχεια παρατίθενται τα κυριότερα χαρακτηριστικά ποιότητας μιας μεθόδου HPLC:

- (1) Ακρίβεια (accuracy)
- (2) Πιστότητα (precision)
- (3) Ευαισθησία (sensitivity)
- (4) Ανιχνευσιμότητα (Detectability)
- (5) Ειδικότητα/ Εκλεκτικότητα (Selectivity/ Specificity)
- (6) Αντοχή/Ανθεκτικότητα (Ruggedness / Robustness)

2.1.1 Ακρίβεια (Accuracy)

Η ακρίβεια εκφράζει τη διαφορά (σφάλμα, error ή bias) μεταξύ της πειραματικής τιμής x_i και της πραγματικής τιμής μ και περιλαμβάνει το άθροισμα τυχαίου και συστηματικού σφάλματος. Χρησιμοποιείται επίσης και για τη διαφορά μεταξύ του μέσου όρου μιας σειράς μετρήσεων και της τιμής μ . Για μία μέτρηση, η ακρίβειά της εκφράζεται με την απόλυτη διαφορά μετρούμενης και πραγματικής τιμής και είναι:

$$e_i = x_i - \mu \quad [15]$$

το οποίο αναλύεται ως εξής:

$$e_i = (x_i - \bar{x}) + (\bar{x} - \mu) \quad [16]$$

Όπου η πρώτη διαφορά είναι το τυχαίο σφάλμα (μέτρο της πιστότητας) και η δεύτερη είναι το συστηματικό σφάλμα (μέτρο της ορθότητας).

Η αποδεκτή τιμή μ μπορεί να ληφθεί:

- α) από ειδικά παρασκευασμένα εμβολιασμένα (spiked) δείγματα,
- β) από τα αποτελέσματα μιας άλλης μεθόδου γνωστής ακρίβειας και επαναληψιμότητας, και
- γ) από υλικό αναφοράς (reference material) γνωστής ή γενικά αποδεκτής σύνθεσης.

Με την ακρίβεια της αναλυτικής μεθόδου σχετίζεται και η έννοια της ανάκτησης (recovery), η οποία υπολογίζεται ως το %κλάσμα $[\Delta C_{\text{ευρεθέν}} / \Delta C_{\text{προστεθέν}}]$ σε ενισχυμένο λευκό ή θετικό δείγμα. Η ανάκτηση μπορεί να υπολογιστεί και ως ο λόγος των κλίσεων των καμπυλών βαθμονόμησης χρησιμοποιώντας σειρά ενισχυμένων λευκών δειγμάτων και καθαρών διαλυμάτων του αναλύτη.

2.1.2 Πιστότητα (Precision)

Η πιστότητα έχει περιγραφεί με πολλούς διαφορετικούς τρόπους και δεν υπάρχει ένας μοναδικός αποδεκτός ορισμός. Ένας από τους αποδεκτούς ορισμούς ονομάζει πιστότητα τη διασπορά (dispersion) των αποτελεσμάτων μίας σειράς ανεξάρτητων, διαδοχικών μετρήσεων σε ένα δείγμα.

Είναι κοινή πρακτική στην περιγραφή της πιστότητας να λαμβάνουμε υπόψιν μόνο τις πηγές που προκαλούν τυχαίες διακυμάνσεις (random fluctuations) στη μεθοδολογία. Επειδή η αναλυτική μεθοδολογία παρέχει αποτελέσματα που σχετίζονται με τη σύνθεση του δείγματος, η διασπορά των αποτελεσμάτων θα βρίσκεται γύρω από την αναμενόμενη τιμή του αποτελέσματος εάν δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα (bias). Στην ανάλυση η διασπορά είναι τέτοια έτσι, ώστε να μπορεί να περιγραφεί ως μία τυχαία κατανομή (normal distribution) ή κατανομή gauss. Όταν τα αποτελέσματα δεν κατανέμονται κανονικά, ένας απλός μετασχηματισμός συνήθως παράγει μία κανονική κατανομή.

Ο παραπάνω ορισμός ωστόσο δεν διευκρινίζει αν οι μετρήσεις γίνονται στις ίδιες ή σε διαφορετικές συνθήκες. Ανάλογα λοιπόν με τις συνθήκες κάτω από τις οποίες διενεργούνται οι μετρήσεις και σύμφωνα με το Διεθνή Οργανισμό Προτυποποίησης (ISO) υπάρχουν οι εξής ορισμοί:

Επαναληψιμότητα (repeatability) ονομάζεται η εγγύτητα των αποτελεσμάτων που προέκυψαν με την ίδια μέθοδο, το ίδιο δείγμα και τις ίδιες συνθήκες (χειριστής, συσκευή, χρονική περίοδος, εργαστήριο). Τα μέτρα επαναληψιμότητας συμβολίζονται με r .

Αναπαραγωγιμότητα (reproducibility) ονομάζεται η εγγύτητα των αποτελεσμάτων που προέκυψαν με την ίδια μέθοδο, το ίδιο δείγμα, κάτω από διαφορετικές συνθήκες (χειριστής, συσκευή, χρονική περίοδος, εργαστήριο). Ειδικότερα η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα ονομάζεται και ενδιάμεση πιστότητα. Τα μέτρα αναπαραγωγιμότητας συμβολίζονται με R .

Η πιστότητα συνδέεται με το τυχαίο σφάλμα και περιγράφεται ποσοτικά από την τυπική απόκλιση (Standard Deviation, SD ή s) και τη διακύμανση/διασπορά (Variance, s^2).

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad [17]$$

Εκτός της τυπικής απόκλισης s ή SD, που έχει μονάδες τις μονάδες των επιμέρους αποτελεσμάτων (π.χ. mg/mL , $\mu g/mL$, ppm , %), ως μέτρο της πιστότητας χρησιμοποιείται και η σχετική τυπική απόκλιση (Relative Standard Deviation, RSD) ή συντελεστής μεταβλητότητας ή διακύμανσης (Coefficient of variation, CV) που είναι καθαρός αριθμός:

$$\text{RSD}\% = \frac{s}{x} [18]$$

$$\text{RSD}\% = \text{CV} = 100 \frac{s}{x} [19]$$

2.1.3 Ευαισθησία (Sensitivity)

Η ευαισθησία και η ανιχνευσιμότητα είναι δύο έννοιες που συχνά συγχέονται, ενώ στην πραγματικότητα αντιπροσωπεύουν δύο εντελώς διαφορετικές έννοιες. Μια διαδικασία, όπως είναι μία αναλυτική μέθοδος με ένα εισαγόμενο και ένα ή δύο εξαγόμενα δεδομένα, μπορεί να χαρακτηριστεί από την ευαισθησία S , που είναι ο λόγος του ποσοτικού εξαγόμενου δεδομένου (σήμα) (y) προς το εισαγόμενο (x), για δεδομένη περιοχή. Η ευαισθησία εκφράζει τη μεταβολή του σήματος προς τη μεταβολή της συγκέντρωσης του αναλύτη και έχει μονάδες σήματος προς συγκέντρωση. Αυτό συμβαίνει διότι το y (σήμα) αποτελείται από ένα τμήμα το οποίο εξαρτάται από το x (συγκέντρωση, ποσότητα) και ένα τμήμα ανεξάρτητο του x (λευκό). Δηλαδή ισχύει ότι:

$$S(x, y) = dy/dx [20]$$

όπου y η αναλυτική παράμετρος και dx η συγκέντρωση για την περιοχή τιμών x και y όπου ισχύει η σχέση αυτή. Η περιοχή για την οποία υπάρχει ευαισθησία S και έχει μία σαφή τιμή, καλείται δυναμική περιοχή της μεθόδου.

Ο ορισμός αυτός ουσιαστικά σημαίνει ότι η ευαισθησία είναι η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης που λαμβάνεται κατά τη διάρκεια ενός προσδιορισμού.

2.1.4 Ανιχνευσιμότητα (Detectability)

Όταν ένα δείγμα περιέχει ένα αναλύτη σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση, κατά τον προσδιορισμό του αναλύτη με μία μέθοδο, το αναλυτικό σήμα κατά κανόνα θα είναι πολύ μικρό. Έτσι είναι δύσκολο να αποφασισθεί εάν το πολύ μικρό αναλυτικό σήμα προέρχεται από τον αναλύτη ή από τον αναπόφευκτο θόρυβο (σήμα υποβάθρου) που προκαλείται από τη μέθοδο ή το όργανο. Αυτή η αβεβαιότητα δημιούργησε την ανάγκη καθιέρωσης του ορίου ανιχνεύσεως (limit of detection, LOD).

Η ανιχνευσιμότητα εκφράζει την ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύει και να ποσοτικοποιεί χαμηλές συγκεντρώσεις του αναλύτη. Η ικανότητα αυτή ποσοτικοποιείται με δύο εκφράσεις:

Όριο Ανίχνευσης (Detection Limit, DL ή LOD):

Ορίζεται ως η ελάχιστη συγκέντρωση αναλύτη που μπορεί να ανιχνευθεί αξιόπιστα και η οποία είναι στατιστικά διαφορετική από το σήμα του λευκού και δίνεται από τον τύπο:

$$LOD = 3,3 \frac{\sigma}{S} [21]$$

όπου σ η τυπική απόκλιση των μετρήσεων του λευκού ή ενός αραιού δείγματος και S η ευαισθησία της μεθόδου.

Όριο Ποσοτικοποίησης (Quantitation Limit, QL ή LOQ):

Ορίζεται ως η ελάχιστη συγκέντρωση αναλύτη που μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με συγκεκριμένη ακρίβεια και ορθότητα και ισχύει:

$$LOQ = 10 \frac{\sigma}{S} [22]$$

Ο ορισμός αυτών των ορίων βασίζεται στην ικανότητα της μεθόδου να διακρίνει το σήμα του αναλύτη από το σήμα του υποβάθρου ή θορύβου και τα επιτρεπόμενα σφάλματα πρώτου και δεύτερου βαθμού.

2.1.5 Εκλεκτικότητα (Selectivity) / Ειδικότητα (Specificity)

Εκλεκτικότητα αναλυτικής μεθόδου ονομάζεται η ικανότητά της να προσδιορίζει μία ομάδα αναλυτών παρουσία άλλων συστατικών. Τα συστατικά αυτά μπορεί να είναι προσμίξεις, συστατικά της μήτρας, προϊόντα αποικοδόμησης συστατικών. Είναι προφανές ότι αποτελεί μία από τις πλέον σημαντικές παραμέτρους κατά τη διεξαγωγή ενός προσδιορισμού, αφού αν μία μέθοδος δεν μπορεί να προσδιορίσει αποκλειστικά τον ζητούμενο αναλύτη, δεν είναι δυνατό να παράγει ορθά και αξιόπιστα αποτελέσματα.

Ωστόσο, είναι δυνατό να αυξηθεί η εκλεκτικότητα μεθόδου, με εφαρμογή πρόσθετων σταδίων κατά την ανάλυση, για παράδειγμα παραγωγοποίηση. Αν μία μέθοδος προσδιορίζει ένα μόνο αναλύτη παρουσία άλλων συστατικών, τότε ονομάζεται ειδική.

2.1.6 Αντοχή (Ruggedness) και Ανθεκτικότητα (Robustness)

Η αντοχή μεθόδου αναφέρεται στο κατά πόσο μία μέθοδος μπορεί να παρέχει αξιόπιστα αποτελέσματα μετά από μικρές τυχαίες μεταβολές σε παραμέτρους που σχετίζονται άμεσα με τον προσδιορισμό, όπως πειραματικές συνθήκες και ρυθμίσεις του οργάνου. Αντιστοιχεί στον όρο αναπαραγωγιμότητα, καθώς προκύπτει από τυχαία μεταβολή παραμέτρων.

Η ανθεκτικότητα αναφέρεται στο κατά πόσο μία μέθοδος είναι ικανή να παράγει αξιόπιστα αποτελέσματα μετά από σκοπούμενες μεταβολές παραμέτρων έμμεσα σχετιζόμενων με το πείραμα, όπως αλλαγή συσκευής, εργαστηρίου, στήλης. Η διαφορά των δύο εννοιών έγκειται στο βαθμό μεταβολής των παραγόντων που αλλάζουν κάθε φορά, αλλά δυστυχώς υπάρχει σύγχυση των όρων στη διεθνή βιβλιογραφία.

2.2 Επικύρωση μεθόδου (9,10)

Επικύρωση είναι η αξιολόγηση των χαρακτηριστικών ποιότητας της μεθόδου μέσω πειραματικών τεκμηρίων και η εξέταση της ανταπόκρισής της προς προδιαγραφές για να αποδειχθεί ότι είναι κατάλληλη για το σκοπό για τον οποίο προορίζεται.

Σύμφωνα με το πρότυπο ΕΛΟΤ EN ISO/IEC 17025 «Γενικές Απαιτήσεις για την Ικανότητα των Εργαστηρίων Δοκιμών και Διακριβώσεων», βάσει του οποίου χορηγείται διαπίστευση από τους φορείς διαπίστευσης (π.χ. ΕΣΥΔ) στα χημικά και άλλα εργαστήρια, πρέπει να πληρούνται οι παρακάτω προϋποθέσεις:

Το εργαστήριο πρέπει να επικυρώνει τις μη πρότυπες μεθόδους, τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται εκτός του σκοπούμενου αντικειμένου, τις μεθόδους που σχεδιάζονται από το εργαστήριο (in house methods), καθώς και τις τροποποιημένες πρότυπες μεθόδους έτσι, ώστε να επιβεβαιώνεται ότι οι μέθοδοι είναι κατάλληλες για τη σκοπούμενη χρήση. Η έκταση της επικύρωσης καθορίζεται από το πόσο είναι απαραίτητη για να ικανοποιήσει τις ανάγκες της δεδομένης εφαρμογής ή του πεδίου εφαρμογής.

Το εργαστήριο πρέπει να επιβεβαιώσει ότι μπορεί να εφαρμόσει τις πρότυπες μεθόδους πριν από την εφαρμογή των δοκιμών. Όταν κάποιες αλλαγές γίνουν σε επικυρωμένες μη πρότυπες μεθόδους, τότε η επίδραση αυτών των αλλα-

γών πρέπει να τεκμηριωθεί και αν κριθεί απαραίτητο να επικυρωθούν αυτές οι μέθοδοι εκ νέου. Εάν πρότυπες μέθοδοι είναι διαθέσιμες για κάποια συγκεκριμένη δοκιμή σε δείγμα τότε πρέπει να χρησιμοποιηθεί η τελευταία έκδοση.

Οι τεχνικές επικύρωσης που χρησιμοποιούνται είναι συνοπτικά:

- χρήση προτύπων αναφοράς ή υλικών αναφοράς,
- σύγκριση αποτελεσμάτων με άλλες πρότυπες μεθόδους αναφοράς,
- διεργαστηριακές συγκρίσεις,
- συστηματική αξιολόγηση παραγόντων που επηρεάζουν το αποτέλεσμα και
- αξιολόγηση αβεβαιότητας αποτελεσμάτων με βάση τις θεωρητικές αρχές και πρακτική εμπειρία.

Η τεκμηρίωση της επικύρωσης συνιστάται από:

- το πρωτόκολλο (protocol)
- τα δεδομένα ελέγχου (test data) και
- την έκθεση (report)

Μία μέθοδος θεωρείται επικυρωμένη όταν ανταποκρίνεται στα κριτήρια αποδοχής ενός πρωτοκόλλου επικύρωσης ή όταν υπάρχει επαρκής δικαιολογία για αυτό.

Οι αναλυτικές μέθοδοι για τις απαιτήσεις της επικύρωσης ταξινομούνται σε τέσσερις κατηγορίες:

- Έλεγχοι ταυτοποίησης (identification test). Οι έλεγχοι ταυτοποίησης προορίζονται να ταυτοποιήσουν τον αναλύτη στο δείγμα. Αυτό επιτυγχάνεται με σύγκριση του δείγματος μέσω ενός φάσματος και της χρωματογραφικής συμπεριφοράς με το πρότυπο αναφοράς.
- Ποσοτικοί προσδιορισμοί για την περιεκτικότητα προσμίξεων (quantitative measurements for impurity content).
- Έλεγχοι ορίων για προσμίξεις (limit tests for impurities). Οι δοκιμασίες για προσμίξεις, είτε ποσοτικοί προσδιορισμοί, είτε έλεγχοι ορίων έχουν σκοπό να αποδείξουν την καθαρότητα του δείγματος. Διαφορετικά χαρακτηριστικά επικύρωσης απαιτούνται για τους ποσοτικούς προσδιορισμούς από τους ελέγχους ορίων.

- Ποσοτικοί προσδιορισμοί δραστικών ουσιών (assays of active moieties). Οι ποσοτικοί προσδιορισμοί δραστικών ουσιών προορίζονται για την ποσοτικοποίηση του αναλύτη σε δεδομένο δείγμα. Παρόμοια χαρακτηριστικά επικύρωσης απαιτούνται είτε ο ποσοτικός προσδιορισμός αφορά τη δραστική, είτε κάποιο άλλο συστατικό του φαρμακευτικού προϊόντος.

Πίνακας 1: Έκταση αξιολόγησης αναλυτικών μεθόδων για επικύρωση

Χαρακτηριστικό μεθόδου	Έλεγχος ταυτοποίησης	Έλεγχος προσμίξεων- Ποσοτικοποίηση	Έλεγχος προσμίξεων - Όρια	Ποσοτικός προσδιορισμός δραστικής ουσίας
γραμμικότητα	-	+	-	+
Επαναληψιμότητα συστήματος	-	+	-	+
Επαναληψιμότητα μεθόδου	-	+	-	+
Αναπαραγωγιμότητα	-	+	-	+
Ακρίβεια	-	+	-	+
Ειδικότητα	+	+	+	+
Όριο ανίχνευσης	-	-	+	-
Όριο ποσοτικοποίησης	-	+	-	-
Περιοχή	-	+	-	+

Παρακάτω παρατίθεται ο σχεδιασμός της πειραματικής εργασίας έτσι, ώστε τα κατάλληλα χαρακτηριστικά ελέγχου επικύρωσης να εξετάζονται συγχρόνως, παρέχοντας ορθολογική και συνολική γνώση των δυνατοτήτων της αναλυτικής μεθόδου.

- Ειδικότητα/Εκλεκτικότητα
- Γραμμικότητα
- Περιοχή συγκεντρώσεων
- Όριο ανίχνευσης/Όριο ποσοτικοποίησης
- Ακρίβεια
- Πιστότητα
- Αντοχή Μεθόδου
- Ανθεκτικότητα Μεθόδου
- Έλεγχος Καταλληλότητας Συστήματος

2.2.1 Ειδικότητα (Specificity) / Εκλεκτικότητα (Selectivity) (8,11-13)

Μία μέθοδος είναι πλήρως *εκλεκτική* εάν παρέχει ορθά αναλυτικά αποτελέσματα για τα διάφορα συστατικά του μίγματος χωρίς αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Μια εκλεκτική μέθοδος συνίσταται από μία σειρά ειδικών μετρήσεων. Κατά τη διαδικασία επικύρωσης μίας χρωματογραφικής μεθόδου, οι παράμετροι καθορισμού της εκλεκτικότητας είναι τρεις:

(α) Με βάση τους χρόνους ανάσχεσης των ουσιών στο χρωματογράφημα υπολογίζεται η διαχωριστικότητα της κορυφής του αναλύτη από γειτονικές κορυφές, η οποία θα πρέπει να υπερβαίνει κάποια τιμή προδιαγραφής. Ωστόσο, η υψηλή διαχωριστικότητα δεν είναι αρκετή ως πειστήριο, καθώς δεν προβλέπεται η περίπτωση κατά την οποία κάποιο άλλο συστατικό να εμφανίζει τον ίδιο ακριβώς χρόνο ανάσχεσης με τον αναλύτη.

(β) Ο προσδιορισμός της καθαρότητας κορυφής (peak purity) με βάση το φάσμα της εκλουόμενης ουσίας, το οποίο μπορεί να προκύψει, είτε από απλό ανιχνευτή PDA, είτε από φάσμα μαζών.

(γ) Συχνά εξετάζεται και το σχήμα της κορυφής που προκύπτει, καθώς η δημιουργία «ώμων» καταδεικνύει την παρουσία δεύτερης ουσίας στο χρόνο ανάσχεσης του αναλύτη. Είναι προφανές ωστόσο ότι αυτό το κριτήριο είναι καθαρά ποιοτικό και δεν έχει τη σημασία των δύο πρώτων.

Η *ειδικότητα* εκφράζει την παρεμπόδιση στον προσδιορισμό ενός συστατικού σε ένα δείγμα από τα άλλα συστατικά του μίγματος. Μία μέθοδος είναι πλήρως ειδική για ένα αναλύτη όταν η συγκέντρωσή του μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια χωρίς την επίδραση από τα άλλα συστατικά του δείγματος. Τα άλλα συστατικά δεν παράγουν αναλυτικό σήμα. Η ειδικότητα στην υγροχρωματογραφία επιτυγχάνεται με την επιλογή βέλτιστης στήλης και χρωματογραφικών συνθηκών, όπως σύσταση κινητής φάσης, θερμοκρασία στήλης, μήκος κύματος ανιχνευτή. Ο έλεγχος της ειδικότητας απαιτείται για τον έλεγχο της αξιοπιστίας δοκιμασιών ταυτοποίησης (identification test), προσδιορισμών προσμίξεων (impurity test) και ποσοτικών προσδιορισμών (assay). Συνιστάται επίσης κατά την αξιολόγηση της αναλυτικής μεθόδου να αποδειχθεί ότι διακρίνει τον αναλύτη από γνωστές προσμίξεις, υπολείμματα πρώτων υλών της σύνθεσης, μεταβολίτες, προϊόντα διασπάσεως και συστατικά του μητρικού υ-

λικού του δείγματος. Δεν είναι πάντοτε δυνατόν να αποδειχθεί ότι μία αναλυτική μέθοδος είναι ειδική για μία συγκεκριμένη προς προσδιορισμό /ταυτοποίηση ουσία, δηλαδή να επιτυγχάνει πλήρη διάκριση. Στην περίπτωση αυτή συνιστάται ο συνδυασμός δύο ή περισσότερων μεθόδων για να επιτευχθεί ο αναγκαίος βαθμός διάκρισης.

Σύμφωνα με την Eurachem ειδικότητα και εκλεκτικότητα ουσιαστικά εκφράζουν το ίδιο χαρακτηριστικό και σχετίζονται πολύ στενά το ένα με το άλλο κατά τέτοιο τρόπο ώστε ειδικότητα να σημαίνει 100% εκλεκτικότητα. Μία άλλη σχετική φράση είναι “επιβεβαίωση της ταυτότητας”, η οποία σημαίνει ότι το σήμα μέτρησης, το οποίο έχει αποδοθεί στον αναλύτη, να οφείλεται μόνο στον αναλύτη και όχι σε κάποια άλλη φυσική ή χημική παρουσία που αποτελεί σύμπτωση.

A) Μέθοδοι ελέγχων Ταυτοποίησης (Identification Test)

Οι έλεγχοι ταυτοποίησης πρέπει να είναι ικανοί να διακρίνουν τις ενώσεις παραπλήσιας δομής, που μπορεί να συνυπάρχουν σε ένα δείγμα. Η ικανότητα διάκρισης της μεθόδου επιβεβαιώνεται με τη λήψη θετικών αποτελεσμάτων από δείγματα που περιέχουν τον αναλύτη (π.χ. γνωστά υλικά αναφοράς), σε συνδυασμό με αρνητικά αποτελέσματα από δείγματα που δεν περιέχουν τον αναλύτη. Επιπλέον, ο έλεγχος ταυτοποίησης πρέπει να εφαρμοσθεί σε ουσίες με όμοια ή παραπλήσια δομή προς τον αναλύτη, για να επιβεβαιωθεί ότι δε λαμβάνεται θετικό αποτέλεσμα. Η επιλογή τέτοιων δυνητικά παρεμποδιζουσών ουσιών πρέπει να βασίζεται στη λογική επιστημονική κρίση σχετικά με την πιθανή παρουσία τους στο εξεταζόμενο δείγμα.

B) Ποσοτικοί Προσδιορισμοί (Assay), Έλεγχοι Προσμίξεων (Impurity Test), Έλεγχοι Υπολειμμάτων (Residual Test)

Για τις χρωματογραφικές μεθόδους, οι οποίες είναι οι μέθοδοι επιλογής σε ελέγχους και προσδιορισμούς προσμίξεων (συγγενών ουσιών), πρέπει να χρησιμοποιούνται αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα για να αποδειχθεί η ειδικότητα και κάθε συστατικό πρέπει να επισημαίνεται κατάλληλα. Οι κρίσιμοι διαχωρισμοί στη χρωματογραφία πρέπει να ερευνώνται σε κατάλληλο επίπεδο συγκεντρώσεων. Η ειδικότητα αυτών των χρωματογραφικών τεχνικών α-

ποδεικνύεται με τη διαχωριστικότητα (Resolution, R) γειτονικών κορυφών (εξίσωση [9]).

Η διάκριση του αναλύτη παρουσία των προσμίξεων ή/και των εκδόχων του αποδεικνύεται με εμβολιασμό (spiking) καθαρής ουσίας ή σκευάσματος ή προϊόντος με κατάλληλα επίπεδα συγκεντρώσεων προσμίξεων ή/και εκδόχων και απόδειξη ότι το αποτέλεσμα του προσδιορισμού δεν επηρεάζεται από την παρουσία αυτών των υλικών (με σύγκριση προς το αποτέλεσμα που προκύπτει από το μη εμβολιασμένο, unspiked, δείγμα). Για τους ποσοτικούς προσδιορισμούς τα δύο αποτελέσματα πρέπει να είναι συγκρίσιμα. Για ελέγχους προσμίξεων πρέπει τα προφίλ των προσμίξεων να είναι συγκρίσιμα. Για τις χρωματογραφικές μεθόδους ο έλεγχος καθαρότητας του αναλύτη (peak purity test), που μπορεί να γίνει με φασματοφωτόμετρο σειράς φωτοδιόδων (diode array) ή φασματομέτρο μαζών (mass spectrometry), πρέπει να αποδεικνύει κορυφή προερχόμενη από ένα μόνο συστατικό.

Έγγραφα τεκμηρίωσης: περιλαμβάνονται χρωματογραφήματα και δεδομένα τα οποία αποδεικνύουν τη διαχωριστική ικανότητα της μεθόδου.

Κριτήρια αποδοχής - Σχόλια: Οι συνυπάρχουσες ουσίες δεν πρέπει να παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό του αναλύτη.

2.2.2 Γραμμικότητα (Linearity)

Ως γραμμικότητα ορίζεται η ιδιότητα μίας αναλυτικής μεθόδου να δίνει σήματα ανάλογα της συγκέντρωσης του αναλύτη στο δείγμα και μαζί με την ορθότητα και την πιστότητα, αποτελούν τις πλέον καθοριστικές παραμέτρους για την αξιοπιστία μίας μεθόδου.

Εξετάζεται σε όλο το εύρος της περιοχής συγκεντρώσεων της αναλυτικής μεθόδου. Μπορεί να αποδειχθεί:

- α) απευθείας στην καθαρή προσδιοριζόμενη ουσία με αραιώσεις ενός προτύπου διαλύματος παρακαταθήκης (standard stock solution),
- β) με ξεχωριστές ζυγίσεις συνθετικού μίγματος των συστατικών ενός προϊόντος-δείγματος,
- γ) με διαδοχικές αυξανόμενες ενισχύσεις (spiking) λευκού δείγματος και εφαρμογή της ελεγχόμενης αναλυτικής μεθόδου.

Η γραμμικότητα αποδεικνύεται με οπτική εξέταση του διαγράμματος του αναλυτικού σήματος ως συνάρτηση της συγκέντρωσης ή της περιεκτικότητας του αναλύτη (βαθμονόμηση). Αξιολογείται με στατιστικές μεθόδους, όπως υπολογισμός της ευθείας παλινδρόμησης ή συμμεταβολής, με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων. Σύμφωνα με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, η ευθεία που θα αξιοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση είναι αυτή που διαθέτει το ελάχιστο άθροισμα των τετραγώνων των αποκλίσεων από τα σημεία του διαγράμματος. Ο συντελεστής συσχέτισης, η τομή με τον άξονα y (y -intercept), η κλίση (slope) της ευθείας παλινδρόμησης και η τυπική απόκλιση των υπολοίπων περιλαμβάνονται στο φάκελο της μεθόδου.

Πορεία Ελέγχου: Για την απόδειξη της γραμμικότητας σε μεθόδους ποσοτικών προσδιορισμών (assay) συνιστάται η μέτρηση τουλάχιστον 5 διαφορετικών συγκεντρώσεων του αναλύτη που κατανέμονται περίπου ομοιόμορφα και καλύπτουν το 80-120% της αναμενόμενης περιοχής εργασίας. Για μεθόδους που αφορούν προσμίξεις παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα σε πέντε διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων σε ένα εύρος από το επιτρεπόμενο όριο (reporting threshold) στο 120% του επιπέδου προδιαγραφών. “Reporting threshold” είναι το όριο εκείνο, όπου μία πρόσμειξη δεν πρέπει να υπερβαίνει σε μια πρώτη ύλη δραστικής ουσίας ή φαρμακευτικού σκευάσματος. Στη συνέχεια εκτελούνται τουλάχιστον 6 επαναλαμβανόμενες μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση. Τα πρότυπα πρέπει να παρασκευάζονται αν είναι δυνατόν στο ίδιο μητρικό υλικό με τα δείγματα. Τα πρότυπα αναλύονται σύμφωνα με την αξιολογούμενη μέθοδο.

Έγγραφα τεκμηρίωσης: τα αποτελέσματα αναγράφονται σε φύλλο δεδομένων και υπολογίζεται ο μέσος όρος (mean), η τυπική απόκλιση (SD) και η σχετική τυπική απόκλιση (RSD) για κάθε συγκέντρωση. Σχεδιάζεται το διάγραμμα (plot) της μέσης σήματος (y -άξονας) ως προς τη συγκέντρωση (x -άξονας). Υπολογίζεται η εξίσωση παλινδρόμησης και ο συντελεστής προσδιορισμού (coefficient of determination, r^2) και ο συντελεστής συσχέτισης (correlation coefficient, r).

Εκτός από το διάγραμμα y ως προς x (διάγραμμα απόκρισης), γίνεται και το διάγραμμα του λόγου (απόκριση/ συγκέντρωση), response ratio (y -άξονας) ως

προς τη συγκέντρωση (x-άξονας). Είναι επίσης χρήσιμο το διάγραμμα υπολοίπων (residual plot).

Κριτήρια αποδοχής: Ελέγχεται να είναι μία ευθεία γραμμή με συντελεστή προσδιορισμού $r^2 \geq 0,98$ (προτιμάται 0,99, αλλά και 0,98 είναι αποδεκτό εξαρτώμενο από τις ανάγκες της μεθόδου). Φυσιολογικά για μία γραμμική προσαρμογή ελαχίστων τετραγώνων οι αποκλίσεις των σημείων μακράν του μηδενός επηρεάζουν την κλίση περισσότερο από ότι οι αποκλίσεις των σημείων κοντά στο μηδέν. Εάν η καμπύλη δεν είναι γραμμική περιορίζεται η περιοχή έως ότου η απόκριση είναι γραμμική με τη συγκέντρωση. Τουλάχιστον 4 συγκεντρώσεις χρησιμοποιούνται για την καμπύλη των προτύπων. Στο διάγραμμα λόγων απόκρισης οι τιμές πρέπει να βρίσκονται σε μία στενή οριζόντια ζώνη και οι τιμές που βρίσκονται έξω από αυτή τη ζώνη είναι μη αποδεκτές για μία κανονική περιοχή εργασίας. Στο διάγραμμα των υπολοίπων ελέγχεται η εμφάνιση έκτροπων τιμών και η περιοχή γραμμικότητας. Η τιμή της τομής (intercept) πρέπει να είναι στατιστικά μηδέν (διέλευση γραμμής από το μηδέν) ή η τιμή της τομής να είναι $<1\%$ στο σημείο του προτύπου στο επίπεδο 100%.

2.2.3 Περιοχή Συγκεντρώσεων (Range)

Η καθοριζόμενη περιοχή συγκεντρώσεων/ποσοτήτων κανονικά προκύπτει από τη μελέτη γραμμικότητας και εξαρτάται από τη σκοπούμενη εφαρμογή της μεθόδου. Αποδεικνύεται με την επιβεβαίωση ότι η αναλυτική μέθοδος παρέχει ένα αποδεκτό βαθμό γραμμικότητας, ακρίβειας και επαναληψιμότητας, όταν εφαρμόζεται σε δείγματα που περιέχουν ποσότητες/συγκεντρώσεις εντός ή στα άκρα της καθοριζόμενης περιοχής της αναλυτικής μεθόδου. Γενικά, η περιοχή συγκεντρώσεων μίας αναλυτικής μεθόδου εκτείνεται από το όριο ποσοτικοποίησης μέχρι τη συγκέντρωση που παρατηρείται απόκλιση από τη γραμμικότητα κατά 1-2%.

2.2.4 Όριο Ανίχνευσης /Όριο Ποσοτικοποίησης (LOD / LOQ)

Το όριο ανίχνευσης *LOD* προσδιορίζεται με την ανάλυση δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων του αναλύτη και τον καθορισμό του ελάχιστου επιπέδου συγκεντρώσεως, στο οποίο ο αναλύτης μπορεί να ανιχνευθεί αξιόπιστα.

Το όριο ποσοτικοποίησης LOQ είναι η συγκέντρωση ή το επίπεδο στο οποίο ο αναλύτης μπορεί να ποσοτικοποιηθεί (προσδιορισθεί ποσοτικά με αποδεκτή ακρίβεια και επαναληψιμότητα). Προσδιορίζεται με τον ίδιο τρόπο και τις ίδιες προσεγγίσεις που απαιτούνται και για το όριο ανίχνευσης, που είναι:

Με βάση την οπτική αξιολόγηση (visual evaluation): Η οπτική αξιολόγηση χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του ορίου ανιχνεύσεως μη ενόργανων μεθόδων ανάλυσης, μπορεί, όμως να χρησιμοποιηθεί και για ενόργανες.

Με βάση το λόγο σήμα προς θόρυβο (signal to noise): Η προσέγγιση αυτή μπορεί να εφαρμοσθεί μόνο σε αναλυτικές μεθόδους οι οποίες παρουσιάζουν θόρυβο γραμμής βάσης (baseline noise). Ο προσδιορισμός του λόγου σήμα προς θόρυβο (S/N) εκτελείται με σύγκριση των σημάτων που μετρώνται από δείγματα με γνωστές χαμηλές συγκεντρώσεις του αναλύτη, με το σήμα που λαμβάνεται από το λευκό δείγμα (blank sample) και καθορισμό της ελάχιστης συγκέντρωσης κατά την οποία ο αναλύτης ανιχνεύεται.

Με βάση την τυπική απόκλιση του λευκού (standard deviation of blank): η μέτρηση της αναλυτικής απόκρισης του υποβάθρου (background) επιτυγχάνεται με την ανάλυση ικανοποιητικού αριθμού λευκών δειγμάτων και υπολογισμό της τυπικής απόκλισης των αντίστοιχων αποκρίσεων.

Με βάση την τυπική απόκλιση της αναλυτικής απόκρισης (response) και της κλίσης (slope) της καμπύλης αναφοράς:

Το όριο ανίχνευσης (LOD) μπορεί να εκφρασθεί ως:

$$LOD = 3,3 \frac{SD}{b} [23]$$

Και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) ως:

$$LOQ = 10 \frac{SD}{b} [24]$$

Όπου: SD = τυπική απόκλιση της απόκρισης και b = η κλίση της καμπύλης αναφοράς.

Η κλίση b μπορεί να υπολογιστεί από την καμπύλη αναφοράς του αναλύτη. Η εκτιμήτρια της SD της απόκρισης μπορεί να εξαχθεί με διάφορους τρόπους: με βάση την τυπική απόκλιση του λευκού δείγματος (blank) ή με βάση την καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας δείγματα που περιέχουν τον αναλύτη

στην περιοχή συγκεντρώσεων του ορίου ανίχνευσης ή με βάση την τυπική απόκλιση ενός αγνώστου δείγματος χαμηλής συγκέντρωσης (κοντά στο μηδέν) ή με βάση την τυπική απόκλιση των υπολοίπων.

2.2.5 Ακρίβεια (Accuracy)

Η ακρίβεια πρέπει να αποδεικνύεται σε όλο το εύρος της καθοριζόμενης περιοχής συγκεντρώσεων/ποσοτήτων της αναλυτικής μεθόδου. Η ακρίβεια προσδιορίζεται συγχρόνως κατά τη συλλογή των δεδομένων επαναληψιμότητας, γραμμικότητας και ειδικότητας.

Έλεγχος Ακρίβειας Μεθόδου Ποσοτικού Προσδιορισμού (assay)

Μέθοδοι ελέγχου καθαρότητας πρώτων υλών ουσιών:

Εφαρμογή της αναλυτικής μεθόδου σε δείγμα του αναλύτη γνωστής καθαρότητας (υλικό αναφοράς).

Σύγκριση των αποτελεσμάτων της προτεινόμενης/υπό αξιολόγησης μεθόδου με αυτά που λαμβάνονται από μία δεύτερη καλώς χαρακτηρισμένη (αξιολογημένη) μέθοδο, η ακρίβεια της οποίας αναφέρεται και/ή είναι καθορισμένη (ανεξάρτητη μέθοδος).

Μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού προϊόντων:

Εφαρμογή της αναλυτικής μεθόδου σε συνθετικά μίγματα των συστατικών του προϊόντος στα οποία έχουν προστεθεί γνωστές ποσότητες της προς προσδιορισμό ουσίας.

Σε περιπτώσεις που δεν είναι δυνατή η διάθεση όλων των συστατικών του δείγματος, μπορεί να γίνει δεκτή, είτε η προσθήκη γνωστών ποσοτήτων του αναλύτη στο προϊόν, είτε η σύγκριση των αποτελεσμάτων με αυτά που λαμβάνονται με μία δεύτερη καλώς χαρακτηρισμένη μέθοδο, της οποίας η ακρίβεια αναφέρεται και/ή καθορίζεται (ανεξάρτητη μέθοδος).

Έλεγχος Ακρίβειας Μεθόδων Ποσοτικού Προσδιορισμού Προσμίξεων / Υπολειμμάτων

Η ακρίβεια προσδιορίζεται με εφαρμογή της μεθόδου σε δείγματα πρώτων υλών ουσιών ή προϊόντων τους, τα οποία έχουν εμβολιασθεί (spiked) με γνωστές ποσότητες των προσμίξεων. Εάν είναι αδύνατη η διάθεση ορισμένων

προσμίξεων ή προϊόντων διασπάσεως μιας ουσίας, είναι αποδεκτή η σύγκριση με τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με μία ανεξάρτητη μέθοδο.

Στις χρωματογραφικές μεθόδους για τον ποσοτικό προσδιορισμό των προσμίξεων μιας ουσίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο παράγοντας απόκρισης (response factor) της ουσίας αυτής. Όταν είναι αδύνατη ή δύσκολη η παρασκευή γνωστών λευκών δειγμάτων (placebo), μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα χαμηλής συγκέντρωσης γνωστό πρότυπο.

Πορεία Ελέγχου: παρασκευάζεται μία σειρά δειγμάτων που περιέχουν τουλάχιστον 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις του αναλύτη και οι οποίες κατανέμονται περίπου ομοιόμορφα και περιλαμβάνουν το 50-150% της αναμενόμενης περιοχής εργασίας. Για την παρασκευή των δειγμάτων χρησιμοποιείται η μήτρα του προϊόντος. Εκτελούνται τουλάχιστον 6 μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση εφαρμόζοντας τη μέθοδο που αξιολογείται.

Συνιστώμενα δεδομένα: Η ακρίβεια πρέπει να προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας τουλάχιστον 9 προσδιορισμούς, σε τρία τουλάχιστον επίπεδα συγκεντρώσεων που καλύπτουν την καθοριζόμενη περιοχή συγκεντρώσεων (π.χ. 3 συγκεντρώσεις με 3 προσδιορισμούς κάθε μία).

Η ακρίβεια παρουσιάζεται ως: α) εκατοστιαία ανάκτηση (%recovery) της γνωστής ποσότητας του αναλύτη που προστέθηκε στο δείγμα, β) τη διαφορά μεταξύ του μέσου όρου των τιμών που βρέθηκαν από την εφαρμογή της ελεγχόμενης μεθόδου σε ένα δείγμα και της αληθούς τιμής (τιμή του δείγματος αναφοράς ή τιμή που βρέθηκε από την εφαρμογή μιας ανεξάρτητης μεθόδου) μαζί με τα όρια εμπιστοσύνης.

Έγγραφα τεκμηρίωσης: Για κάθε δείγμα αναγράφεται η θεωρητική τιμή (μ), η τιμή προσδιορισμού (assay value, x) και η εκατοστιαία ανάκτηση (percent recovery). Υπολογίζεται ο μέσος όρος, η τυπική απόκλιση, η σχετική τυπική απόκλιση και η εκατοστιαία ανάκτηση όλων των δειγμάτων. Αναγράφονται τα αποτελέσματα στο φύλλο δεδομένων.

Κριτήρια Αποδοχής: Η εκατοστιαία ανάκτηση πρέπει να είναι μεταξύ 90% και 110% της θεωρητικής τιμής για προϊόντα άνευ κανονισμών ελέγχου. Από μερικούς προτείνεται το όριο ± 4 φορές την τυπική απόκλιση. Για την Αμερικάνικη και Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία τα όρια είναι 98-102% για τους ποσοτικούς

προσδιορισμούς δραστικών ουσιών σε φαρμακευτικά προϊόντα. Μικρότερες εκατοστιαίες ανακτήσεις μπορούν να γίνουν αποδεκτές ανάλογα με τις ανάγκες της μεθόδου και τις οδηγίες διαφόρων φορέων.

2.2.6 Πιστότητα (Precision)

Ο έλεγχος αξιοπιστίας των αναλυτικών μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού ουσιών και ποσοτικού προσδιορισμού προσμίξεων/υπολειμμάτων περιλαμβάνει και εξέταση της πιστότητας της μεθόδου. Υπολογίζεται η επαναληψιμότητα και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα με βάση τη σχετική τυπική απόκλιση και την εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση που προκύπτει από τρεις ή και περισσότερους προσδιορισμούς στο ίδιο δείγμα, από διαφορετικούς αναλυτές, σε διαφορετικά όργανα και χρονικές περιόδους.

- **Επαναληψιμότητα (Repeatability)**

Η επαναληψιμότητα ελέγχεται με τουλάχιστον 9 προσδιορισμούς που καλύπτουν την καθορισμένη περιοχή συγκεντρώσεων της μεθόδου (π.χ. 3 επίπεδα συγκεντρώσεων × 3 προσδιορισμούς κάθε μία ή τουλάχιστον 6 προσδιορισμούς στο 100% της συγκεντρώσεως ελέγχου.

Εάν απαιτείται υπολογίζεται και η ενδιάμεση πιστότητα (intermediate precision). Ο εφαρμόζων τη μέθοδο πρέπει να αποδείξει τις επιδράσεις τυχαίων γεγονότων (αλλαγές σε ημέρες, αναλυτές, όργανα, κλπ.) στην απόδοση της αναλυτικής μεθόδου. Δεν είναι απαραίτητο να μελετηθούν αυτές οι επιδράσεις ξεχωριστά, αλλά με τη χρήση ενός πειραματικού σχεδιασμού.

- **Αναπαραγωγικότητα (Reproducibility)**

Η αναπαραγωγικότητα εκτιμάται ενδοεργαστηριακά ή με μία διεργαστηριακή δοκιμασία (inter-laboratory trial). Η διεργαστηριακή εκτίμηση διεξάγεται για την προτυποποίηση (standardisation) μιας αναλυτικής μεθόδου, προκειμένου να περιληφθεί ως επίσημη στα βιβλία που εκδίδουν εθνικοί, διεθνείς και επιστημονικοί οργανισμοί, π.χ. σε Φαρμακοποιίες.

Συνιστώμενα Δεδομένα: Για κάθε τύπο πιστότητας που ερευνάται πρέπει να αναφέρονται η τυπική απόκλιση, η σχετική τυπική απόκλιση και το διάστημα εμπιστοσύνης.

- Επαναληψιμότητα μεθόδου

Πορεία ελέγχου: παρασκευάζεται ένα αντιπροσωπευτικό συνθετικό δείγμα χρησιμοποιώντας το μητρικό υλικό στο οποίο θα εφαρμοσθεί η μέθοδος. Το δείγμα πρέπει να περιέχει είκοσι φορές την ποσότητα του αναλύτη που χρειάζεται για έναν ποσοτικό προσδιορισμό. Χρησιμοποιείται η μεσαία συγκέντρωση της αναμενόμενης περιοχής εργασίας του αναλύτη. Ο απαιτούμενος αριθμός μετρήσεων ποικίλλει. Η ανάλυση γίνεται ακολουθώντας την υπό αξιολόγηση μέθοδο.

Έγγραφα τεκμηρίωσης: αναγράφονται τα αποτελέσματα σε φύλλο δεδομένων, όπως και οι υπολογισμοί για τον μέσο όρο, την τυπική απόκλιση και την σχετική τυπική απόκλιση.

Κριτήρια αποδοχής: υπάρχουν τρεις επιλογές για τα κριτήρια αποδοχής: 1) σχετική τυπική απόκλιση μικρότερη ενός καθορισμένου ορίου (π.χ. 2%), 2) σχετική τυπική απόκλιση μικρότερη τιμών από πίνακες ανάλογα με την περιοχή συγκεντρώσεων, 3) ρεαλιστικές τυπικές αποκλίσεις βασισμένες στις ανάγκες της μεθόδου.

- Επαναληψιμότητα συστήματος

Πορεία ελέγχου: ένα διάλυμα προτύπου με την μεσαία συγκέντρωση της αναμενόμενης περιοχής εργασίας, μετρείται έξι φορές. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί το μεσαίο πρότυπο δείγμα που χρησιμοποιήθηκε στον έλεγχο επαναληψιμότητας μεθόδου. Εναλλακτικά, εάν το διάλυμα του προτύπου δεν παρασκευάστηκε στη μήτρα του δείγματος, τότε ένα δείγμα κατάλληλης συγκέντρωσης (όχι στα άκρα της περιοχής) μπορεί να μετρηθεί 6 ή 7 φορές.

Έγγραφα τεκμηρίωσης: αναγράφονται οι αποκρίσεις κάθε μέτρησης και υπολογίζεται ο μέσος όρος, η τυπική απόκλιση και η σχετική τυπική απόκλιση.

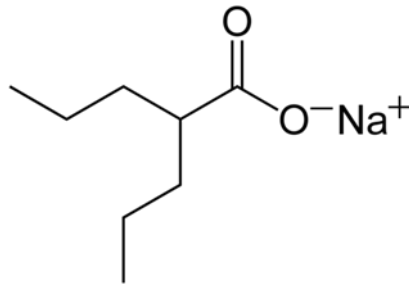
Κριτήρια αποδοχής: υπάρχουν οι τρεις επιλογές κριτηρίων, όπως και στην επαναληψιμότητα της μεθόδου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Βαλπροϊκό νάτριο

3.1 Ονοματολογία και χημική δομή (14)

Η ονομασία κατά IUPAC του βαλπροϊκού οξέος είναι 2-προπυλοπεντανοϊκό οξύ. Επίσης ονομάζεται 2-n-διπροπυλοακετικό οξύ. Ανήκει στην κατηγορία των καρβοξυλικών οξέων και είναι ένα μη χειρικό μόριο με μικρή διακλαδισμένη αλυσίδα το οποίο δε διαθέτει κάποιο άτομο αζώτου ή κάποιο δακτύλιο και έτσι γίνεται ξεχωριστό ανάμεσα στα υπόλοιπα αντιεπιληπτικά φάρμακα. Το βαλπροϊκό οξύ (VPA) χρησιμοποιείται συνήθως ως άλας νατρίου.



Εικόνα 5: Χημική δομή 2-προπυλοπεντανοϊκού νατρίου

3.2 Ιστορική αναδρομή (14)

Το βαλπροϊκό οξύ παρασκευάστηκε το 1882 από τον Burton αλλά δεν ήταν γνωστή η αντισπασμωδική του δράση η οποία τυχαία ανακαλύφθηκε αργότερα το 1962 από τον P. Eymard στο εργαστήριο του G. Carraz όταν χρησιμοποιήθηκε ως λιπόφιλος διαλύτης άλλων ουσιών σε διάφορες δοκιμές σε πειραματόζωα. Οι πρώτες κλινικές μελέτες του βαλπροϊκού νατρίου πραγματοποιήθηκαν το 1964 από τον Carraz και τους συνεργάτες του. Κυκλοφόρησε στη Γαλλία το 1967 και απελευθερώθηκε σε πάνω από 100 χώρες (στις ΗΠΑ το 1978) για τη θεραπεία της επιληψίας. Από τότε και στο εξής καθιερώθηκε παγκοσμίως ως βασικό αντιεπιληπτικό φάρμακο ενάντια σε διάφορες επιληπτικές κρίσεις.

Οι γνώσεις για το βαλπροϊκό νάτριο έχουν γίνει πλουσιότερες τα τελευταία χρόνια καθώς η χρησιμότητα του βαλπροϊκού έχει επεκταθεί και σε άλλες ασθένειες όπως η διπολική διαταραχή και η ημικρανία.

3.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες (14,15)

Το βαλπροϊκό νάτριο είναι ένα άλας με σχετική μοριακή μάζα ίση με 166,2. Είναι μία υγροσκοπική λευκή σκόνη που διαλύεται εύκολα σε πολικούς διαλύτες (νερό, αιθανόλη, μεθανόλη). Στο στομάχι, το βαλπροϊκό νάτριο μετατρέπεται ταχέως σε βαλπροϊκό οξύ. Ο πολύ υψηλός βαθμός ιονισμού σε pH 7,4 κάνει το βαλπροϊκό οξύ λιγότερο λιποδιαλυτό σε σχέση με οποιοδήποτε άλλο αντισπασμωδικό φάρμακο. Αυτό εξηγεί γιατί ο όγκος κατανομής του βαλπροϊκού είναι τόσο χαμηλός, καθώς μόνο η μη ιονισμένη, λιποδιαλυτή μορφή του φαρμάκου μπορεί μέσω παθητικής διάχυσης να διανεμηθεί στους ιστούς μέσω του αίματος. Η ταχεία είσοδος του βαλπροϊκού στον εγκέφαλο δεν είναι συμβατή με τις φυσικοχημικές ιδιότητες και έτσι θεωρείται ότι διέπεται από ενεργούς μηχανισμούς μεταφοράς.

3.4 Βαλπροϊκό οξύ και τα ανάλογα του (15)

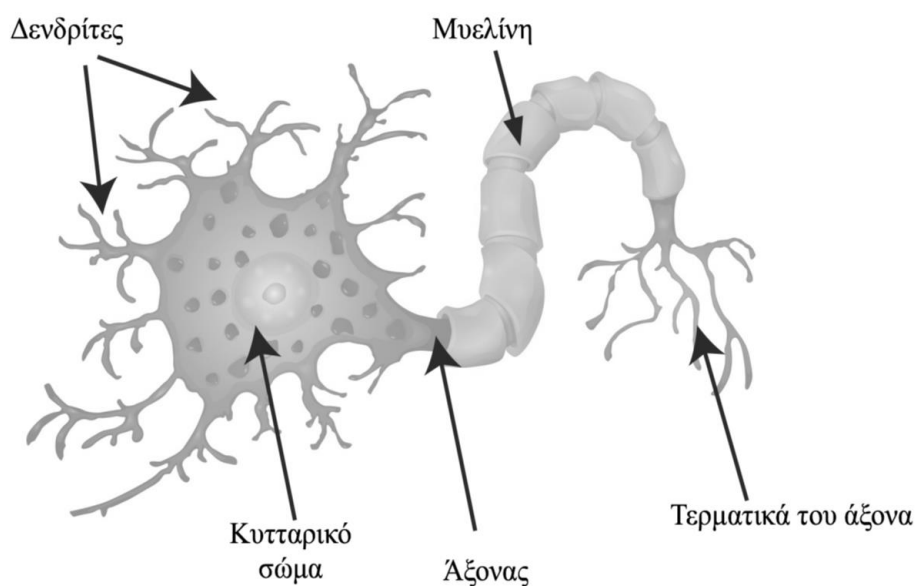
Από την ανακάλυψη των αντισπασμωδικών ιδιοτήτων του βαλπροϊκού οξέος και μετά ένα μεγάλο σύνολο παραγώγων έχει παρασκευαστεί. Η πλευρική αλυσίδα των πεντανοϊκών παραγώγων στη θέση δύο σχετίζεται με τις αντισπασμωδικές ιδιότητες της ουσίας. Τα ανάλογα του βαλπροϊκού με εννέα και περισσότερα άτομα άνθρακα παρουσιάζουν πιο έντονες αντισπασμωδικές και καταπραϋντικές (νευροτοξικές) ιδιότητες. Τα μη διακλαδισμένα λιπαρά οξέα (όπως βουτυρικό, πεντανοϊκό, εξανοϊκό οξύ) δεν εμφανίζουν τις παραπάνω ιδιότητες. Τις καταπραϋντικές ιδιότητες εμφανίζουν μόνο τα διακλαδισμένα οξέα (με τουλάχιστον πέντε άνθρακες) και αυξάνουν με την αύξηση της αλυσίδας (πάνω από έντεκα άνθρακες). Στις περισσότερες περιπτώσεις συνοδεύονται από αύξηση του GABA (γ -aminobutyric acid) του εγκεφάλου και μείωση του ασπαρτικού. Αντισπασμωδική ιδιότητα σημειώνεται επίσης σε τριυποκατεστημένα λιπαρά οξέα και διακλαδισμένα αλκανοϊκά οξέα. Μερικά από αυτά τα οξέα είναι πιο ισχυρά από το βαλπροϊκό, αλλά σε μερικά ζώα η ευεργητική του ικανότητα συνοδεύτηκε από σημαντική καταστολή.

3.5 Δομή και λειτουργία των νευρικών κυττάρων (16)

Το νευρικό σύστημα του ανθρώπου έχει 100 δισεκατομμύρια νευρικά κύτταρα. Το νευρικό κύτταρο αποτελεί τη βασική δομική και λειτουργική μονάδα του νευρικού συστήματος. Τα νευρικά κύτταρα έχουν βασικές διαφορές στη μορ-

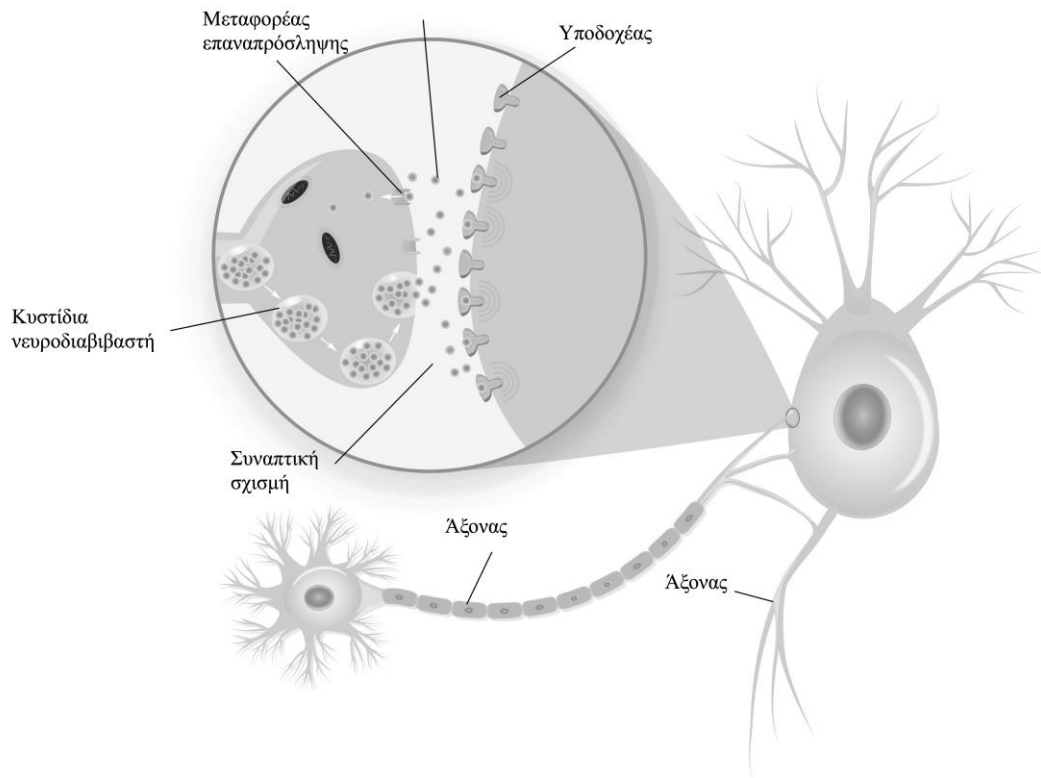
φολογία τους από τα υπόλοιπα κύτταρα του σώματος. Τα νευρικά κύτταρα, εκτός από το κυτταρικό σώμα που έχουν, περιλαμβάνουν και πολλές λεπτές αποφυάδες ή ίνες, οι οποίες εκφύονται από το σώμα και έχουν αρκετά μεγάλο μήκος από κάποιες εκατοντάδες μικρόμετρα έως ένα μέτρο. Έτσι, το σώμα ενός νευρικού κυττάρου μπορεί να βρίσκεται σε μια περιοχή του νευρικού συστήματος, αλλά ο άξονάς του να μεταδίδει το σήμα του νευρικού κυττάρου σε μια άλλη περιοχή του νευρικού συστήματος, αρκετά απομακρυσμένη από την πρώτη.

Υπάρχουν δύο ειδών αποφυάδες σε ένα νευρικό κύτταρο: 1) Οι δενδρίτες και 2) ο άξονας.



Εικόνα 6: Δομή νευρώνα (16)

Τα νευρικά κύτταρα επικοινωνούν μεταξύ τους με συνάψεις, ειδικές δομές όπου το τερματικό του άξονα ενός νευρικού κυττάρου έρχεται σε πολύ κοντινή απόσταση με τον δενδρίτη ενός άλλου νευρικού κυττάρου. Το νευρικό κύτταρο το οποίο στέλνει ένα ηλεκτρικό σήμα προς τη σύναψη μέσω του άξονα ονομάζεται προσυναπτικός νευρώνας. Ο προσυναπτικός νευρώνας εκλύει μια ουσία, το νευροδιαβιβαστή, η οποία δρα στη μεμβράνη του δενδρίτη του άλλου νευρικού κυττάρου, το οποίο ονομάζεται μετασυναπτικός νευρώνας. Οι συνάψεις συνήθως εντοπίζονται στους δενδρίτες του μετασυναπτικού νευρώνα, αλλά μπορούν επίσης να βρεθούν και στο κυτταρικό σώμα και στον άξονα.



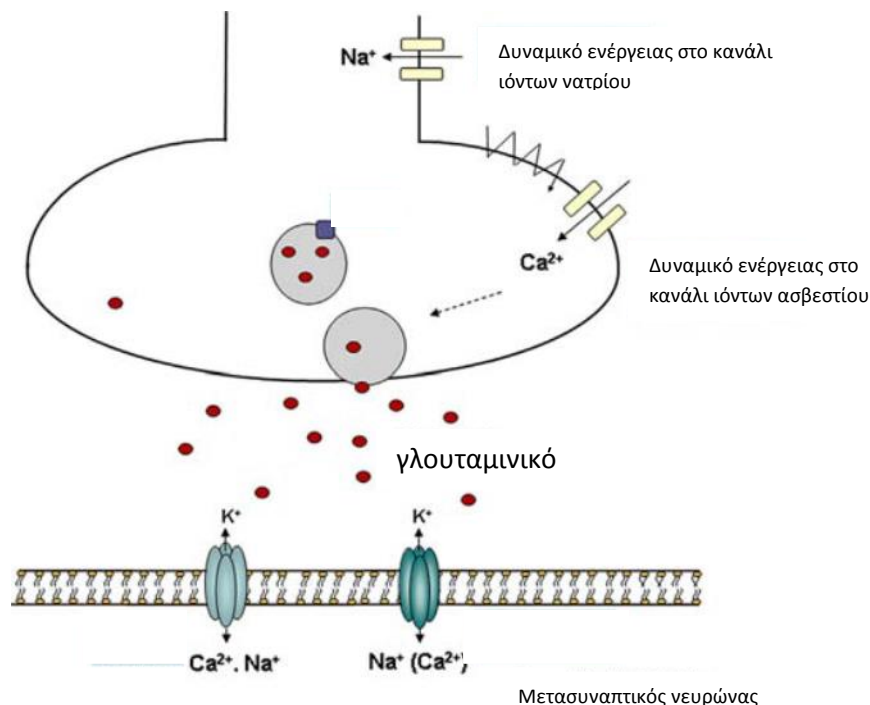
Εικόνα 7: Νευρικό σήμα ανάμεσα στις συνάψεις (16)

Τα ηλεκτρικά σήματα παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη λειτουργία και επικοινωνία των νευρικών κυττάρων. Τα ηλεκτρικά σήματα σε ένα κύτταρο δημιουργούνται από τη μεταφορά ιόντων μέσω εξειδικευμένων πρωτεϊνών, των διαύλων ιόντων. Οι διάυλοι ιόντων είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες οι οποίες όταν ανοίγουν, μέσα από αυτές περνάνε κάποια ιόντα, (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}), ανάλογα με την ηλεκτροχημική τους διαβάθμιση. Η μετακίνηση ιόντων προκαλεί αλλαγές στο δυναμικό της μεμβράνης, δημιουργώντας ηλεκτρικά σήματα. Δύο βασικά είδη ηλεκτρικών σημάτων συμμετέχουν σε μια σύναψη: α) το δυναμικό ενέργειας, το οποίο εκλύεται στους άξονες των νευρικών κυττάρων, και αποτελεί τον κώδικα λειτουργίας/επικοινωνίας των νευρικών κυττάρων, και β) το μετασυναπτικό δυναμικό που είναι μια αλλαγή στο δυναμικό της μεμβράνης εξαιτίας της δράσης του νευροδιαβιβαστή.

3.6 Μηχανισμοί αντιεπιληπτικών φαρμάκων (17)

Η κυτταρική διεγερσιμότητα σχετίζεται με τις ροές των ιόντων κατά μήκος της μεμβράνης. Στο δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης μία περίσσεια ιόντων νατρίου, ασβεστίου και χλωρίου βρίσκονται στον εξωκυτταρικό χώρο ενώ τα ιόντα καλίου φτάνουν σε σχετικά υψηλές ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις. Σε κατά-

σταση ηρεμίας, τα μόνα ιόντα που παρουσιάζουν μικρή κινητικότητα είναι τα ιόντα καλίου. Όταν το δυναμικό μεμβράνης προσεγγίζει και τελικά φτάνει σε ένα οριακό δυναμικό για την μεμβράνη τότε δημιουργούνται κανάλια που επιτρέπουν την είσοδο ιόντων νατρίου συμβάλλοντας σε μία περαιτέρω άνοδο. Σε απάντηση των αλλαγών στην πολικότητα της μεμβράνης τα κανάλια νατρίου κλείνουν και τα κανάλια του καλίου ενεργοποιούνται με αποτέλεσμα το προς τα έξω ρεύμα καλίου εξασφαλίζοντας εκ νέου την κατάσταση ηρεμίας.



Εικόνα 8: Διαγραμματική απεικόνιση ροής ιόντων στις προσυναπτικές νευρικές απολήξεις (17)

Μετά την ενεργοποίηση των καναλιών του νατρίου ακολουθεί μία κατάσταση γρήγορης αδρανοποίησης τους κατά την διάρκεια της οποίας τα κανάλια στο εσωτερικό της μεμβράνης να κλείνουν για *msec*. Σε αυτό το σημείο το κανάλι απενεργοποιείται και δεν συμβάλει σε νευρική διαγερασσιμότητα. Για αντιεπιληπτικά όπως καρβαμαζεπίνη και τα παράγωγα του, η φαινυτοΐνη, λαμοτριγίνη, βαλπροϊκό έχουν σαν στόχο να επηρεάζουν τη διαφορά δυναμικού στις πύλες εισόδου του νατρίου και να προωθούν μία κατάσταση γρήγορης αδρανοποίησης σε όσο είναι δυνατό περισσότερα κανάλια.

Στα κανάλια ασβεστίου επιτρέπεται η ροή ιόντων εφόσον συμβεί μία ισχυρή αποπόλωση της μεμβράνης. Τα κανάλια αυτά ρυθμίζουν την ροή ασβεστίου

και σχετίζονται με την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστή από τις προσυναπτικές νευρικές απολήξεις.

Ο GABA είναι ο πιο άφθονος και σημαντικός ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής. Σε έναν επιληπτικό εγκέφαλο αλλαγές που συμβαίνουν στην έκφραση των υποδοχέων GABA και την σύνθεση των υπομονάδων τους φαίνεται πως συμβάλλουν στην ενίσχυση της διεγερσιμότητας. Ένας διεγερτικός νευροδιαβιβαστής κάνει τον «επόμενο» νευρώνα να πυροδοτεί ένα ηλεκτρικό σήμα, ενώ ο ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής τον αναγκάζει να παραμείνει ανενεργός. Οι κύριοι διεγερτικοί και ανασταλτικοί νευροδιαβιβαστές στον εγκέφαλο είναι το γλουταμικό και ο GABA, αντιστοίχως, και πρέπει να διατηρείται μια λεπτή ισορροπία μεταξύ των δύο αυτών για να υπάρχει φυσιολογική εγκεφαλκή λειτουργία. Στην επιληψία υπάρχει περισσότερη διέγερση του εγκεφάλου και αυτό μπορεί να οφείλεται σε πλεόνασμα του γλουταμικού ή σε ανεπάρκεια του GABA. Και στις δύο περιπτώσεις, οι νευρώνες μπορεί να καταστούν υπερευαίσθητοι και να εμφανιστούν κρίσεις.

Διάφορα αντιεπιληπτικά φάρμακα δεσμεύονται σε διαφορετικές θέσεις του συμπλόκου υποδοχέα. Η νευροδιαβίβαση με την βοήθεια της GABA μπορεί να ρυθμίζεται έμμεσα μέσω αναστολής της πρόσληψης GABA στις προσυναπτικές νευρικές απολήξεις ή την αναστολή της υποβάθμιση της από την GABA τρανσαμινάση.

3.7 Πεδία μελέτης και παρενέργειες (18-21)

Από το 1963 όπου ανακαλύφθηκαν οι αντισπασμωδικές ιδιότητες του βαλπροϊκού οξέος (VPA), η θεραπευτική του δράση έχει αυξηθεί προς κατευθύνσεις όπως η διπολική διαταραχή, η προφύλαξη από ημικρανία και πιο πρόσφατα προτάθηκε για θεραπεία καρκίνου, νόσου Alzheimer και ιού HIV. Το βαλπροϊκό νάτριο είναι ένα από τα πιο σημαντικά αντιεπιληπτικά φάρμακα που έχει εφαρμοστεί στην θεραπεία γενικευμένων αλλά και ειδικών επιληπτικών κρίσεων σε γυναίκες και παιδιά. Η επιληψία είναι μία από τις πιο συνηθισμένες νευρολογικές ασθένειες που επηρεάζει το 0,5% έως 1% των γυναικών που κυοφορούν.

Η χρήση αντιεπιληπτικών φαρμάκων κατά την διάρκεια της κύησης αυξάνει τον κίνδυνο αποβολών καθώς επίσης και νευροαναπτυξιακών διαταραχών

στους απογόνους. Το βαλπροϊκό οξύ μπορεί να προκαλέσει τερατογενέσεις όταν ληφθεί από γυναίκες κατά την διάρκεια εγκυμοσύνης. Πιο συγκεκριμένα στους ανθρώπους, οι περισσότερες μελέτες που αφορούν τις τερατογενέσεις εξαιτίας του βαλπροϊκού επικεντρώνονται στο πρώτο τρίμηνο της κύησης. Αυτή η περίοδος έχει συσχετιστεί με ένα σύμπλεγμα ανωμαλιών του προσώπου (λαγόχειλο και λυκόστομα, ευρεία ρινική βάση), μεγάλων δυσμορφιών (καρδιαγγειακές ανωμαλίες, ανωμαλίες των άκρων) και ανωμαλίες του νευρικού σωλήνα. Αυτό το σύνολο χαρακτηριστικών έχει χαρακτηριστεί ως «βαλπροϊκό σύνδρομο εμβρύου». Τα παιδιά με βαλπροϊκό σύνδρομο μπορεί επίσης να παρουσιάσουν γνωστικά προβλήματα συμπεριλαμβανομένων των χαμηλών δεικτών νοημοσύνης, μείωση μνήμης και αυτιστικής διαταραχής.

Η διπολική διαταραχή (γνωστή και ως διπολική συναισθηματική διαταραχή, μανιοκαταθλιπτική διαταραχή ή απλώς μανιοκατάθλιψη), είναι μια ψυχική νόσος. Τα άτομα με διπολική διαταραχή βιώνουν επεισόδια ανεβασμένης ή ευερέθιστης διάθεσης γνωστά ως μανία εναλλασσόμενα με επεισόδια κατάθλιψης. Λίγα είναι γνωστά για την παθογένεση της ασθένειας ή για άλλες συναισθηματικές διαταραχές αλλά ανταποκρίνεται σημαντικά σε φάρμακα σταθεροποίησης διάθεσης, όπως το λίθιο και το βαλπροϊκό οξύ.

Το βαλπροϊκό οξύ και το άλας του (βαλπροϊκό νάτριο) με αφετηρία το έτος 1995, οπότε έλαβε επίσημη έγκριση από τον FDA για τη θεραπεία επεισοδίων μανίας σε διπολικούς ασθενείς, επεκτάθηκε σταδιακά σε πλήθος ψυχιατρικών παθήσεων. Τέτοιες παθήσεις είναι η μείζων καταθλιπτική διαταραχή, οι αγχώδεις διαταραχές, τα στερητικά και εξαρτητικά από ουσίες σύνδρομα, η όψιμη δυσκινησία, η σχιζοφρένεια και οι σχιζοσυναισθηματικές διαταραχές, οι διαταραχές της διάθεσης, οι διαταραχές συμπεριφοράς, η διέγερση που σχετίζεται με άνοια, η νοητική υστέρηση με διαταραχές διάθεσης και συμπεριφοράς, καθώς και οι διαταραχές προσωπικότητας.

Τέλος, ανεπιθύμητες ενέργειες που μπορούν να προκληθούν από την χρήση βαλπροϊκού είναι οι ακόλουθες: γαστρικός ερεθισμός, ναυτία, έμετοι, γι' αυτό είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται εντεροδιαλυτά δισκία, απώλεια όσο και αύξηση βάρους. Σπανιότερα έχει παρατηρηθεί υπνηλία, κεφαλαλγία, ζάλη, τρόμος, αταξία, δυσαρθρία, κώμα, παροδική αλωπεκία, θρομβοπενία, λευκο-

πενία. Σπανίως, παγκρεατίτιδα, υπεραμμωναιμία, υπεργλυκαιμία, διαταραχές κύκλου ή αμηνόρροια.

3.8 Μέθοδοι προσδιορισμού (22-25)

Μερικές μέθοδοι έχουν δημοσιευτεί για τον προσδιορισμό του βαλπροϊκού οξέος σε βιολογικά δείγματα. Υγροχρωματογραφία με ανιχνευτή UV ή φθορισμού προσφέρει ικανοποιητική ευαισθησία, αλλά απαιτεί παραγωγοποίηση του φαρμάκου με προσθήκη κάποιας χρωμοφόρας ή φθορίζουσας ένωσης. Ο Amiri και οι συνεργάτες (22) του πραγματοποίησαν τον προσδιορισμό χωρίς την παραγωγοποίηση. Η επιθυμητή ευαισθησία εξασφαλίζεται χρησιμοποιώντας αεριοχρωματογραφία με φασματομετρία μαζών (GC-MS). Μέθοδοι LC-MS και LC-MS/MS έχουν αναπτυχθεί για ποσοτικοποίηση βαλπροϊκού οξέος.(22) Μια γρήγορη μέθοδος που αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε για να προσδιοριστεί το βαλπροϊκό στο αίμα είναι ο συνδυασμός της UPLC και διαδοχικής φασματομετρίας μαζών (MS/MS) με αρνητικό ιονισμό ηλεκτροψεκασμού.(22) Άλλες μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί για ποσοτικοποίηση του βαλπροϊκού είναι και οι ανοσοχημικές μέθοδοι, καθώς επίσης και μέθοδοι αεριοχρωματογραφίας με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας. Ικανοποιητική ευαισθησία σε δείγματα ρουτίνας εξασφαλίζεται με GC-MS/MS.(23)

Το βαλπροϊκό οξύ έχει προσδιοριστεί στον ορό του αίματος με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση και φθορισμομετρική ανίχνευση. Ο Polonski και οι συνεργάτες του περιέγραψαν μία τριχοειδή ισοταχοφόρηση (capillary isotachopheresis). Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκε αγωγιμομετρικός ανιχνευτής.(24) Άλλες μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν είναι χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας με την οποία προσδιορίστηκε στο πλάσμα μετά από επεξεργασία με 2,4 διβρωμοακετοφαινόνη με θέρμανση στους 70 °C για 40 min.(24)

Το βαλπροϊκό οξύ έχει προσδιοριστεί σε δισκία και πλάσμα με ιοντική χρωματογραφία, καθώς επίσης και με αεριοχρωματογραφία με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας.(24)

Στη ευρωπαϊκή φαρμακοποιία το βαλπροϊκό ως πρώτη ύλη προσδιορίζεται με τιτλοδότηση με υπερχλωρικό οξύ συγκέντρωσης 0,1M.(25)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού του βαλπροϊκού νατρίου και των προσμίξεων του συμπεριλαμβανομένου της πρόσμιξης C και του EDTA σε ενέσιμο διάλυμα. Η μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού του βαλπροϊκού νατρίου με αφετηρία την βρετανική φαρμακοποιία επικυρώθηκε καθώς επίσης και η μέθοδος προσδιορισμού προσμίξεων αν και η τελευταία παρουσίασε δυσκολίες στο να προσφέρει ικανοποιητικούς διαχωρισμούς ανάμεσα στο βαλπροϊκό και την πρόσμιξη C η οποία μελετήθηκε εκτενώς. Τέλος, στη μέθοδο προσδιορισμού EDTA πραγματοποιήθηκαν δευτερεύουσες αντιδράσεις προκειμένου να επιτευχθεί ανάπτυξη και επικύρωση στη μέθοδο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Χρησιμοποιήθηκαν τα χρωματογραφικά συστήματα HPLC της εταιρείας Shimadzu, το οποίο απαρτίζεται από έναν απαερωτή κινητής φάσης DGU-20A₅, μία αντλία δύο πιστονιών τύπου LC-20 AD, έναν αυτόματο δειγματολήπτη SIL-20A_{CHT}, ένα φούρνο για την ρύθμιση της θερμοκρασίας της στήλης τύπου CTO-20AC και τέλος έναν ανιχνευτή DAD SPD-M20 περιοχής ορατού και υπεριώδους. Ο χρωματογράφος είναι συνδεδεμένος με ξεχωριστό υπολογιστή, στον οποίο είναι εγκατεστημένο το λογισμικό LCSolutions (v.1.11 SP1) της εταιρείας Shimadzu. Με το λογισμικό αυτό, γίνεται ο έλεγχος της λειτουργίας του συστήματος, η καταγραφή, η επεξεργασία και η αποθήκευση των χρωματογραφημάτων.

Για την παρασκευή νερού καθαρότητας HPLC (HPLC grade), νερό βρύσης αρχικά διέρχεται από στήλη απιοντισμού και ακολούθως από ειδικό σύστημα παραγωγής ύδατος υψηλής καθαρότητας (EASYPure II (Barnstead)).

Για ζυγίσεις ποσοτήτων μεγαλύτερες από 10 mg, χρησιμοποιήθηκε ζυγός AUW 320 της εταιρείας Shimadzu, ενώ για ζυγίσεις μικρότερων ποσοτήτων, χρησιμοποιήθηκε ζυγός Sartorius 5 δεκαδικών ψηφίων.

Για τη διευκόλυνση της διάλυσης ορισμένων ουσιών, έγινε χρήση λουτρού υπερήχων (μοντέλο 2510 της εταιρείας Branson).

Όπου ήταν απαραίτητη η μέτρηση και η ρύθμιση του pH χρησιμοποιήθηκε πεχάμετρο HQ30d της εταιρείας Heach. Βαθμονόμηση του οργάνου γίνεται μία φορά την εβδομάδα με πρότυπα ρυθμιστικά διαλύματα pH 4,0, pH 7,0 και pH 10,0, ενώ έλεγχος καλής λειτουργίας γίνεται στην αρχή κάθε ημέρας με πρότυπα ρυθμιστικά διαλύματα pH 4,0 και pH 7,0.

Για την απομάκρυνση σωματιδίων που θα μπορούσαν να περιέχονται στην κινητή φάση και να προκαλέσουν απόφραξη στη στήλη, οι κινητές φάσεις διηθήθηκαν υπό κενό σε ειδική συσκευή. Η διήθηση έγινε με φίλτρα αναγεννημένης κυτταρίνης (RC55 membrane filter) από την εταιρεία Whatman, με πόρους 0,45 μm και διάμετρο 47 mm.

Ως υλικά αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν:

1. Βαλπροϊκό νάτριο-πρότυπο εργασίας, καθαρότητας 100,3% με αριθμό παρτίδας 443497 της εταιρείας Katwijk ZH, The Netherlands.
2. Πρόσμιξη C της EP, (2RS)-2-(1-μεθυλο-αιθυλο)πεντανοϊκό οξύ, καθαρότητας 98,4% με αριθμό παρτίδας 439696 (HO1-08) της εταιρείας Katwijk ZH, The Netherlands.
3. Δινάτριο άλας EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA))- πρότυπο εργασίας, με αριθμό παρτίδας 1084211000 της εταιρείας Merck.
4. 2-αιθυλοβαλερικό οξύ (2-ethylvaleric acid) καθαρότητας 99,7%, με αριθμό παρτίδας 441083 (HO1-07), της εταιρείας Katwijk ZH, The Netherlands.
5. 2-ν-βουτυλοβαλερικό οξύ (2-n-butylvaleric acid), καθαρότητας 99,8%, με αριθμό παρτίδας 441084 (HO1-11), της εταιρείας Katwijk ZH, The Netherlands.
6. 2-μεθυλο-βαλερικό οξύ (2-methylvaleric acid) καθαρότητας 99%, με αριθμό παρτίδας 442331 (HO1-06), της εταιρείας Katwijk ZH, The Netherlands.
7. η -βαλερικό οξύ (n-valeric acid) καθαρότητας 99,7%, με αριθμό παρτίδας 440457 (HO1-05), της εταιρείας Katwijk ZH, The Netherlands.
8. Βαλερονιτρίλιο (valeronitril) καθαρότητας 100%, με αριθμό παρτίδας 440237 (HO1-01), της εταιρείας Katwijk ZH, The Netherlands.
9. Αμίδιο βαλπροϊκού οξέος (valproic acid amide) καθαρότητας 98,7%, με αριθμό παρτίδας 440130 (HO1-12), της εταιρείας Katwijk ZH, The Netherlands.
10. Μεθυλεστέρας βαλπροϊκού οξέος (valproic acid methyl ester) καθαρότητας 100%, με αριθμό παρτίδας 442438 (HO1-02), της εταιρείας Katwijk ZH, The Netherlands.

Διαλύτες – Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν:

1. Ύδωρ υψηλής αναλυτικής καθαρότητας (HPLC-grade).
2. Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (potassium dihydrogen phosphate, KH_2PO_4), της εταιρείας Lachner.
3. Μεθανόλη (MeOH) της εταιρείας Fisher.
4. Ορθο-φωσφορικό οξύ ($\text{o-H}_3\text{PO}_4$) 85% της εταιρείας Lachner.
5. Ακετονιτρίλιο (ACN) της εταιρείας Carlo Erba.

6. Διάλυμα υδροξειδίου του τετραβουτυλαμμωνίου συγκέντρωσης 1 M σε μεθανόλη της εταιρείας ACROS.
7. Νιτρικός χαλκός τριυδρικός της εταιρείας Sigma Aldrich.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού της δρα- στικής ουσίας βαλπροϊκό νάτριο σε ενέσιμο διάλυμα

5.1 Ανάπτυξη ποσοτικού προσδιορισμού βαλπροϊκού νατρίου

Η ανάπτυξη της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού της δραστικής του βαλπροϊκού νατρίου σε ενέσιμο διάλυμα βασίστηκε στην μέθοδο HPLC της βρετανικής φαρμακοποιίας για πόσιμο διάλυμα βαλπροϊκού νατρίου. (26)

Η επιλογή του μήκους κύματος εξηγείται με την χαμηλή απορρόφηση που παρουσιάζει το βαλπροϊκό νάτριο καθώς δεν περιέχει κάποια χαρακτηριστική χρωμοφόρα ομάδα ή κάποιο δεσμό. Επιλέγοντας ως μήκος κύματος τα 210 nm εξασφαλίστηκε μεγαλύτερη ευαισθησία.

Το βαλπροϊκό νάτριο στα διαλύματα του δίσταται στα ιόντα του. Σε έναν αντίστροφης φάσης χρωματογραφικό διαχωρισμό, το αποτέλεσμα δεν είναι ικανοποιητικό, το βαλπροϊκό ιόν εκλούεται γρήγορα καθώς δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με στήλες μη πολικές. Για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα ρυθμίστηκε το *pH* της κινητής φάσης σε *pH* παρόμοιο με το *pKa* του βαλπροϊκού οξέος και υπό την επίδραση του οργανικού διαλύτη, το βαλπροϊκό ιόν πρωτονιώνεται και καθίσταται άπολο γεγονός το οποίο συντέλεσε στον ικανοποιητικό διαχωρισμό με την C18, 250×4,6 mm, 5 μm.

5.2 Επιλογή χρωματογραφικών παραμέτρων για την προς επικύρωση μέθοδο

- Αναλυτική στήλη: Χρησιμοποιήθηκε αναλυτική στήλη της εταιρείας Thermo Scientific, τύπου BDS Hypersil C18, 250×4,6 mm, 5 μm.
- Κινητή φάση: Παρασκευάστηκε με ανάμιξη δισόξινου φωσφορικού καλίου συγκέντρωσης 0,05 M με μεθανόλη σε αναλογία 35:65. Ακολούθησε ρύθμιση του *pH* στην τιμή 5,0 με αραιωμένο διάλυμα ορθοφωσφορικού οξέος.
- Όγκος ένεσης: 20 μL
- Ταχύτητα ροής κινητής φάσης: 1,0 mL/min
- Θερμοκρασία στήλης: 25 °C

- Θερμοκρασία δειγματολήπτη: 25 °C
- Χρόνος ανάλυσης: 15 min
- Μήκος κύματος ανίχνευσης: 210 nm

5.3 Επικύρωση μεθόδου

5.3.1 Παρασκευή διαλυμάτων

Ακολουθεί περιγραφή του τρόπου παρασκευής και σύστασης των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, αλλά και της διαδικασίας επικύρωσης που εφαρμόστηκε.

5.3.1.1 Πρότυπο διάλυμα βαλπροϊκού νατρίου

Μεταφέρθηκαν 32,0 mg προτύπου εργασίας βαλπροϊκού νατρίου σε μία ογκομετρική φιάλη των 10 ml. Προστέθηκαν 3 ml κινητής φάσης και ανακινήθηκε μέχρι πλήρους διαλύσεως. Στη συνέχεια προστέθηκαν 200 μL ορθοφωσφορικού οξέος 10% και αραιώθηκε μέχρι την χαραγή με κινητή φάση (3200 μg / mL). Η συγκέντρωση επιλέχθηκε να είναι ίδια με την συγκέντρωση στο διάλυμα ελέγχου (§5.3.4).

5.3.1.2 Αραιωμένο ορθοφωσφορικό οξύ 10%

6,0 mL ορθοφωσφορικού οξέος αραιώθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml με νερό.

5.3.1.3 Διάλυμα ελέγχου (test solution)

Μία ακριβώς ζυγισμένη ποσότητα του τελικού προϊόντος (ενέσιμου διαλύματος), η οποία αντιστοιχεί σε 80,0 mg βαλπροϊκού νατρίου μεταφέρεται σε μία ογκομετρική φιάλη των 25 mL. Προστέθηκαν 500 μL αραιωμένου ορθοφωσφορικού οξέος και αραιώθηκαν με κινητή φάση μέχρι τη χαραγή.

5.3.2 Διάλυμα καταλληλότητας συστήματος (system suitability solution)

Μία επακριβώς ζυγισμένη ποσότητα βαλπροϊκού νατρίου προτύπου εργασίας 32 mg και μία επακριβώς ζυγισμένη ποσότητα πρόσμιξης C προτύπου εργασίας 3,2 mg προστίθενται σε μία ογκομετρική φιάλη των 10 mL. Προστέθηκαν 3,0 mL κινητής φάσης μέχρι να διαλυθούν πλήρως και 200 μL αραιωμένου ορθοφωσφορικού οξέος 10% και αραιώνονται με κινητή φάση μέχρι την χαραγή.

Κριτήρια αποδοχής: η διαχωριστικότητα (resolution) ανάμεσα στις δύο κορυφές θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη ή ίση του 2,0.

5.3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός

Ο υπολογισμός της εκατοστιαίας περιεκτικότητας του δείγματος σε βαλπροϊκό νάτριο γίνεται με την παρακάτω εξίσωση:

$$\% \text{περιεκτικότητα} = \frac{A_{\text{δείγματος}}}{A_{\text{προτύπου}}} \times \frac{W_{\text{προτύπου}}}{32} \times \%P[25]$$

Όπου:

$A_{\text{δείγματος}}$: το εμβαδόν της επιφάνειας της κορυφής που εμφανίζεται στο χρωματογράφημα για το διάλυμα ελέγχου.

$A_{\text{προτύπου}}$: το εμβαδόν της επιφάνειας της κορυφής που εμφανίζεται στο χρωματογράφημα για το πρότυπο διάλυμα.

$W_{\text{προτύπου}}$: η ακριβής ποσότητα πρότυπης ουσίας που χρησιμοποιήθηκε στην παρασκευή πρότυπου διαλύματος σε mg.

%P: η εκατοστιαία καθαρότητα του πρότυπου βαλπροϊκού νατρίου.

5.4 Πρωτόκολλο επικύρωσης- Αποτελέσματα

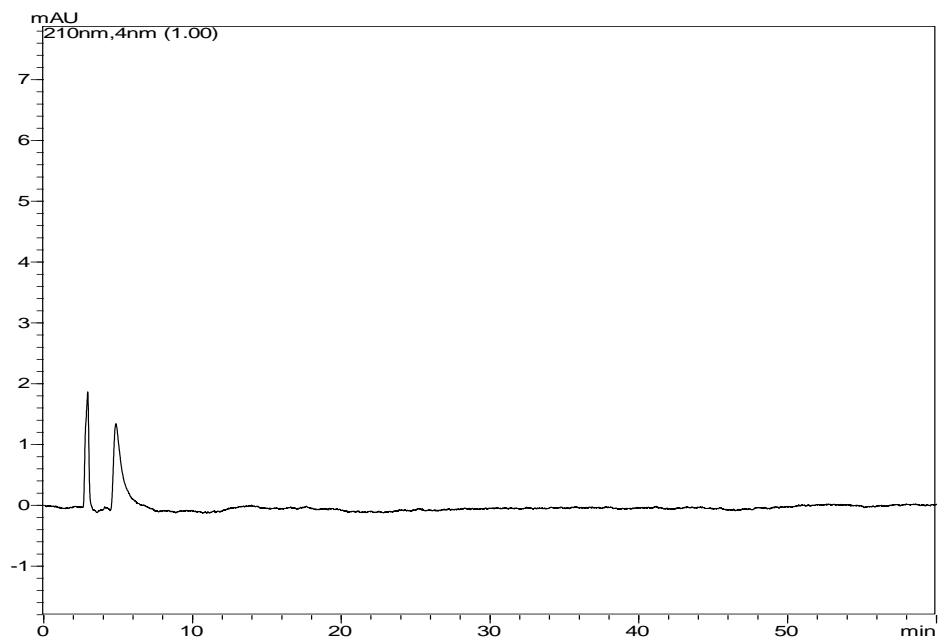
5.4.1 Ειδικότητα

Για την εκτίμηση της ειδικότητας χρησιμοποιήθηκαν διάλυμα placebo 100% (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και EDTA) και εμβολιασμένο διάλυμα B (spiked) 100%, όπως περιγράφεται στο εδάφιο της ακρίβειας (5.4.5). Για να αποδειχθεί η μέθοδος ειδική πρέπει :

- Καμία κορυφή του placebo να μην εμφανίζεται στον χρόνο ανάλυσης του βαλπροϊκού.
- Να ικανοποιείται ο έλεγχος καταλληλότητας συστήματος, όπως αναφέρθηκε παραπάνω (§5.3.2).
- Η καθαρότητα της χρωματογραφικής κορυφής που αντιστοιχεί στο βαλπροϊκό στο τελικό προϊόν να είναι μεγαλύτερη ή ίση από το 0,98.

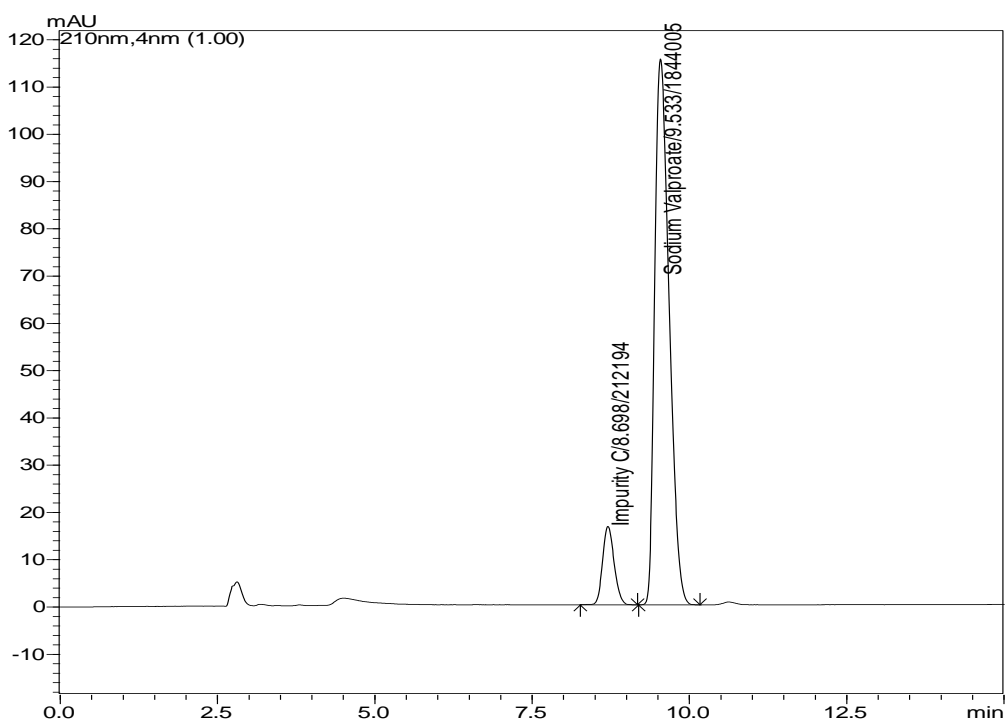
Τα αποτελέσματα ελέγχου της ειδικότητας είναι τα παρακάτω:

[1] Στο διάλυμα του placebo καμία κορυφή δεν εμφανίστηκε στον χρόνο ανάλυσης του βαλπροϊκού (χρόνος ανάλυσης περίπου 10 min).



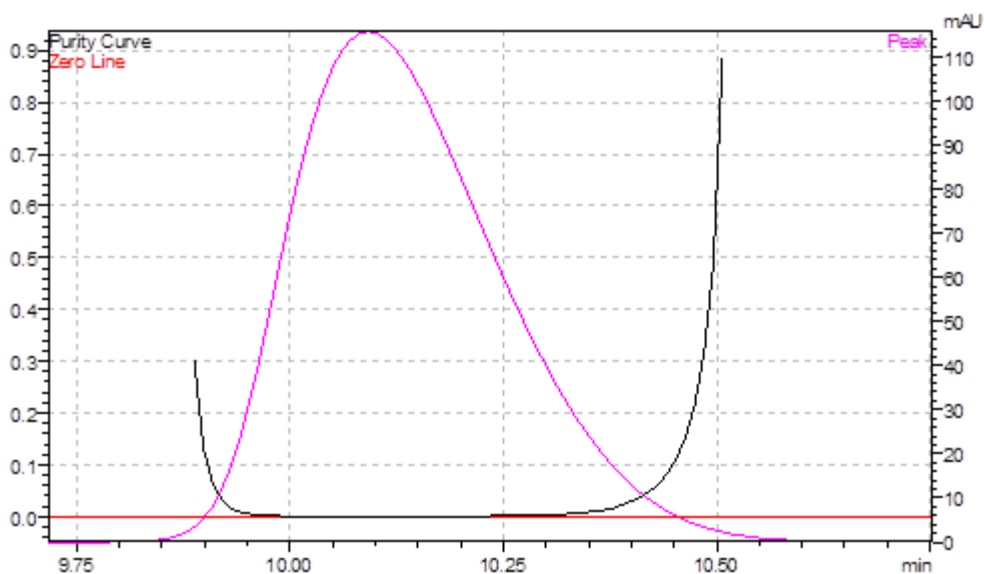
Σχήμα 1: Χρωματογράφημα placebo που προέκυψε από μελέτη ειδικότητας στον ποσοτικό προσδιορισμό βαλπροϊκού.

[2] Η διαχωριστικότητα ανάμεσα στο βαλπροϊκό και την πρόσμιξη C υπολογίστηκε ίση με 2,1.



Σχήμα 2: Χρωματογράφημα διαλύματος ελέγχου καταλληλότητας συστήματος στον ποσοτικό προσδιορισμό βαλπροϊκού

[3] Η καθαρότητα της χρωματογραφικής κορυφής του βαλπροϊκού στο διάλυμα εργασίας βρέθηκε να είναι μεγαλύτερη από 0,99 (UV φάσμα).



Σχήμα 3: Φάσμα ελέγχου καθαρότητας της κορυφής του βαλπροϊκού.

5.4.2 Γραμμικότητα

Παρασκευάστηκαν πέντε πρότυπα διαλύματα εργασίας από ένα πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης, καλύπτοντας διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων. Το πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης συγκέντρωσης 16,0 mg/mL παρασκευάστηκε με μεταφορά 160 mg βαλπροϊκού νατρίου σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL στην οποία προστέθηκαν 3 mL κινητής φάσης και 200 μ L αραιωμένου ορθοφωσφορικού οξέος. Μετά την ανάδευση το διάλυμα αραιώθηκε μέχρι την χαραγή με κινητή φάση.

Πρότυπο διάλυμα A (2560 μ g/mL): αντιστοιχεί στο 80% της συγκέντρωσης εργασίας και παρασκευάζεται με προσθήκη 0,80 mL του πρότυπου διαλύματος παρακαταθήκης σε ογκομετρική φιάλη των 5 mL και αρραίωση μέχρι την χαραγή με κινητή φάση.

Πρότυπο διάλυμα B (2880 μ g/mL): αντιστοιχεί στο 90% της συγκέντρωσης εργασίας και παρασκευάζεται όπως το διάλυμα A αλλά με προσθήκη 0,90 mL πρότυπου διαλύματος παρακαταθήκης.

Πρότυπο διάλυμα C (3200 μ g/mL): αντιστοιχεί στο 100% της συγκέντρωσης εργασίας και παρασκευάζεται όπως το διάλυμα A αλλά με προσθήκη 1,00 mL πρότυπου διαλύματος παρακαταθήκης.

Πρότυπο διάλυμα D (3520 $\mu\text{g}/\text{mL}$): αντιστοιχεί στο 110% της συγκέντρωσης εργασίας και παρασκευάζεται όπως το διάλυμα A αλλά με προσθήκη 1,10 mL πρότυπου διαλύματος παρακαταθήκης.

Πρότυπο διάλυμα E (3840 $\mu\text{g}/\text{mL}$): αντιστοιχεί στο 120% της συγκέντρωσης εργασίας και παρασκευάζεται όπως το διάλυμα A αλλά με προσθήκη 1,20 mL πρότυπου διαλύματος παρακαταθήκης.

Το καθένα από τα πέντε πρότυπα, μετρήθηκε τρεις φορές και ο μέσος όρος των εμβαδών, χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης. Εφαρμόσθηκε η μέθοδος των ελαχίστων τετραγώνων και υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης (r), η τομή της ευθείας παλινδρόμησης με τον άξονα των y , η κλίση της καμπύλης και η τυπική απόκλιση των υπολοίπων.

Για να είναι αποδεκτή η γραμμικότητα, θα πρέπει ο συντελεστής συσχέτισης r να μην είναι μικρότερος από 0,99 και η ευθεία παλινδρόμησης να περνάει από το μηδέν. Τα αποτελέσματα ελέγχου γραμμικότητας παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 2: Αποτελέσματα ελέγχου γραμμικότητας για τον ποσοτικό προσδιορισμό του βαλπροϊκού

Πρότυπο διάλυμα/ (% συγκέντρωση εργασίας)	Συγκέντρωση ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Εμβαδόν κορυφής	Μέσος όρος (\pm SD)/ %RSD
A/ (80%)	2560	1530611 1529523 1521733	152,73 (\pm0,48) $\times 10^4$ 0,32
B/ (90%)	2880	1728645 1728774 1725633	172,77 (\pm0,18) $\times 10^4$ 0,10
C/ (100%)	3200	1938919 1944476 1948906	194,41 (\pm0,50) $\times 10^4$ 0,26
D/ (110%)	3520	2120795 2121394 2119363	212,05 (\pm0,10) $\times 10^4$ 0,05
E/ (120%)	3840	2313635 2313479 2311475	231,29 (\pm0,12) $\times 10^4$ 0,05

Μετά από εφαρμογή της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων προέκυψαν τα εξής χαρακτηριστικά της εξίσωσης παλινδρόμησης:

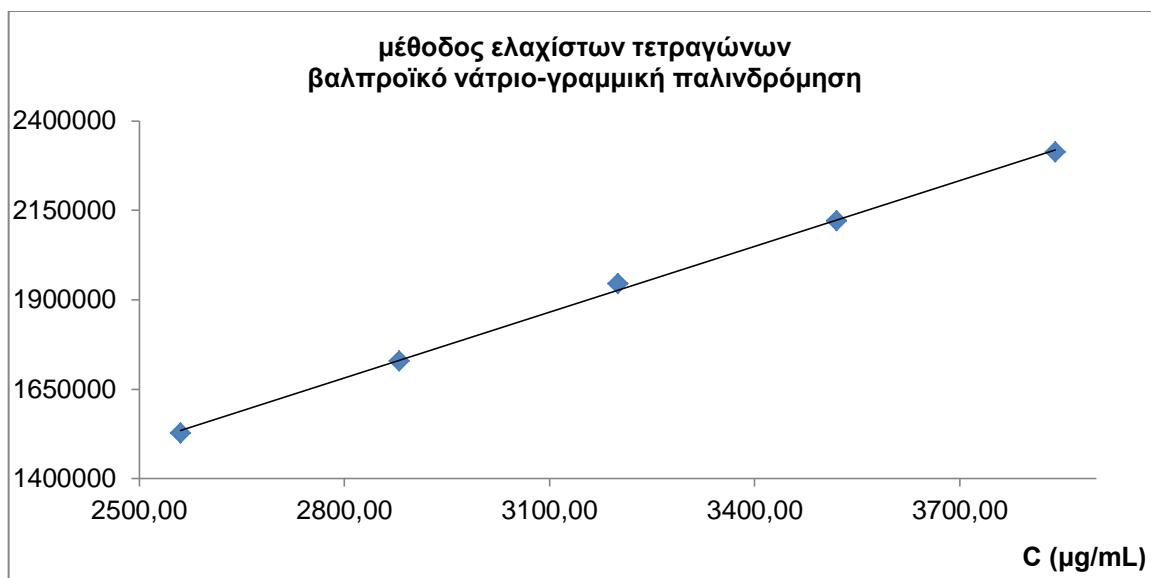
Τομή: $-3,75 (\pm 0,37) \times 10^4$ (μονάδες εμβαδού)

Κλίση: $6,13 (\pm 0,11) \times 10^2$ (μονάδες εμβαδού $\times \text{mL} \times \mu\text{g}^{-1}$)

Συντελεστής συσχέτισης (r): 0,9995.

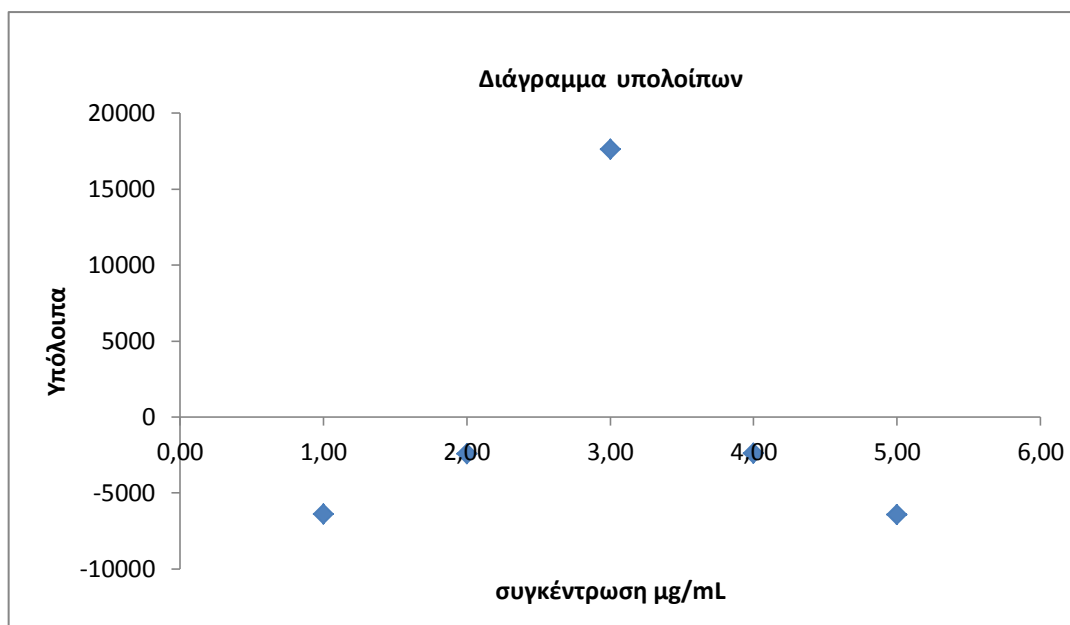
Η μέθοδος αποδεικνύει γραμμική συσχέτιση.

Ακολουθεί η γραφική παράσταση της καμπύλης βαθμονόμησης για το βαλπροϊκό νάτριο.



Σχήμα 4: Γραφική παράσταση της καμπύλης βαθμονόμησης για το βαλπροϊκό.

Παρακάτω παρουσιάζεται το διάγραμμα υπολοίπων για την καμπύλη βαθμονόμησης βαλπροϊκού από την οποία δεν προκύπτουν έκτροπες τιμές.



Σχήμα 5: Διαγραμματική απεικόνιση υπολοίπων καμπύλης βαθμονόμησης του βαλπροϊκού.

5.4.3 Εύρος

Από τη μελέτη της γραμμικότητας και της ακρίβειας, προέκυψε το εύρος των συγκεντρώσεων γραμμικής απόκρισης της μεθόδου. Η γραμμική περιοχή αντιστοιχεί στις συγκεντρώσεις 2560-3840 $\mu\text{g/mL}$, η οποία αντιστοιχεί στο 80-120% της συγκέντρωσης εργασίας με $\%RSD \leq 0,32$.

5.4.4 Πιστότητα

A) Πιστότητα συστήματος

Η πιστότητα του συστήματος αξιολογήθηκε μετρώντας το εμβαδόν τριών επαναλαμβανόμενων μετρήσεων του κάθε πρότυπου διαλύματος. Η πιστότητα εκφράζεται με την σχετική τυπική απόκλιση του εμβαδού της κορυφής του βαλπροϊκού η οποία πρέπει να είναι μικρότερη ή ίση του 1,5%.

B) Επαναληψιμότητα

Παρασκευάστηκαν έξι ανεξάρτητα διαλύματα εργασίας και ένα πρότυπο διάλυμα σύμφωνα με την αναλυτική διαδικασία και αναλύθηκαν κάθε ένα από τα ανεξάρτητα διαλύματα εργασίας. Υπολογίστηκε η εκατοστιαία ανάκτηση του κάθε δείγματος και η αντίστοιχη σχετική τυπική απόκλιση η οποία πρέπει να είναι μικρότερη ή ίση του 2,0%.

Γ) Ενδιάμεση πιστότητα

Πραγματοποιήθηκαν τρεις επιπλέον μελέτες επαναληψιμότητας χρησιμοποιώντας τρία ανεξάρτητα διαλύματα εργασίας: α) σε διαφορετική μέρα, β) από διαφορετικό αναλυτή, γ) σε διαφορετικό όργανο. Υπολογίστηκε η εκατοστιαία ανάκτηση και η αντίστοιχη σχετική τυπική απόκλιση.

Η ενδιάμεση πιστότητα υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας “one way anova”. Η τυπική απόκλιση S_R που είναι μέσο υπολογισμού της ενδιάμεσης πιστότητας υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$S_R = \sqrt{S_r^2 + S_g^2} [26]$$

Όπου,

S_r^2 : διακύμανση εντός των ομάδων (within groups variance, within groups MS)

S_g^2 : διακύμανση μεταξύ των ομάδων (between groups variance), που ισούται

με:

$$S_g^2 = (between_{MS} \times (k, n) - S_r^2 \times (k, n)) [27]$$

Εάν $S_r^2 \times (k, n) > between_{MS} \times (K, N)$, τότε $S_G^2 = between_{MS} \times (k, n)$

Όπου:

$$k, n = \frac{(k-1) \sum n_j}{(\sum n_j)^2 - \sum (n_j^2)} [28]$$

k =αριθμός των σειρών (3 σε αυτή την περίπτωση).

n_j =αριθμός των μετρήσεων στη j^{th} σειρά (6.3.3) σε αυτή την περίπτωση. Επομένως σε αυτή την περίπτωση $k, n=0,26667$.

Οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις $\%RSD_r$ και $\%RSD_R$, υπολογίζονται διαιρώντας τις αντίστοιχες αποκλίσεις S_r και S_R , με το συνολικό μέσο όρο των τιμών και πολλαπλασιάζοντας με 100.

Κριτήρια αποδοχής: η ολική επαναληψιμότητα $\%RSD_r$ πρέπει να είναι μικρότερη ή ίση του 2,0 και η ενδιάμεση πιστότητα $\%RSD_R$ πρέπει να είναι μικρότερη ή ίση του 5,0.

Τα αποτελέσματα από την παραπάνω μελέτη συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3: Αποτελέσματα πιστότητας για τον ποσοτικό προσδιορισμό του βαλπροϊκού

	Εμβαδόν κορυφής βαλπροϊκού σε πρότυπο διάλυμα		Συγκεντρωση διαλύματος εργασίας (μg /mL)	Εμβαδόν κορυφής βαλπροϊκού σε διάλυμα εργασίας	% Ανάκτηση	Μέσος όρος (±SD)/ RSD %
ΑΝΑΛΥΤΗΣ 1 ΗΜΕΡΑ 1 ΟΡΓΑΝΟ 1		1918458 1915599	3246 3275 3288 3235	1929139 1917559 1919184 1918699	103,25 101,71 101,40 103,03	102,24 (±0,82) 0,81
	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ C_{πρωτ.} (μg·mL⁻¹)	1917029 3330	3285 3248	1918177 1918246	101,44 102,60	
ΑΝΑΛΥΤΗΣ 2 ΟΡΓΑΝΟ 2		1926643 1927545	3251 3282 3284	1931639 1936863 1937736	102,66 101,98 101,95	102,20 (±0,41) 0,40
	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ C_{πρωτ.} (μg·mL⁻¹)	1927094 3330				
ΗΜΕΡΑ 2		1922865 1926359	3257 3241 3268	1946520 1942621 1946425	101,85 102,15 101,51	101,84 (±0,32) 0,31
	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ C_{πρωτ.} (μg·mL⁻¹)	1924612 3280				

Επαναληψιμότητα %RSD=0,81.

Ολική επαναληψιμότητα %RSD=0,65.

Ενδιάμεση πιστότητα %RSD=0,59.

Τα κριτήρια αποδοχής ικανοποιήθηκαν.

5.4.5 Ακρίβεια

Η αξιολόγηση της ακρίβειας έγινε με την προετοιμασία τριών ανεξάρτητων εμβολιασμένων δειγμάτων που περιέχουν τη δραστική ουσία και τα έκδοχα σε τρία διαφορετικά επίπεδα, καλύπτοντας τη γραμμική περιοχή.

Εμβολιασμένο διάλυμα Α (Επίπεδο ενίσχυσης 2560 µg/mL που αντιστοιχεί στο 80% της συγκέντρωσης εργασίας) το διάλυμα αυτό περιέχει τα έκδοχα που αντιστοιχούν σε 32 mg βαλπροϊκού νατρίου (σύμφωνα με την σύνθεση του τελικού προϊόντος) και 25,6 mg βαλπροϊκού νατρίου υλικού αναφοράς τα οποία μαζί με 200 µL αραιωμένου ορθοφωσφορικού οξέος αραιώνονται μέχρι την χαραγή ογκομετρικής φιάλης 10,0mL με κινητή φάση.

Εμβολιασμένο διάλυμα Β (Επίπεδο ενίσχυσης 3200 µg/mL που αντιστοιχεί στο 100% της συγκέντρωσης εργασίας) το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται όπως το προηγούμενο αλλά με προσθήκη 32,0 mg βαλπροϊκού νατρίου.

Εμβολιασμένο διάλυμα Γ (Επίπεδο ενίσχυσης 3840 µg/mL που αντιστοιχεί στο 120% της συγκέντρωσης εργασίας) το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται όπως το πρώτο αλλά με προσθήκη 38,4 mg βαλπροϊκού νατρίου.

Επίσης παρασκευάστηκε ένα πρότυπο διάλυμα σύμφωνα με την μέθοδο του πρωτοκόλλου. Υπολογίστηκε η %ανάκτηση του κάθε δείγματος και η εκατοστιαία τυπική απόκλιση των ανακτήσεων.

$$\%Ανάκτηση = \frac{\%Περιεκτικότητα}{Επίπεδο ενίσχυσης} [29]$$

Κριτήρια αποδοχής: η εκατοστιαία ανάκτηση πρέπει να βρίσκεται στα αποδεκτά όρια 98 – 102% και η εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση να είναι μικρότερη ή ίση με το 2,0. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ακρίβειας:

Πίνακας 4: Αποτελέσματα ακρίβειας για τον ποσοτικό προσδιορισμό του βαλπροϊκού νατρίου.

Εμβολιασμένο διάλυμα	Εμβαδόν κορυφής βαλπροϊκού σε πρότυπο διάλυμα	Εμβαδόν κορυφής βαλπροϊκού σε εμβολιασμένο διάλυμα	%Ενίσχυση	% Ανάκτηση	Μέσος όρος (\pm SD)/RSD %
A	1931608	1379508	75	99,06	99,06 (\pm0,08) 0,08
	1932691	1380619	75	99,14	
	1932400	1378335	75	98,97	
	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ 1932233				
B	1931608	1981097	105	101,61	101,56 (\pm0,06) 0,06
	1932691	1980473	105	101,58	
	1932400	1978764	105	101,49	
	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ 1932233				
C	1931608	2339723	124	101,62	101,57 (\pm0,14) 0,14
	1932691	2334898	124	101,41	
	1932400	2341216	124	101,68	
	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ 1932233				

%Ανάκτηση=98,97-101,68

%RSD=0,14.

Τα κριτήρια αποδοχής ικανοποιήθηκαν σύμφωνα με τον πίνακα αποτελεσμάτων.

5.4.6 Ανθεκτικότητα

Η ανθεκτικότητα μελετάται κατά την ανάπτυξη της μεθόδου. Ο σκοπός της μελέτης είναι να δείξει την αξιοπιστία της μεθόδου και να επισημάνει τις παραμέτρους που, κυρίως, επηρεάζουν την ανάλυση.

- Παρασκευάστηκε ένα διάλυμα ελέγχου καταλληλότητας συστήματος (§5.3.2). Εκτιμήθηκε η επίδραση των ακόλουθων παραμέτρων στην προσδιορισμένη %ανάκτηση, με βάση τον παραγοντικό σχεδιασμό των Plackett και Burman.
 - 1) Το ποσοστό της μεθανόλης στην κινητή φάση
 - 2) Το *pH* της κινητής φάσης.
 - 3) Η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης.

Κριτήρια αποδοχής: η διαχωριστικότητα των κορυφών ανάμεσα στο βαλπροϊκό και στην πρόσμιξη C να είναι μεγαλύτερη ή ίση του 2,0.

Πίνακας 5: Παράγοντες ανθεκτικότητας για τον ποσοτικό προσδιορισμό του βαλπροϊκού.

Παράγοντας A: ποσοστό μεθανόλης στην κινητή φάση (% v/v)	+επίπεδο: 65 - επίπεδο: 64
Παράγοντας B: pH κινητής φάσης	+ επίπεδο: 5,0 - επίπεδο: 4,8
Παράγοντας Γ: ροή κινητής φάσης (mL/min)	+ επίπεδο: 1,0 - επίπεδο: 1,1

Πίνακας 6: Πειράματα ανθεκτικότητας για τον ποσοτικό προσδιορισμό του βαλπροϊκού.

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

Πίνακας 7: Αποτελέσματα διαχωριστότητας ανάμεσα στις κορυφές βαλπροϊκού και πρόσμιξης C.

<i>Πείραμα</i>	<i>Διαχωριστότητα ανάμεσα στις κορυφές βαλπροϊκού και πρόσμιξης C</i>
Υ1	2,1
Υ2	2,5
Υ3	2,2
Υ4	2,2

- Επιπλέον μελετήθηκε η σταθερότητα του διαλύματος παρασκευάζοντας διάλυμα εργασίας το οποίο αναλύθηκε τη ίδια ημέρα και μετά από 24 ώρες.

Κριτήρια αποδοχής: η %ανάκτηση πρέπει να ανήκει στην περιοχή 98%-102% και η εκατοστιαία τυπική απόκλιση να είναι μικρότερη ή ίση του 2,0.

Πίνακας 8: Αποτελέσματα σταθερότητας βαλπροϊκού σε διάλυμα ημέρας και του ίδιου μετά από 24 ώρες για τον ποσοτικό προσδιορισμό του βαλπροϊκού.

	<i>Εμβαδόν βαλπροϊκού σε πρότυπο διάλυμα ($C_{\text{πρωτ}} = 3279,8 \mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)</i>	<i>Συγκέντρωση διαλύματος εργασίας</i>	<i>Εμβαδόν βαλπροϊκού σε διάλυμα εργασίας</i>	<i>%Ανάκτηση</i>
ΤΗΝ ΙΔΙΑ ΜΕΡΑ	1922865	3257	1946520	101,85
	1926359	3241	1942621	102,15
	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ	1924612	3268	1946425
ΜΕΤΑ ΑΠΟ 24 ΩΡΕΣ	1928426	3257	1949521	101,85
	1926693	3241	1949993	102,38
	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ	1927560	3268	1949568

Τα διαλύματα εργασίας ικανοποιούν τα κριτήρια και εμφανίζονται σταθερά για τουλάχιστον 24 ώρες. Η σύγκριση των ανακτήσεων των διαλυμάτων ημέρας και των ίδιων μετά από 24 ώρες παρουσιάζεται στον επόμενο πίνακα.

Πίνακας 9: Αποτελέσματα %λόγων ανάκτησης που προκύπτουν από διάλυμα ημέρας και του ίδιου μετά από 24 ώρες.

	%Λόγος ανάκτησης σε σύγκριση με διάλυμα ημέρας
1.	100,00
2.	100,23
3.	100,01
Μέσος Όρος (±SD)/ RSD %	100,08 (±0,13) 0,13%

5.5 Συμπέρασμα

Η μέθοδος προσδιορισμού του βαλπροϊκού νατρίου, κρίθηκε πως παρέχει αξιόπιστα αποτελέσματα. Αποδείχθηκε πως είναι ειδική, χαρακτηρίζεται από γραμμικότητα, είναι ακριβής, επαναλήψιμη, ανθεκτική και γενικά, ικανοποιεί όλα τα αναγκαία κριτήρια.

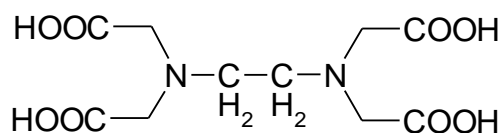
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού δινάτριου άλατος EDTA(disodium edetate) σε ενέσιμο διάλυμα βαλπροϊκού νατρίου

6.1 Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού EDTA

Η ανάπτυξη της μεθόδου προσδιορισμού του EDTA βασίστηκε σε εσωτερική (in house) επικυρωμένη μέθοδο προσδιορισμού EDTA για οφθαλμικές σταγόνες.

Το δινάτριο άλας EDTA χρησιμοποιείται στην φαρμακοβιομηχανία ως έκδοχο προκειμένου να βελτιώσει την σταθερότητα των προϊόντων. Ο προσδιορισμός του δεν είναι εφικτός διότι δεν περιέχει κάποια χρωμοφόρα ομάδα. Το δινάτριο άλας EDTA όταν διαλύεται στο νερό ιοντίζεται. Το EDTA είναι χηλικός εξασχιδής υποκαταστάτης διαθέτοντας δύο θέσεις σύνδεσης από τις αμινοομάδες και τέσσερις θέσεις σύνδεσης από τις καρβοξυλομάδες (Εικόνα 10). Το EDTA σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα σχεδόν με το σύνολο των μεταλλικών κατιόντων. Το EDTA δρα ως συμπλεκτικό αντιδραστήριο βαρέων μετάλλων τα οποία προκαλούν καταλυτική διάσπαση των φαρμάκων. Ο προσδιορισμός με HPLC βασίζεται στην δημιουργία γαλάζιου συμπλόκου με τον χαλκό παρουσία τετραβουτυλαμμωνίου στην κινητή φάση σύμφωνα με την αντίδραση, $Cu^{2+} + Y^{4-} \rightleftharpoons CuY^{2-}$, ο οποίος απορροφά έντονα στα 254 nm.



Εικόνα 9: Δομή EDTA

6.2 Επιλογή χρωματογραφικών παραμέτρων για την προς επικύρωση μέθοδο

- Αναλυτική στήλη: Χρησιμοποιήθηκε αναλυτική στήλη της εταιρείας Waters τύπου Spherisorb ODS2, 150×4,6 mm, 5 μm.
- Κινητή φάση: Αποτελείται από το διάλυμα Α και το διάλυμα Β με μία αναλογία 90/10. Το διάλυμα Α προκύπτει με την ανάμειξη 6 mL διαλύματος υδροξειδίου του τετραβουτυλαμμωνίου με 794 mL νερού. Ακολουθεί

ρύθμιση του pH στην τιμή 6,5 με ορθοφωσφορικό οξύ. Το διάλυμα Β είναι ακετονιτρίλιο.

- Όγκος ένεσης: 20 μL
- Ταχύτητα ροής κινητής φάσης: 2 mL/min
- Θερμοκρασία στήλης: 25 $^{\circ}C$
- Θερμοκρασία δειγματολήπτη: 25 $^{\circ}C$
- Χρόνος ανάλυσης: 20 min
- Μήκος κύματος ανίχνευσης: 254 nm

6.3 Επικύρωση μεθόδου

6.3.1 Παρασκευή διαλυμάτων

6.3.1.1 Πρότυπο διάλυμα δινατρίου άλατος EDTA

Μία ακριβώς ζυγισμένη ποσότητα 10 mg μεταφέρεται σε μία ογκομετρική φιάλη των 100 mL . Διαλύεται με νερό και αραιώνεται μέχρι την χαραγή (100 $\mu g/mL$).

6.3.1.2 Διάλυμα 0,02% δισθενούς νιτρικού χαλκού

258 mg τριυδρικού δισθενούς νιτρικού χαλκού διαλύονται σε νερό και το διάλυμα αραιώνεται μέχρι όγκου 1000 mL με τον ίδιο διαλύτη.

6.3.1.3 Διάλυμα ελέγχου (test solution)

5,0 mL ενέσιμου διαλύματος μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 20 mL και αραιώνονται μέχρι την χαραγή με νερό.

6.3.1.4 Παραγωγοποίηση

Πριν τον χρωματογραφικό διαχωρισμό αναμιγνύονται 0,5 mL , είτε του διαλύματος ελέγχου είτε/και του πρότυπου διαλύματος με 0,5 mL του 0,02% δισθενούς νιτρικού χαλκού προκειμένου να δημιουργηθεί σύμπλοκο του Cu^{+2} με το EDTA.

6.3.2 Έλεγχος καταλληλότητας συστήματος

Εισάγω τρεις φορές στο χρωματογραφικό σύστημα το πρότυπο διάλυμα δινατρίου άλατος EDTA.

Κριτήρια αποδοχής: η σχετική τυπική απόκλιση των εμβαδών πρέπει να είναι μικρότερη ή ίση του 2,0%.

6.3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός

Ο υπολογισμός της εκατοστιαίας περιεκτικότητας του δείγματος σε EDTA δίνεται από την σχέση:

$$\% \text{Περιεκτικότητα} = \frac{A_{\text{δείγματος}}}{A_{\text{πρότυπου}}} \times \frac{W_{\text{πρότυπου}}}{10} \times \%P[30]$$

Όπου:

$A_{\text{δείγματος}}$: εμβαδόν της επιφάνειας της κορυφής που εμφανίζεται στο χρωματογράφημα για το διάλυμα ελέγχου.

$A_{\text{πρότυπου}}$: εμβαδόν της επιφάνειας της κορυφής που εμφανίζεται στο χρωματογράφημα για το πρότυπο διάλυμα.

$W_{\text{πρότυπου}}$: ακριβής ποσότητα πρότυπου δινάτριου άλατος EDTA που χρησιμοποιήθηκε στην παρασκευή πρότυπου διαλύματος σε mg.

%P: η εκατοστιαία καθαρότητα του πρότυπου δινάτριου άλατος EDTA.

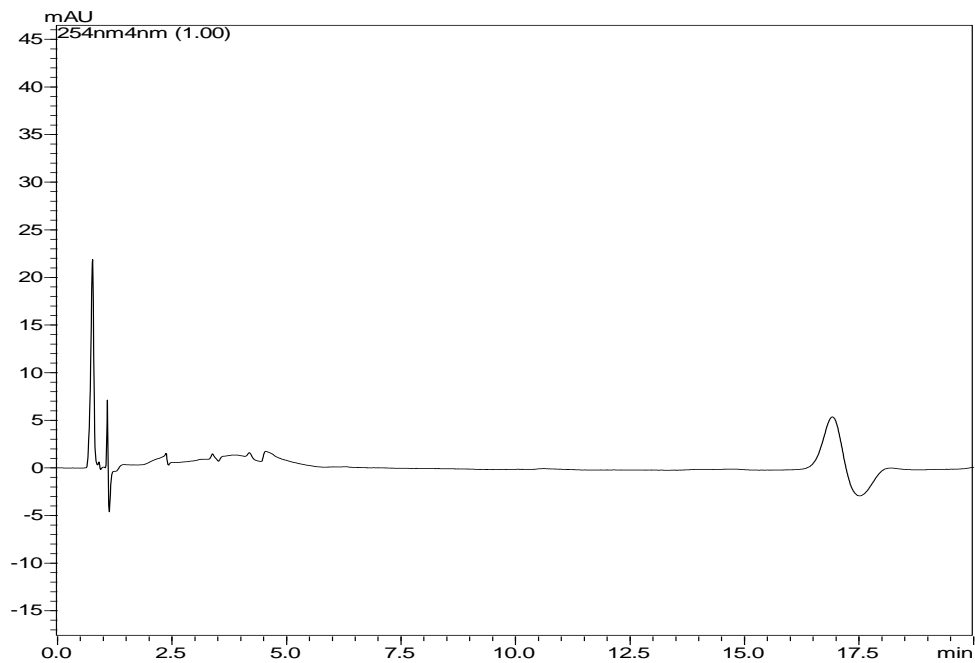
6.4 Πρωτόκολλο επικύρωσης- Αποτελέσματα

6.4.1 Ειδικότητα

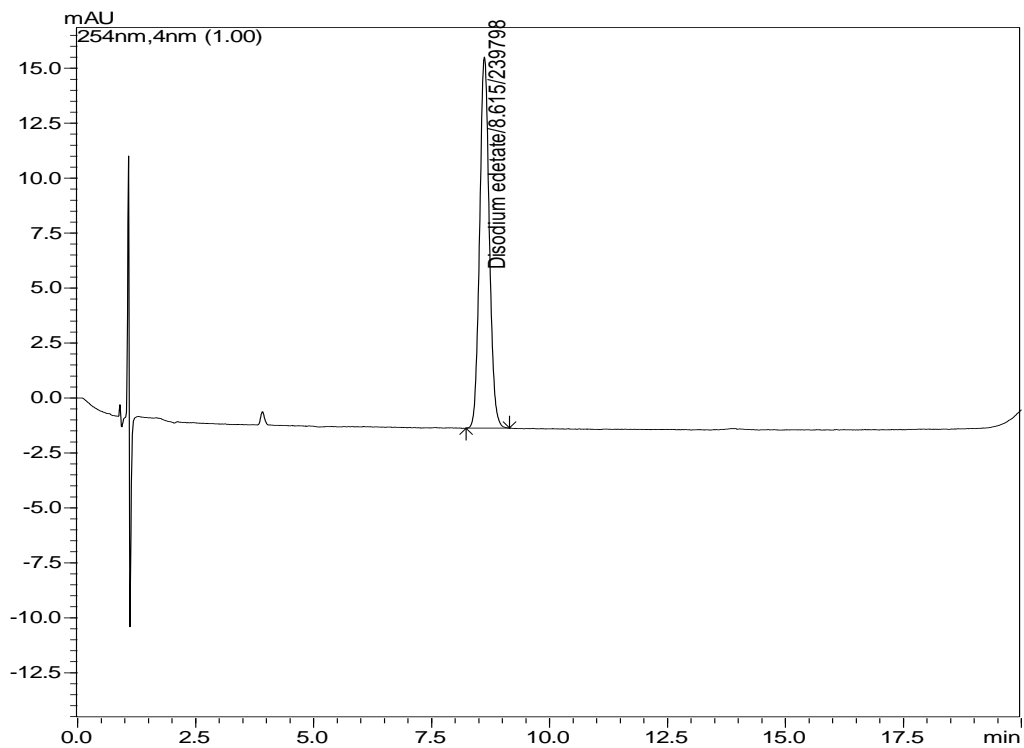
Για την εκτίμηση της ειδικότητας χρησιμοποιήθηκε placebo (περιλαμβάνει όλα τα συστατικά του σκευάσματος εκτός από το EDTA) και εμβολιασμένο διάλυμα B (spiked) όπως περιγράφεται στο εδάφιο της ακρίβειας (§6.4.5). Για να αποδειχθεί η μέθοδος ειδική πρέπει :

- Καμία κορυφή του placebo να μην εμφανίζεται στο χρόνο ανάσχεσης του EDTA.
- Να ικανοποιείται ο έλεγχος καταλληλότητας του συστήματος όπως αναφέρθηκε παραπάνω (§6.3.2).
- Η καθαρότητα της χρωματογραφικής κορυφής που αντιστοιχεί στο EDTA στο τελικό προϊόν να είναι μεγαλύτερη ή ίση από το 0,98.

[1] Μετά από εξέταση του χρωματογραφήματος του διαλύματος placebo αποδείχθηκε ότι καμία κορυφή δεν εμφανίζεται στον χρόνο ανάσχεσης του EDTA (χρόνος ανάσχεσης EDTA περίπου 8,5 λεπτά).



Σχήμα 6: Χρωματογράφημα placebo από μελέτη ειδικότητας στον προσδιορισμό EDTA



Σχήμα 7: Χρωματογράφημα προτύπου διαλύματος EDTA

[2] Η καθαρότητα της χρωματογραφικής κορυφής του EDTA βρέθηκε >0,99.

6.4.2 Γραμμικότητα

Παρασκευάστηκαν πέντε πρότυπα διαλύματα εργασίας από ένα πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης, καλύπτοντας διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων. Το πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης συγκέντρωσης 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ παρασκευάστηκε με μεταφορά 25 mg δινάτριου άλατος EDTA σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL. Διαλύθηκε με νερό και αραιώθηκε μέχρι την χαραγή.

Πρότυπο διάλυμα A (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$): αντιστοιχεί στο 50% της συγκέντρωσης εργασίας και παρασκευάστηκε με προσθήκη 0,50 mL του πρότυπου διαλύματος παρακαταθήκης σε ογκομετρική φιάλη των 5 mL και αραιώση μέχρι την χαραγή με νερό.

Πρότυπο διάλυμα B (75 $\mu\text{g}/\text{mL}$): αντιστοιχεί στο 75% της συγκέντρωσης εργασίας και παρασκευάστηκε όπως το διάλυμα A με χρήση 0,75 mL πρότυπου διαλύματος.

Πρότυπο διάλυμα C (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$): αντιστοιχεί στο 100% της συγκέντρωσης εργασίας και παρασκευάστηκε όπως το διάλυμα A με χρήση 1,00 mL πρότυπου διαλύματος.

Πρότυπο διάλυμα D (125 $\mu\text{g}/\text{mL}$): αντιστοιχεί στο 125% της συγκέντρωσης εργασίας και παρασκευάστηκε όπως το διάλυμα A με χρήση 1,25 mL πρότυπου διαλύματος.

Πρότυπο διάλυμα E (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$): αντιστοιχεί στο 150% της συγκέντρωσης εργασίας και παρασκευάστηκε όπως το διάλυμα A με χρήση 1,50 mL πρότυπου διαλύματος.

Το καθένα από τα πέντε πρότυπα, μετρήθηκε τρεις φορές και ο μέσος όρος των εμβαδών, χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης. Εφαρμόστηκε η μέθοδος των ελαχίστων τετραγώνων και υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης (r), η τομή της ευθείας παλινδρόμησης με τον άξονα των y , η κλίση της και η τυπική απόκλιση των υπολοίπων.

Για να είναι αποδεκτή η γραμμικότητα, θα πρέπει ο συντελεστής συσχέτισης r να μην είναι μικρότερος από 0,99.

Στον επόμενο πίνακα δίνονται τα αποτελέσματα γραμμικότητας:

Πίνακας 10: Αποτελέσματα γραμμικότητας για τον προσδιορισμό του EDTA

Πρότυπο διάλυμα / (% συγκέντρωσης εργασίας)	Συγκέντρωση ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Εμβαδόν κορυ- φής	Μέσος όρος ($\pm\text{SD}$)/ %RSD
A (50%)	50	117856 117668 117921	117,82 ($\pm 0,13$) x 10³ 0,11
B (75%)	75	178549 177851 178081	178,16 ($\pm 0,36$) x 10³ 0,20
C (100%)	100	239798 239287 239185	239,42 ($\pm 0,33$) x 10³ 0,14
D (125%)	125	295291 295183 295481	295,32 ($\pm 0,15$) x 10³ 0,05
E (150%)	150	356840 356597 356012	356,48 ($\pm 0,43$) x 10³ 0,12

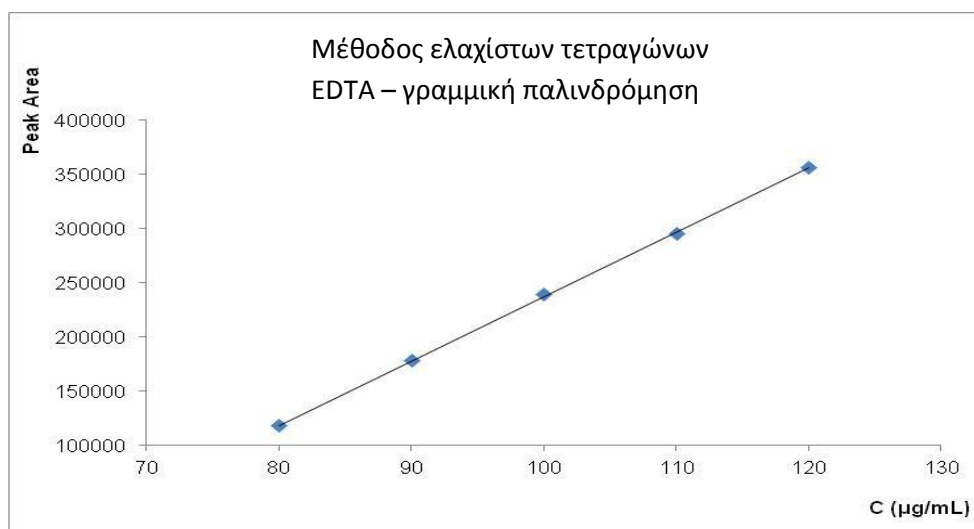
Μετά από εφαρμογή της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων προέκυψαν τα εξής:

Τομή: $-3,57 (\pm 0,48) \times 10^5$ (μονάδες εμβαδού)

Κλίση: $5,94 (\pm 0,48) \times 10^3$ (μονάδες εμβαδού $\cdot \text{mL} \cdot \mu\text{g}^{-1}$)

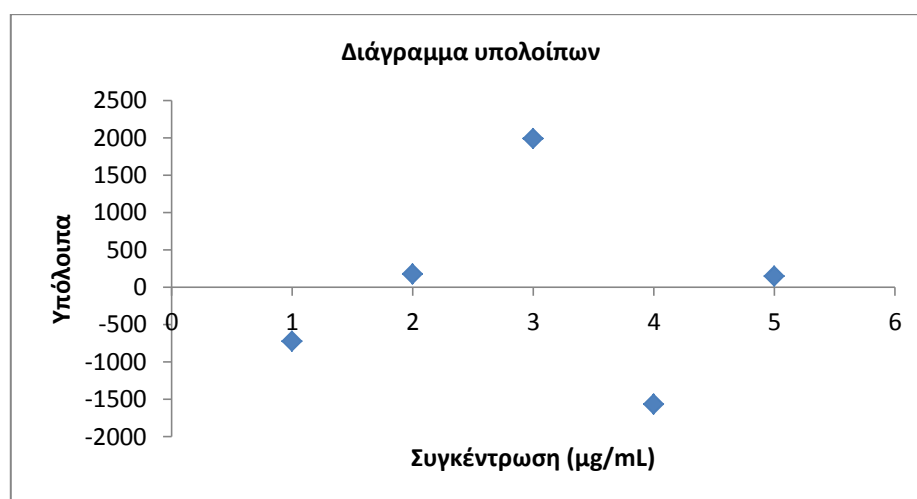
Συντελεστής συσχέτισης (r): 0,9999

Ακολουθεί η καμπύλη βαθμονόμησης για το EDTA.



Σχήμα 8: Γραφική παράσταση της καμπύλης βαθμονόμησης για τον προσδιορισμό EDTA.

Παρακάτω παρουσιάζεται το διάγραμμα υπολοίπων για το EDTA.



Σχήμα 9: Διαγραμματική απεικόνιση υπολοίπων για τον προσδιορισμό EDTA.

Από τα παραπάνω αποδεικνύεται πως το εύρος κυμαίνεται από 50 έως 150 µg/mL, η οποία αντιστοιχεί στο 50-150% της συγκέντρωσης εργασίας και η %RSD $\leq 0,20$.

6.4.3 Εύρος

Από τη μελέτη της γραμμικότητας και της ακρίβειας, προέκυψε το εύρος των συγκεντρώσεων γραμμικής απόκρισης της μεθόδου, 50 έως 150 µg/mL.

6.4.4 Πιστότητα

A) Πιστότητα συστήματος

Η πιστότητα του συστήματος αξιολογήθηκε μετρώντας το εμβαδόν τριών επαναλαμβανόμενων μετρήσεων του πρότυπου διαλύματος. Η πιστότητα εκφράζεται με την σχετική τυπική απόκλιση των εμβαδών κορυφών του EDTA, η οποία πρέπει να είναι μικρότερη ή ίση του 1,5%.

B) Επαναληψιμότητα

Παρασκευάστηκαν έξι ανεξάρτητα διαλύματα εργασίας και ένα πρότυπο διάλυμα σύμφωνα με την αναλυτική διαδικασία και αναλύθηκαν κάθε ένα από τα ανεξάρτητα διαλύματα εργασίας. Υπολογίστηκε η εκατοστιαία περιεκτικότητα του κάθε δείγματος και η αντίστοιχη σχετική τυπική απόκλιση η οποία πρέπει να είναι μικρότερη ή ίση του 2,0.

Γ) Ενδιάμεση πιστότητα

Πραγματοποιήθηκαν τρεις επιπλέον μελέτες επαναληψιμότητας χρησιμοποιώντας τρία ανεξάρτητα διαλύματα εργασίας: α) σε διαφορετική μέρα, β) από διαφορετικό αναλυτή, γ) σε διαφορετικό όργανο. Υπολογίστηκε η εκατοστιαία περιεκτικότητα και η αντίστοιχη σχετική τυπική απόκλιση.

Η ενδιάμεση πιστότητα υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας “one way anova” και η τυπική απόκλιση S_R που είναι μέτρο της ενδιάμεσης πιστότητας περιγράφεται στο εδάφιο §5.4.4.

Πίνακας 11: Αποτελέσματα πιστότητας για τον προσδιορισμό του EDTA

	<i>Εμβαδόν κορυφής EDTA σε πρότυπο διάλυμα (C_{πρωτ} = 100 μg·mL⁻¹)</i>	<i>Εμβαδόν κο- ρυφής EDTA στο διάλυμα ελέγχου</i>	<i>%Ανάκτηση</i>	<i>Μέσος όρος (±SD)/ % RSD</i>	
<i>Αναλυτής 1 Ημέρα 1 Όργανο 1</i>	256827	232523	96,87	96,97 (±0,68) 0,70	
	256848	234878	97,85		
	Μέσος όρος 256838	234331	97,62		
	C_{πρωτ} μg·mL⁻¹ 107,0	231854	96,59		
		230434	96,00		
		232571	96,89		
<i>Αναλυτής 2 Όργανο 2</i>	251668	235524	98,36	98,18 (±0,19) 0,20	
	251204		98,20		
	Μέσος όρος 251436		234606		97,97
	C_{πρωτ} μg·mL⁻¹ 105,0				
<i>Ημέρα 2</i>	256812	237080	98,84	98,82 (±0,38) 0,38	
	256518	237921	99,19		
	Μέσος όρος 256665	236115	98,43		
	C_{πρωτ} μg·mL⁻¹ 107,0				

Επαναληψιμότητα %RSD = 0,70.

Ολική Επαναληψιμότητα %RSD_f = 0,56.

Ενδιάμεση πιστότητα %RSD_R = 1,10.

Τα κριτήρια αποδοχής ικανοποιούνται.

6.4.5 Ακρίβεια

Η αξιολόγηση της ακρίβειας έγινε με την προετοιμασία τριών ανεξάρτητων δειγμάτων που περιέχουν τη δραστική ουσία και τα έκδοχα σε τρία διαφορετικά επίπεδα, καλύπτοντας τη γραμμική περιοχή.

Παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης δινατρίου άλατος EDTA (2000 μg/mL). Μεταφέρθηκε μία επαρκώς ζυγισμένη ποσότητα προτύπου ερ-

γασίας δινατρίου άλατος EDTA 20 mg σε μία ογκομετρική φιάλη των 10 mL. Διαλύθηκε με νερό και αραιώθηκε μέχρι την χαραγή.

Εμβολιασμένο διάλυμα Α (Επίπεδο ενίσχυσης 50 µg/mL που αντιστοιχεί στο 50% της συγκέντρωσης εργασίας) μεταφέρθηκαν 0,125 mL πρότυπου διαλύματος παρακαταθήκης του δινατρίου άλατος EDTA σε μία ογκομετρική φιάλη των 5,0 mL και αραιώθηκαν με το διάλυμα λευκού δείγματος. Ακολουθεί η διαδικασία παραγωγοποίησης (§6.3.1.4).

Εμβολιασμένο διάλυμα Β (Επίπεδο ενίσχυσης 100 µg/mL που αντιστοιχεί στο 100% της συγκέντρωσης εργασίας) το διάλυμα αυτό παρασκευάστηκε όπως το διάλυμα Α με την μόνη διαφορά ότι προστέθηκαν 0,25 mL πρότυπου διαλύματος παρακαταθήκης του δινατρίου άλατος EDTA.

Εμβολιασμένο διάλυμα Γ (Επίπεδο ενίσχυσης 150 µg/mL που αντιστοιχεί στο 150% της συγκέντρωσης εργασίας) το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται όπως το διάλυμα Α με την μόνη διαφορά ότι προστέθηκαν 0,375 mL πρότυπου διαλύματος παρακαταθήκης του δινατρίου άλατος EDTA.

Επίσης παρασκευάστηκε ένα πρότυπο διάλυμα σύμφωνα με τη μέθοδο του πρωτοκόλλου. Υπολογίστηκε η %ανάκτηση του κάθε δείγματος και η εκατοστιαία τυπική απόκλιση ανάμεσα στις ανακτήσεις.

$$\%Ανάκτηση = \frac{\%Περιεκτικότητα}{Επίπεδο ενίσχυσης} [31]$$

Η εκατοστιαία ανάκτηση πρέπει να βρίσκεται στα αποδεκτά όρια 98%-102% και η %RSD πρέπει να είναι μικρότερη ή ίση του 2,0.

Στη συνέχεια παρατίθενται τα αποτελέσματα ελέγχου της ακρίβειας.

Πίνακας 12: Αποτελέσματα ακρίβειας για τον προσδιορισμό του EDTA

Εμβολιασμένο διάλυμα	Εμβαδόν κορυφής του EDTA σε πρότυπο διάλυμα ($C_{\text{πρωτ}} = 107,0 \mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Εμβαδόν κορυφής του EDTA σε εμβολιασμένο διάλυμα	%Ενίσχυση	%Ανάκτηση	Μέσος όρος ($\pm\text{SD}$)/ RSD%
A	256685	117782	50	98,27	98,26 ($\pm 0,06$) 0.06
	256524				
	256281				
	Μέσος όρος 256497	117834	50	98,31	
B	256685	234986	100	98,03	98,17 ($\pm 0,14$) 0.14
	256524				
	256281				
	Μέσος όρος 256497	235657	100	98,31	
C	256685	352983	150	98,17	98,19 ($\pm 0,08$) 0.08
	256524				
	256281				
	Μέσος όρος 256497	352808	150	98,12	

%Ανάκτηση=98,03-98,31

%RSD=0,14

Τα κριτήρια αποδοχής ικανοποιήθηκαν.

6.4.6 Ανθεκτικότητα

Η ανθεκτικότητα μελετάται κατά την ανάπτυξη της μεθόδου. Ο σκοπός της μελέτης είναι να δείξει την αξιοπιστία της μεθόδου και να επισημάνει τις παραμέτρους που, κυρίως, επηρεάζουν την ανάλυση.

Παρασκευάστηκε ένα πρότυπο διάλυμα δινάτριου άλατος EDTA και εκτιμήθηκε η επίδραση των ακόλουθων παραμέτρων στην προσδιορισμένη %ανάκτηση, με βάση τον παραγοντικό σχεδιασμό των Plackett και Burman.

1. Η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης.
2. Το ποσοστό του ακετονιτριλίου στην κινητή φάση.
3. Το *pH* του διαλύματος A της κινητής φάσης.

Κριτήρια αποδοχής: η σχετική τυπική απόκλιση δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 2,0.

Πίνακας 13: Παράγοντες ανθεκτικότητας για τον προσδιορισμό του EDTA

Παράγοντας A: ταχύτητα ροής κινητής φάσης (mL/min)	+επίπεδο: 2,0	- επίπεδο: 1,9
Παράγοντας B: ποσοστό ακετονιτριλίου στην κινητή φάση (% v/v)	+ επίπεδο: 10	- επίπεδο: 12
Παράγοντας C: pH διαλύματος A στην κινητή φάση	+ επίπεδο: 6,5	- επίπεδο: 6,7

Πίνακας 14: Πειράματα ανθεκτικότητας για τον προσδιορισμό του EDTA

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

Πίνακας 15: Αποτελέσματα ανθεκτικότητας για τον προσδιορισμό του EDTA

Πείραμα	Εμβαδόν κορυφής του EDTA στο πρότυπο διάλυμα ($C_{\text{πρωτ}} = 105,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Y1	251048
	251595
	251200
	%RSD 0,11
Y2	264540
	264973
	264654
	%RSD 0,08
Y3	251624
	251419
	251535
	%RSD 0,04
Y4	251110
	250840
	251542
	%RSD 0,14

Τα κριτήρια αποδοχής ικανοποιήθηκαν.

Επιπλέον παρασκευάζεται διάλυμα ελέγχου το οποίο αναλύεται την ίδια μέρα και μετά από 24 ώρες.

Κριτήρια αποδοχής: η εκατοστιαία περιεκτικότητα πρέπει να είναι 98-102% και η αντίστοιχη εκατοστιαία τυπική απόκλιση $\leq 2,0$.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν φαίνονται παρακάτω:

Πίνακας 16: Αποτελέσματα σταθερότητας δειγμάτων ελέγχου EDTA

	<i>Εμβαδόν κορυφής EDTA σε πρότυπο διάλυμα ($C_{std} = 107 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)</i>	<i>Εμβαδόν κορυ- φής EDTA σε δείγματα ελέγχου</i>	<i>%Ανάκτηση</i>
Ημέρας	256812	237080	98,84
	256518	237921	99,19
	Μέσος όρος 256665	236115	98,43
Μετά από 24 ώρες	254992	236623	99,05
	256230	238858	99,99
	Μέσος όρος 255611	238317	99,76

Πίνακας 17: Αποτελέσματα %λόγων ανάκτησης διαλυμάτων EDTA.

	<i>% Λόγος ανάκτησης σε σύγκριση με διάλυ- μα ημέρας</i>
1.	100,22
2.	100,81
3.	101,35
Μέσος όρος (\pm SD)/ % RSD	100,79 (\pm0,57) 0,56%

Τα διαλύματα εργασίας ικανοποιούν τα κριτήρια και εμφανίζονται σταθερά για τουλάχιστον 24 ώρες.

6.5 Συμπέρασμα

Η μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού του δινάτριου άλατος EDTA κρίθηκε πως παρέχει αξιόπιστα αποτελέσματα. Αποδείχθηκε πως είναι ειδική, χαρακτηρίζεται από γραμμικότητα, είναι ακριβής, επαναλήψιμη, ανθεκτική και γενικά, ικανοποιεί όλα τα επιθυμητά κριτήρια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

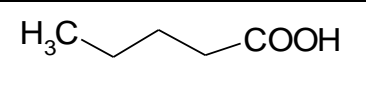
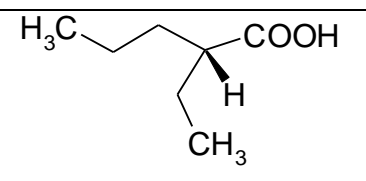
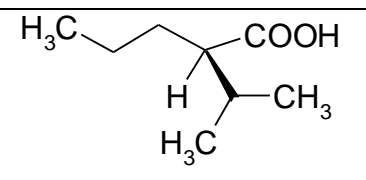
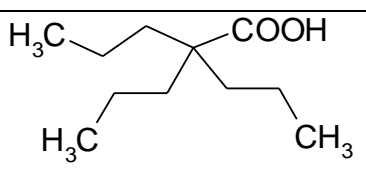
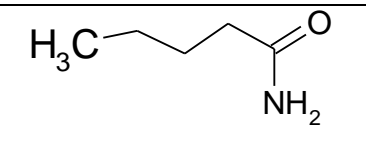
Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού προσμίξεων του βαλπροϊκού νατρίου σε ενέσιμο διάλυμα

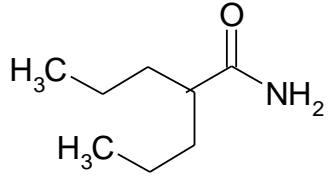
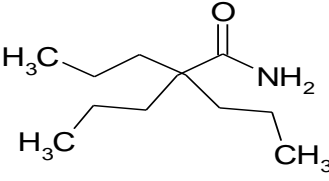
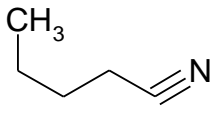
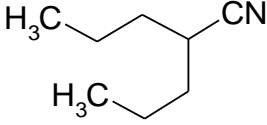
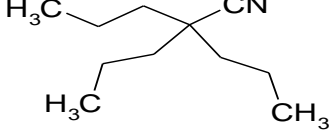
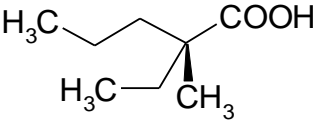
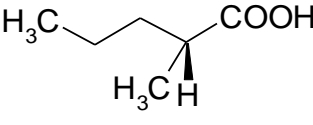
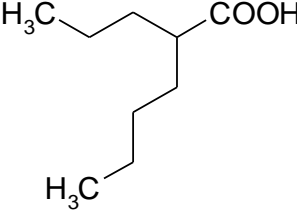
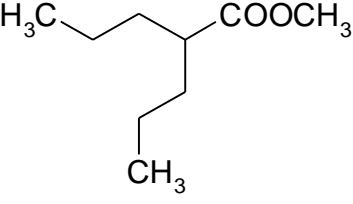
7.0 Εισαγωγή

Περιγράφεται η ανάπτυξη χρωματογραφικής μεθόδου έλεγχου των προσμίξεων του βαλπροϊκού νατρίου, καθώς και επικύρωση της μεθόδου που αναπτύχθηκε. Για την επικύρωση πραγματοποιήθηκαν μελέτες ακρίβειας, γραμμικότητας, ειδικότητας, ανθεκτικότητας και προσδιορισμού του ορίου ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης.

Σύμφωνα με την μονογραφία του βαλπροϊκού νατρίου της ευρωπαϊκής φαρμακοποιίας μπορούν να μελετηθούν και να προσδιοριστούν οι παρακάτω προσμίξεις. (Πίνακας 18) [25,27] Κρίθηκε απαραίτητο να ελεγχθούν οι A, B, C, F, H, I, L καθώς επίσης και τα 2-βουτυλοβαλερικό οξύ και μεθυλεστέρας βαλπροϊκού οξέος.

Πίνακας 18: Προσμίξεις βαλπροϊκού νατρίου σύμφωνα με την ευρωπαϊκή φαρμακοποιία

Πεντανοϊκό οξύ=Βαλερικό οξύ (A)	
(2RS)-2-αιθυλο-πεντανοϊκό οξύ=2-αιθυλοβαλερικό οξύ (B)	
(2RS)-2-(1-μεθυλο-αιθυλο)πεντανοϊκό οξύ (C)	
2,2-διπροπυλοπεντανοϊκό οξύ (D)	
Πενταναμίδιο (E) (βαλεραμίδιο)	

2-προπυλοπενταναμίδιο (F)	
2,2-διπροπυλοπεντανοαμίδιο (G)	
βαλερονιτρίλιο (H) (πεντανονιτρίλιο)	
2-προπυλοπεντανονιτρίλιο (I)	
2,2-διπροπυλοπεντανονιτρίλιο (J)	
(2RS)-2-αιθυλο-2-μεθυλοπεντανοϊκό οξύ (K)	
(2RS)-2-μεθυλοπεντανοϊκό οξύ =μεθυλοβαλερικό οξύ (L)	
2-βουτυλοβαλερικό οξύ	
μεθυλεστέρας βαλπροϊκού οξέος	

7.1 Ανάπτυξη μεθόδου

Αρχικά, εγχύθηκαν στο σύστημα HPLC ποσότητες (διαλύματα) απο τις προς έλεγχο προσμίξεις για να προσδιοριστούν οι χρόνοι ανάσχεσής τους, χρησιμοποιώντας ως στήλη την: BDS Hypersil C18, 250×4,6 mm, 5μm. Η διαδικασία αυτή είναι σημαντική, τόσο για την ανάπτυξη όσο και για την επικύρωση της μεθόδου. Το 2-προπυλοπεντανονιτρίλιο δεν ταυτοποιήθηκε ενώ το μεθυλοβαλερικό οξύ και το αμίδιο βαλπροϊκού οξέος εκλούστηκαν περίπου στον ίδιο χρόνο. Ο έλεγχος προσμίξεων του βαλπροϊκού νατρίου στηρίχτηκε στην μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού του βαλπροϊκού νατρίου. Στο διάλυμα καταλληλότητας συστήματος δεν επετεύχθει ικανοποιητική διαχωριστότητα ανάμεσα στο βαλπροϊκό και στην πρόσμιξη C. Βελτιστοποιήθηκε η συγκέντρωση εργασίας της πρόσμιξης C όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 19: Δοκιμές βελτιστοποίησης της συγκέντρωσης εργασίας στον έλεγχο γραμμικότητας

Δοκιμή 1	Έλεγχος γραμμικότητας (πρότυπο διάλυμα 0,05%)	Συμπέρασμα	
Συγκέντρωση εργασίας βαλπροϊκού οξέος (3200 μg/ mL)	1,6 μg/ mL		
Συγκέντρωση εργασίας πρόσμιξης C (2500 μg/ mL)	1,6 μg/ mL	Διαχωρισμός ανεπαρκής	Δοκιμή 1 απέτυχε
Δοκιμή 2	Έλεγχος γραμμικότητας (πρότυπο διάλυμα 0,05%)	Συμπέρασμα	
Συγκέντρωση εργασίας βαλπροϊκού οξέος (32000 μg/ mL)	16 μg/ mL		
Συγκέντρωση εργασίας πρόσμιξης C (32000 μg/ mL)	16 μg/ mL	Ικανοποιητικός διαχωρισμός	Δοκιμή 2 επιτυχής

Κατά την διάρκεια παρασκευής του διαλύματος ελέγχου με την δεδομένη συγκέντρωση εργασίας πραγματοποιήθηκαν αρκετές δοκιμές στην επιλογή του όγκου του ορθοφωσφορικού οξέος. Τα αποτελέσματα στην διαλυτότητα του

προϊόντος και στον διαχωρισμό δεν ήταν ικανοποιητικά σύμφωνα με τον πίνακα παρακάτω:

Πίνακας 20: Δοκιμές παρασκευής βέλτιστων διαλυμάτων εργασίας

Δοκιμή 3	Συμπέρασμα
Διάλυμα ελέγχου (32000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 1,6g τελικού προϊόντος σε 10mL με 100 μL οξέος	"φτωχή" χρωματογραφία
Δοκιμή 4	Συμπέρασμα
Ποσότητα ορθο-φωσφορικού οξέος 10%	
1,6g τελικού προϊόντος σε 10mL με 1mL οξέος	Διαλυτότητα στην κινητή φάση ανεπαρκής
1,6g τελικού προϊόντος σε 10mL με 400 μL οξέος	Διαλυτότητα στην κινητή φάση ανεπαρκής
1,6g τελικού προϊόντος σε 10mL με 250 μL οξέος	Διαλυτότητα ικανοποιητική Ανεπαρκής ποσότητα οξέος για ικανοποιητικό διαχωρισμό
1,6g τελικού προϊόντος σε 10mL με 200 μL οξέος	Διαλυτότητα ικανοποιητική Ανεπαρκής ποσότητα οξέος για ικανοποιητικό διαχωρισμό

Εκ νέου βελτιστοποίηση την συγκέντρωσης εργασίας και του όγκου έγχυσης έδωσαν αποτελέσματα ικανοποιητικού διαχωρισμού.

Πίνακας 21: Βελτιστοποίηση όγκου έγχυσης

Δοκιμή 5	Συγκέντρωση εργασίας ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Όγκος έγχυσης (μL)	Συμπέρασμα
1	3200	100	"φτωχή" χρωματογραφία
2	8000	80	ικανοποιητική χρωματογραφία

Η περιγραφή των χρωματογραφικών συνθηκών και η παρασκευή των διαλυμάτων παρουσιάζονται στα εδάφια §7.2 και §7.3.1 αντίστοιχα.

7.2 Επιλογή χρωματογραφικών παραμέτρων για την προς επικύρωση μέθοδο

- Αναλυτική στήλη: BDS Hypersil C18, 250×4,6 mm, 5μm της εταιρείας Thermo Scientific.
- Κινητή φάση: Παρασκευάστηκε με ανάμειξη δισόξινου φωσφορικού καλίου συγκέντρωσης 0,05 M με μεθανόλη σε αναλογία 35:65 και ρυθμίστηκε το *pH* στην τιμή 5,0 με αραιωμένο ορθοφωσφορικό οξύ.
- Όγκος ένεσης: 80 μL
- Ταχύτητα ροής κινητής φάσης: 1 mL/min
- Θερμοκρασία στήλης: 25 °C
- Θερμοκρασία δειγματολήπτη: 25 °C
- Χρόνος ανάλυσης: 30 *min*
- Μήκος κύματος ανίχνευσης: 210 *nm*

7.3 Επικύρωση μεθόδου

7.3.1 Παρασκευή διαλυμάτων

7.3.1.1 Πρότυπο διάλυμα 0,10%

1,0 mL διαλύματος ελέγχου μεταφέρεται σε μία ογκομετρική φιάλη των 100,0 mL και στη συνέχεια 1,0 mL από το αραιωμένο διάλυμα μεταφέρεται σε μία ογκομετρική φιάλη των 10,0 mL και αραιώνεται μέχρι τη χαραγή με κινητή φάση.

7.3.1.2 Διάλυμα ελέγχου (test solution)

Ποσότητα ενέσιμου διαλύματος η οποία αντιστοιχεί σε 80,0 mg βαλπροϊκού νατρίου μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 10,0 mL. Προστέθηκαν 500 μL αραιωμένου ορθο-φωσφορικού οξέος, αναμιγνύεται επαρκώς και αραιώνεται μέχρι την χαραγή με κινητή φάση.

7.3.1.3 Αραιωμένο ορθο-φωσφορικό οξύ 10%

6,0 mL ορθο-φωσφορικού οξέος 85% αραιώνονται στα 50 mL με νερό.

7.3.1.4 Διάλυμα καταλληλότητας συστήματος (system suitability solution)

Ποσότητα 32 mg πρότυπου βαλπροϊκού νατρίου και ποσότητα 3,2 mg πρόσμιξης C αναμιγνύονται σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL. Διαλύονται με 3,0 mL κινητής φάσης, προστίθενται 200 μL αραιωμένου ορθο-φωσφορικού οξέος και αραιώνονται μέχρι την χαραγή με κινητή φάση.

Κριτήριο αποδοχής: Η διαχωριστικότητα μεταξύ της βαλπροϊκού και της πρόσμιξης C να είναι $\geq 1,0$.

7.3.2 Ποσοτικός προσδιορισμός

Ο υπολογισμός της % περιεκτικότητας δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$\% \text{περιεκτικότητα} = \frac{A_{\text{πρόσμιξη}}}{A_{\text{προτύπου}}} \times \frac{1}{RF} \times 0,1\% [32]$$

$A_{\text{πρόσμιξη}}$: το εμβαδόν της κορυφής κάθε πρόσμιξης που εμφανίζεται στο χρωματογράφημα για το διάλυμα ελέγχου.

$A_{\text{προτύπου}}$: το εμβαδόν της κορυφής που εμφανίζεται στο χρωματογράφημα για το πρότυπο διάλυμα.

RF : παράγοντας απόκρισης (βλέπε §7.4.3)

Πίνακας 22: Παράγοντες απόκρισης προσμίξεων βαλπροϊκού νατρίου

	Πρόσμιξη C	Οποιαδήποτε άλλη πρόσμιξη
RF	1,12	1,0

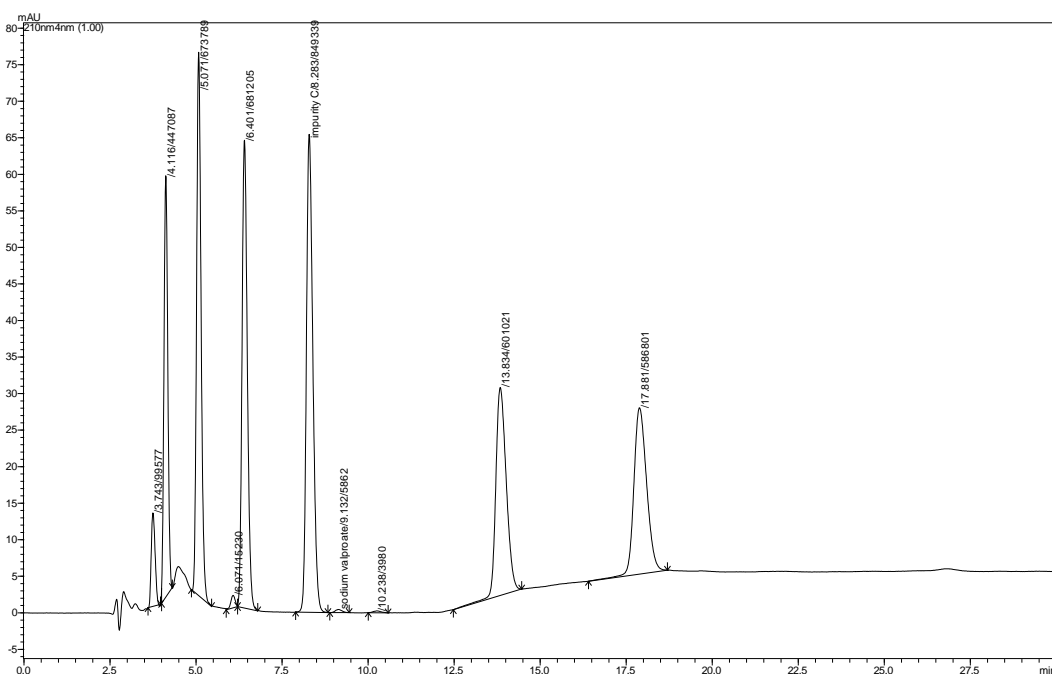
7.4 Πρωτόκολλο επικύρωσης- Αποτελέσματα

7.4.1 Ειδικότητα

Για την εκτίμηση της ειδικότητας χρησιμοποιήθηκε διάλυμα λευκού δείγματος (placebo) το οποίο με ανάμειξη των εκδόχων του προϊόντος σύμφωνα με την σύνθεση του προϊόντος. Παρασκευάστηκε ένα διάλυμα ελέγχου από το placebo 100% σύμφωνα με το εδάφιο §7.3.1.2.

Επιπλέον παρασκευάστηκαν τρία διαλύματα.

1. Διάλυμα γνωστών προσμίξεων (250 µg/µL), πρότυπο διάλυμα που περιέχει τα ακόλουθα παράγωγα προσμίξεων του βαλπροϊκού οξέος: 2-αιθυλοβαλερικό οξύ, 2-η-βουτυλοβαλερικό οξύ, 2-μεθυλο-βαλερικό οξύ, η-βαλερικό οξύ, βαλερονιτρίλιο, μεθυλεστέρας βαλπροϊκού οξέος και πρόσμιξη C. Μεταφέρονται 2,5 mg από κάθε πρόσμιξη σε ογκομετρική φιάλη των 10,0 mL, προστέθηκαν 200 µL ορθο-φωσφορικού οξέος και αραιώνονται μέχρι την χαραγή με κινητή φάση.

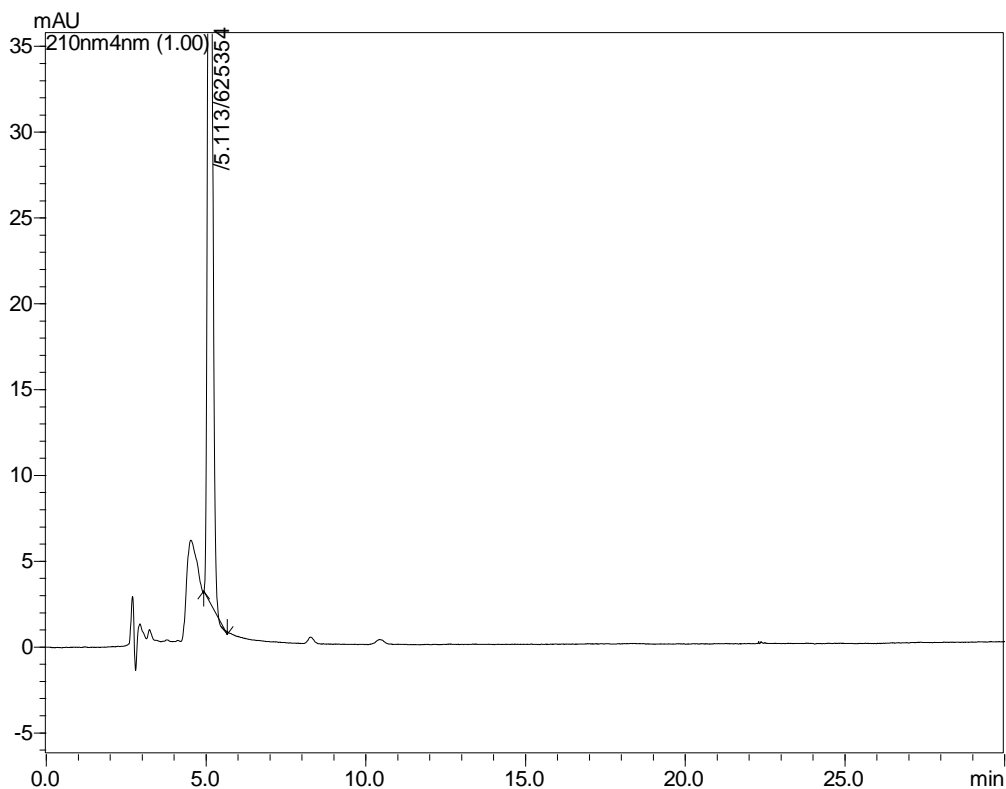


Σχήμα 10: Χρωματογράφημα διαλύματος γνωστών προσμίξεων

Πίνακας 23: Χρόνοι ανάσχεσης προσμίξεων βαλπροϊκού νατρίου

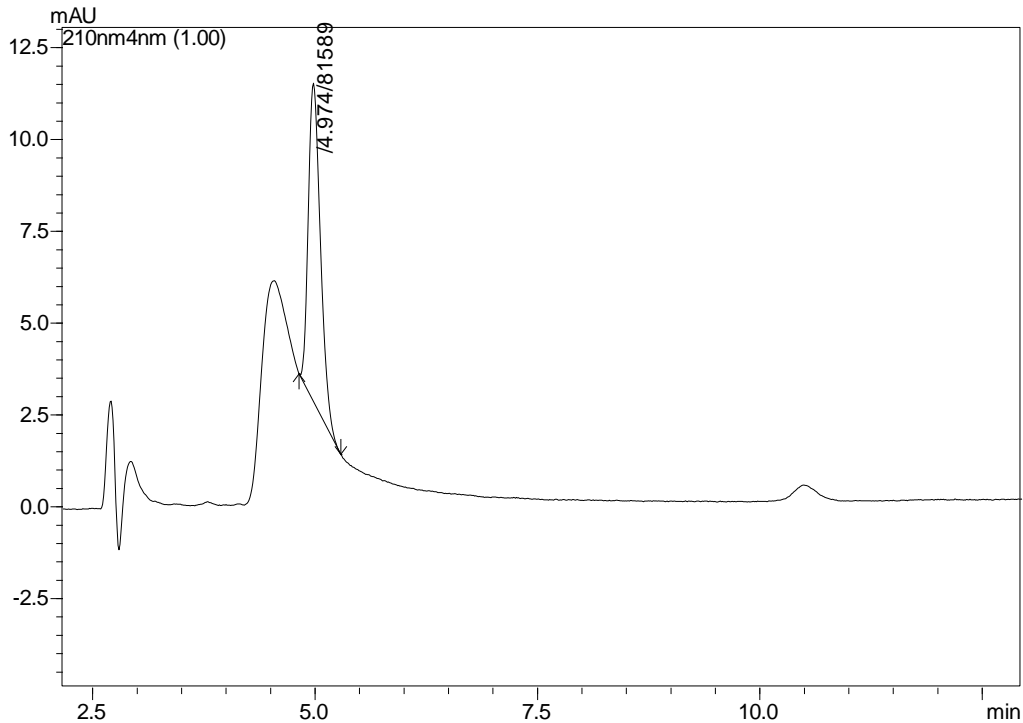
	Πρόσμιξη	Χρόνος ανάσχεσης (min)
1	βαλερονιτρίλιο	3,743
2	n-βαλερικό οξύ	4,116
3	2-μεθυλο-βαλερικό οξύ	5,071
4	2-αιθυλοβαλερικό οξύ	6,401
5	πρόσμιξη C	8,283
6	βαλπροϊκό οξύ	9,132
7	2-n-βουτυλοβαλερικό οξύ	13,834
8	μεθυλεστέρας βαλπροϊκού οξέος	17,881

2. Πρότυπο διάλυμα μεθυλο-βαλερικού οξέος ($250 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) για το οποίο χρησιμοποιήθηκαν $2,5 \text{ mg}$ προτύπου σε ογκομετρική φιάλη των $10,0 \text{ mL}$, προσθήκη $200 \mu\text{L}$ αραιωμένου φωσφορικού οξέος και αραιώση μέχρι την χαραγή με κινητή φάση.



Σχήμα 11: Χρωματογράφημα μεθυλο-βαλερικού οξέος

3. Πρότυπο διάλυμα αμιδίου βαλπροϊκού οξέος ($250 \mu\text{g}/\mu\text{L}$). Μεταφέρθηκαν $2,5 \text{ mg}$ προτύπου σε ογκομετρική φιάλη των $10,0 \text{ mL}$, προστέθηκαν $200 \mu\text{L}$ αραιωμένου φωσφορικού οξέος και αραιώθηκαν μέχρι την χαράγη με κινητή φάση.



Σχήμα 12: Χρωματογράφημα αμιδίου βαλπροϊκού οξέος

Κριτήρια αποδοχής:

- A) Στο διάλυμα placebo δεν πρέπει να ανιχνεύεται καμία κορυφή στους χρόνους έκλουσης της πρόσμιξης C (8,5 min) και του βαλπροϊκού (9,1 min),
- B) Στο χρωματογράφημα διαλύματος ελέγχου καταλληλότητας η διαχωριστικότητα να είναι μεγαλύτερη ή ίση με το 1,0.
- Γ) Στα χρωματογραφήματα των τριών παραπάνω διαλυμάτων να ταυτοποιούνται οι κορυφές των προσμίξεων του βαλπροϊκού οξέος.

Οι σχετικοί χρόνοι ανάσχεσης των προσμίξεων του βαλπροϊκού που καταγράφονται είναι:

Πίνακας 24: Σχετικοί χρόνοι ανάσχεσης προσμίξεων βαλπροϊκού νατρίου

Πρόσμιξη	RRt
Βαλερονιτρίλιο	0,41
Βαλερικό οξύ	0,45
Μεθυλο-βαλερικό οξύ	0,56
2-αιθυλο-βαλερικό οξύ	0,71
Πρόσμιξη C	0,92
2-βουτυλο-βαλερικό οξύ	1,53
Μεθυλοεστέρας βαλπροϊκού οξέος	1,97
Αμίδιο βαλπροϊκού οξέος	0,55

Η διαχωριστικότητα στο διάλυμα καταλληλότητας συστήματος βρέθηκε ίση με 1,3. Τα κριτήρια ικανοποιούνται.

7.4.2 Γραμμικότητα

Πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης βαλπροϊκού νατρίου ($800 \mu\text{g}/\text{mL}$). 8,0 mg βαλπροϊκού νατρίου προτύπου εργασίας μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 10,0 mL, προστέθηκαν 200 μL αραιωμένου ορθοφωσφορικού οξέος και αραιώνονται μέχρι την χαραγή με κινητή φάση.

Πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης πρόσμιξης C ($800 \mu\text{g}/\text{mL}$). 8,0 mg πρόσμιξης C προτύπου εργασίας μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 10,0 mL, προστέθηκαν 200 μL αραιωμένου ορθοφωσφορικού οξέος και αραιώθηκαν μέχρι την χαραγή με κινητή φάση.

Ενδιάμεσο πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης πρόσμιξης C και βαλπροϊκού νατρίου ($80 \mu\text{g}/\text{mL}$). 1,0 mL από το καθένα από τα δύο πρότυπα διαλύματα

παρακαταθήκης μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 10,0 mL και αραιώνονται μέχρι την χαραγή με κινητή φάση.

Πρότυπο διάλυμα A ($4 \mu\text{g}/\text{mL}$ το οποίο αντιστοιχεί στο 0,05% της συγκέντρωσης εργασίας). 250 μL του ενδιάμεσου πυκνού διαλύματος αραιώνονται στα 5,0 mL κινητής φάσης.

Πρότυπο διάλυμα B ($6,4 \mu\text{g}/\text{mL}$ το οποίο αντιστοιχεί στο 0,08% της συγκέντρωσης εργασίας). Όπως το διάλυμα A χρησιμοποιώντας 400 μL ενδιάμεσου πυκνού διαλύματος.

Πρότυπο διάλυμα C ($8 \mu\text{g}/\text{mL}$ το οποίο αντιστοιχεί στο 0,10% της συγκέντρωσης εργασίας) Όπως το διάλυμα A χρησιμοποιώντας 500 μL ενδιάμεσου πυκνού διαλύματος.

Πρότυπο διάλυμα D ($16 \mu\text{g}/\text{mL}$ το οποίο αντιστοιχεί στο 0,20% της συγκέντρωσης εργασίας) Όπως το διάλυμα A χρησιμοποιώντας 1,00 mL ενδιάμεσου πυκνού διαλύματος.

Πρότυπο διάλυμα E ($40 \mu\text{g}/\text{mL}$ το οποίο αντιστοιχεί στο 0,50% της συγκέντρωσης εργασίας) Όπως το διάλυμα A χρησιμοποιώντας 2,50 mL ενδιάμεσου πυκνού διαλύματος.

Το καθένα από τα πέντε πρότυπα, μετρήθηκε τρεις φορές και ο μέσος όρος των εμβαδών, χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης. Εφαρμόστηκε η μέθοδος των ελαχίστων τετραγώνων και υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης (r), η τομή της ευθείας παλινδρόμησης με τον άξονα των y , η κλίση της και η τυπική απόκλιση των υπολοίπων και για να αποδειχθεί γραμμικότητα ο συντελεστής συσχέτισης r δεν πρέπει να είναι μικρότερος από 0,99.

7.4.3 Εύρος

Το εύρος προκύπτει από τη μελέτη γραμμικότητας και ακρίβειας.

Παράγοντας απόκρισης

Ο παράγοντας απόκρισης για την πρόσμιξη C υπολογίζεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$RF = \frac{\bar{A}_{imp}}{\bar{A}_{ref}} = \frac{206,3}{184,4} = 1,12[32]$$

\bar{A}_{imp} : μέσο εμβαδόν της κορυφής της πρόσμιξης C στα χρωματογραφήματα του διαλύματος C από την μελέτη γραμμικότητας.

\bar{A}_{ref} : μέσο εμβαδόν της κορυφής του βαλπροϊκού στα χρωματογραφήματα του διαλύματος C από την μελέτη γραμμικότητας.

Τα αποτελέσματα της μελέτης γραμμικότητας/εύρους και επαναληψιμότητας για την πρόσμιξη C παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 25: Αποτελέσματα γραμμικότητας, εύρους και επαναληψιμότητας για την πρόσμιξη C

Πρότυπο Διάλυμα πρόσμιξης C/ % της συγκέντρωσης ερ- γασίας	Συγκέντρωση ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Εμβαδόν κορυφής πρόσμιξης C	Μέσος όρος ($\pm\text{SD}$)/ %RSD
A/ (0,05%)	4,00	10417 10451 10595	104,88 ($\pm 0,95$) x 10² 0,90
B/ (0,08%)	6,40	16277 16295 16146	162,39 ($\pm 0,81$) 10² 0,50
C/ (0,10%)	8,00	20702 20696 20498	206,3 ($\pm 1,2$) x 10² 0,56
D/ (0,20%)	16,0	43220 42742 43057	430,1 ($\pm 2,4$) x 10² 0,57
E/ (0,50%)	40,0	108923 107917 108287	1083,8 ($\pm 5,1$) x 10² 0,47

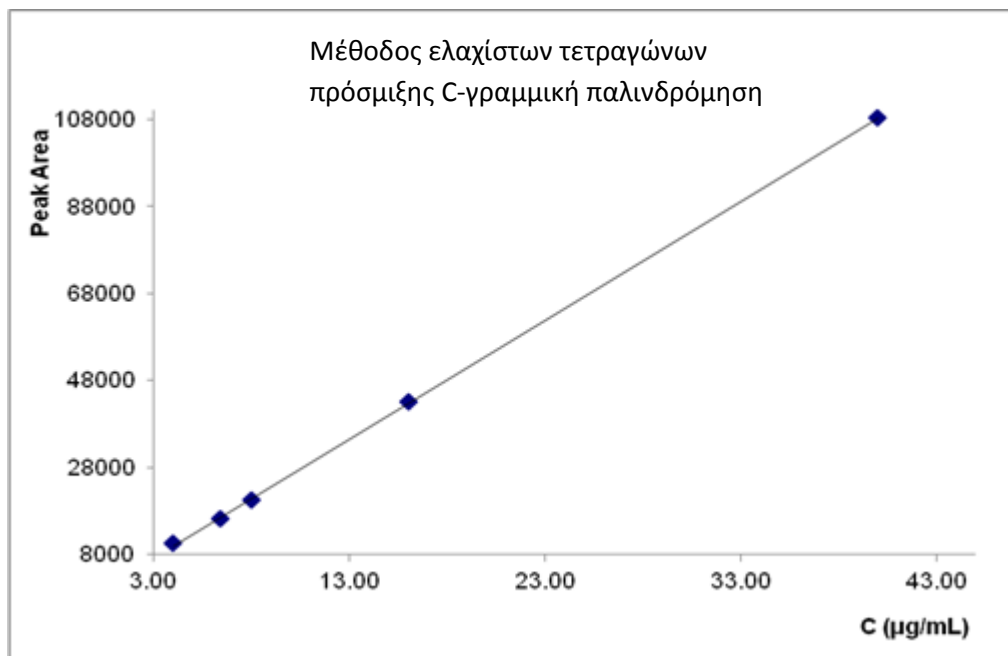
Μετά από επεξεργασία γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων προκύπτουν τα εξής:

Τομή: $-0,91 (\pm 0,27) \times 10^3$ (μονάδες εμβαδού)

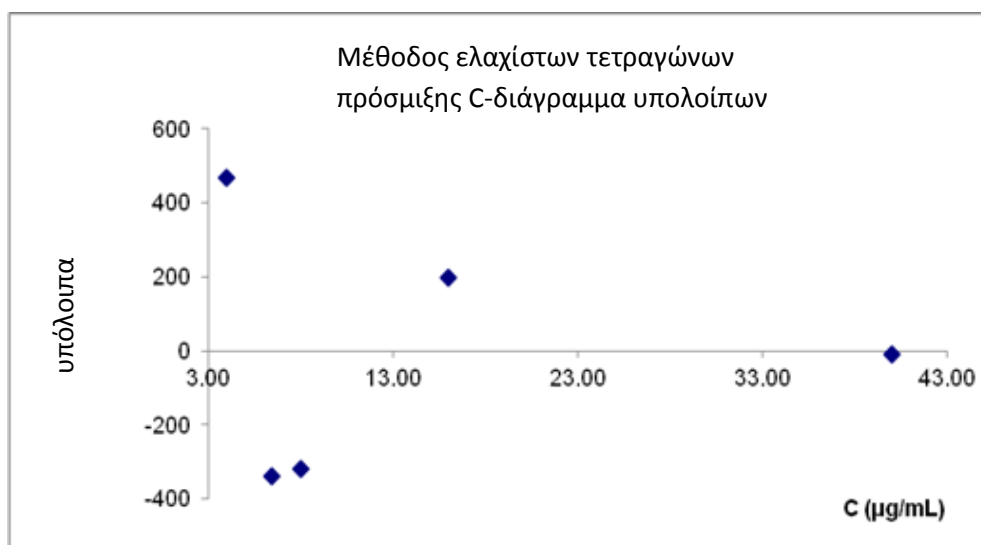
Κλίση: $27,32 (\pm 0,13) \times 10^2$ (μονάδες εμβαδού \cdot mL \cdot μg^{-1})

Συντελεστής συσχέτισης r: 0,99996

Η καμπύλη βαθμονόμησης για την πρόσμιξη C παρατίθεται παρακάτω:



Σχήμα 13: Διαγραμματική απεικόνιση της καμπύλης βαθμονόμησης για την πρόσμιξη C



Σχήμα 14: Διαγραμματική απεικόνιση υπολοίπων για την πρόσμιξη C

Το εύρος της μεθόδου εκτείνεται από τα 4,00 έως τα 40,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, οι οποίες συγκεντρώσεις αντιστοιχούν στην περιοχή 0,05-0,50% της συγκέντρωσης εργασίας, %RSD \leq 0,90.

Τα αποτελέσματα γραμμικότητας για το βαλπροϊκό νάτριο παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 26: Αποτελέσματα γραμμικότητας για το βαλπροϊκό στον προσδιορισμό προσμίξεων

Πρότυπο διάλυμα βαλπροϊκού νατρίου/ % συγκέντρωσης εργασίας	Συγκέντρωση ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Εμβαδόν κορυφής βαλπροϊκού	Μέσος όρος (\pm SD)/ %RSD
A/ (0,05%)	4,00	9656 9616 9658	96,43 (\pm0,24) $\times 10^2$ 0,25
B/ (0,08%)	6,40	14536 14613 14673	146,07 (\pm0,69) 10^2 0,47
C/ (0,10%)	8,00	18345 18587 18385	184,4 (\pm1,3) $\times 10^2$ 0,70
D/ (0,20%)	16,0	37731 38399 38233	381,2 (\pm3,5) $\times 10^2$ 0,91
E/ (0,50%)	40,0	96507 96225 96306	963,5 (\pm1,5) $\times 10^2$ 0,15

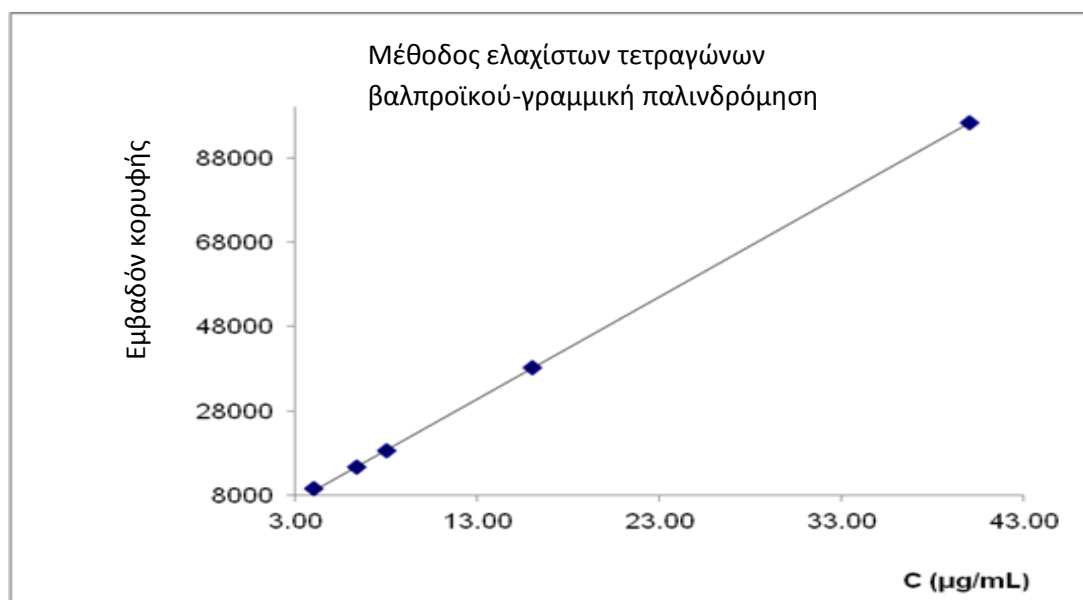
Με βοήθεια της γραμμικής παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων προκύπτουν τα εξής:

Τομή: $-0,61 (\pm 0,28) \times 10^3$ (μονάδες εμβαδού)

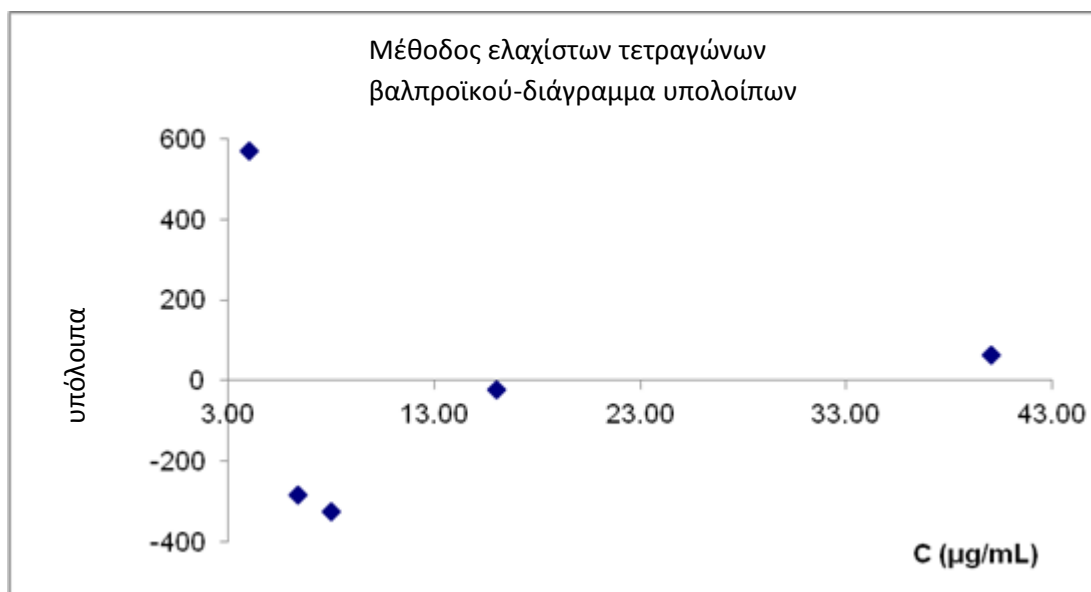
Κλίση: $24,22 (\pm 0,14) \times 10^2$ (μονάδες εμβαδού \cdot mL \cdot μg^{-1})

Συντελεστής συσχέτισης r: 0,99995

Η καμπύλη αναφοράς και το διάγραμμα υπολοίπων του βαλπροϊκού νατρίου παρουσιάζονται παρακάτω:



Σχήμα 15: Καμπύλη αναφοράς του βαλπροϊκού στον έλεγχο προσμίξεων



Σχήμα 16: Διάγραμμα παρουσίασης υπολοίπων για το βαλπροϊκό στον έλεγχο προσμίξεων

Το εύρος της μεθόδου εκτείνεται από τα 4,00 έως τα 40,0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ οι οποίες συγκεντρώσεις αντιστοιχούν από 0,05-0,50% της συγκέντρωσης εργασίας, $\%RSD \leq 0,91$.

Παράγοντας απόκρισης της πρόσμιξης C (σύμφωνα με την εξίσωση [32])

$$RF = \frac{\bar{A}_{impC}}{A_{sod, valpr.}} = \frac{20632}{18439} = 1,12$$

7.4.4 Πιστότητα

A) Πιστότητα συστήματος

Η πιστότητα του συστήματος αξιολογήθηκε μετρώντας εις τριπλούν κάθε πρότυπο και παίρνοντας τις τιμές του εμβαδού της πρόσμιξης. Εκφράζεται από το $\%RSD$ του εμβαδού των κορυφών της πρόσμιξης C και θα πρέπει να είναι $\leq 2,0$.

B) Επαναληψιμότητα

Παρασκευάστηκαν 6 ανεξάρτητα εμβολιασμένα (spiked) δείγματα B (η προετοιμασία του περιγράφεται στο εδάφιο της ακρίβειας). Ακόμα, παρασκευάστηκε ένα πρότυπο διάλυμα σύμφωνα με την αναλυτική διαδικασία και καθένα από τα παραπάνω αναλύθηκαν ανεξάρτητα. Από τα αποτελέσματα υπολογίστηκε η $\%$ ανάκτηση κάθε δείγματος και η εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση ($\%RSD$):

$$\%Ανάκτηση = \frac{\%περιεκτικότητα}{\%επίπεδο ενίσχυσης} \times 100[33]$$

Κριτήρια αποδοχής: Για να θεωρηθεί επαναλήψιμη η μέθοδος πρέπει να ισχύει η $\%$ ανάκτηση να είναι 95,0% έως 105,0% και το $\% RSD \leq 5,0$.

Γ) Ενδιάμεση πιστότητα: Υπολογίστηκε στο εδάφιο §5.4.4.

Κριτήρια αποδοχής: Πρέπει η ολική επαναληψιμότητα $\%RSD_r \leq 5,0$ και η $\%$ ανάκτηση να είναι 95,0% έως 105,0%. Επιπλέον, η ενδιάμεση πιστότητα $\%RSD_R \leq 5,0$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 27: Αποτελέσματα πιστότητας στον προσδιορισμό προσμίξεων

	Εμβαδόν κορυφής βαλπροϊκού σε διά- λυμα αναφοράς 0,1%		Εμβαδόν κορυ- φής πρόσμιξης C σε εμβολιασμέ- νο διάλυμα	%Ενίσχυση	%Ανάκτη- ση	Μέσος Όρος (±SD)/ RSD %
ΑΝΑΛΥΤΗΣ 1 ΗΜΕΡΑ 1 ΟΡΓΑΝΟ 1		19057	21334	0,1	99,80	99,32 (±0,71) 0,71
		19154	21369		99,96	
			21176		99,06	
	ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	19106	21169		99,02	
			21358		99,91	
			20983		98,15	
ΑΝΑΛΥΤΗΣ 2 ΟΡΓΑΝΟ 2		19535	21667	0,1	99,44	99,22 (±0,19) 0,19
		19412	21588		99,08	
	ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	19474	21604		99,15	
ΗΜΕΡΑ 2		19190	20918	0,1	98,14	98,73 (±0,69) 0,70
		18909	21207		99,49	
	ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	19050	21010		98,57	

Επαναληψιμότητα συστήματος: 0,90

Επαναληψιμότητα μεθόδου: %RSD = 0,71

Ολική επαναληψιμότητα: %RSD_r = 0,63

Ενδιάμεση πιστότητα: %RSD_R = 0,63

Τα κριτήρια αποδοχής ικανοποιήθηκαν.

7.4.5 Ακρίβεια

Προετοιμάστηκαν τρία ανεξάρτητα εμβολιασμένα διαλύματα τα οποία περιείχαν την φαρμακευτική ουσία, τα έκδοχα και την πρόσμιξη C σε τρία διαφορετικά επίπεδα ενίσχυσης καλύπτοντας την γραμμική περιοχή.

Πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης της πρόσμιξης C (800 μg · mL⁻¹): μεταφέρθηκαν 8,0 mg της πρόσμιξης C σε μια ογκομετρική φιάλη των 10 mL, προστέ-

θηκαν 200 μL αραιωμένου φωσφορικού οξέος και ακολούθησε αραιώση μέχρι την χαραγή με κινητή φάση.

Εμβολιασμένο διάλυμα Α (επίπεδο ενίσχυσης $4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ το οποίο αντιστοιχεί στο 0,05% της συγκέντρωσης εργασίας). Μεταφέρθηκε μία ποσότητα τελικού προϊόντος που αντιστοιχεί σε 80,0 mg βαλπροϊκού νατρίου σε μία ογκομετρική φιάλη των 10,0 mL. Προστέθηκαν 50 μL πυκνού πρότυπου διαλύματος πρόσμιξης C και 500 μL αραιωμένου φωσφορικού οξέος και ακολούθησε αραιώση μέχρι την χαραγή με κινητή φάση.

Εμβολιασμένο διάλυμα Β (επίπεδο ενίσχυσης $8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ το οποίο αντιστοιχεί στο 0,10% της συγκέντρωσης εργασίας). Ο τρόπος παρασκευής είναι ίδιος με το διάλυμα Α με τη διαφορά ότι προστέθηκαν 100 μL πυκνού πρότυπου διαλύματος της πρόσμιξης C.

Εμβολιασμένο διάλυμα Γ (επίπεδο ενίσχυσης $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ το οποίο αντιστοιχεί στο 0,50% της συγκέντρωσης εργασίας). Ο τρόπος παρασκευής είναι ίδιος με το διάλυμα Α με τη διαφορά ότι προστέθηκαν 500 μL πυκνού πρότυπου διαλύματος της πρόσμιξης C.

Επίσης παρασκευάστηκε διάλυμα αναφοράς σύμφωνα με το πρωτόκολλο της μεθόδου.

Υπολογίστηκε η %ανάκτηση του κάθε δείγματος και η εκατοστιαία τυπική απόκλιση ανάμεσα στις ανακτήσεις.

Κριτήρια αποδοχής: η εκατοστιαία ανάκτηση πρέπει να είναι 95 – 105% και η εκατοστιαία τυπική απόκλιση να είναι μικρότερη ή ίση με 5,0.

Πίνακας 28: Αποτελέσματα ακρίβειας προσδιορισμού της πρόσμιξης C σε εμβολιασμένα δείγματα στον προσδιορισμό προσμίξεων

Εμβολιασμένο διάλυμα	Εμβαδόν κορυφής βαλπροϊκού σε διάλυμα αναφοράς 0,1%	Εμβαδόν κορυφής πρόσμιξης C σε εμβολιασμένο διάλυμα	%Ενίσχυση	%Ανάκτηση	Μέσος όρος (±SD)/ RSD %
A	19392	10878	0,05	100,46	99,80 (±0,57) 0,57
	19255				
	19417				
	10772				
	Μέσος όρος	10769			
19355	99,45				
B	19392	21395	0,10	98,79	99,47(±0,65) 0,65
	19255				
	19417				
	21677				
	Μέσος όρος	21553			
19355	99,52				
C	19392	107376	0,50	99,30	98,92 (±0,71) 0,72
	19255				
	19417				
	106222				
	Μέσος όρος	107575			
19355	99,35				

%Ανάκτηση = 98,10 – 100,46

%RSD = 0,72

Τα κριτήρια αποδοχής ικανοποιούνται.

7.4.6 Όριο ανίχνευσης

Είναι ίσο με $3,3 \frac{\sigma}{S}$ όπου S είναι η κλίση της καμπύλης αναφοράς και σ η τυπική απόκλιση του πιο αραιωμένου πρότυπου διαλύματος της καμπύλης αναφοράς από τη μελέτη της γραμμικότητας.

Το όριο ανίχνευσης υπολογίστηκε:

$$LOD_{lm.p.c} = 3,3 \cdot \frac{\sigma}{S} = 3,3 \frac{0,91 \times 10^2}{27,32 \times 10^2} = 0,11 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

το οποίο αντιστοιχεί στο 0,001% της συγκέντρωσης εργασίας.

7.4.7 Όριο ποσοτικοποίησης

Ανάλογα με το όριο ανίχνευσης και το όριο ποσοτικοποίησης είναι ίσο με $10 \frac{\sigma}{S}$.

Το όριο ποσοτικοποίησης υπολογίστηκε από την σχέση:

$$LOQ_{imp.c} = 10 \times \frac{\sigma}{S} = 0,35 \mu g \cdot mL^{-1}$$

Το οποίο αντιστοιχεί στο 0,004% της συγκέντρωσης εργασίας.

7.4.8 Ανθεκτικότητα

1. Προετοιμάστηκε ένα διάλυμα καταλληλότητας συστήματος. Εκτιμήθηκε η επιρροή των παρακάτω παραμέτρων στην αξιοπιστία της αναλυτικής μεθόδου βάσει παραγοντικού σχεδιασμού Plackett και Burman.

1. Η ροή της κινητής φάσης
2. Το ποσοστό της μεθανόλης στην κινητή φάση
3. Το pH της κινητής φάσης

Κριτήρια αποδοχής: η διαχωριστικότητα ανάμεσα στις κορυφές του βαλπροϊκού και της πρόσμιξης C πρέπει να είναι $\geq 1,0$.

Πίνακας 29: Παράγοντες ανθεκτικότητας στον προσδιορισμό προσμίξεων

Παράγοντας A: ταχύτητα ροής κινητής φάσης (mL/min)	+επίπεδο: 1,0	-επίπεδο: 1,1
Παράγοντας B: ποσοστό μεθανόλης στην κινητή φάση (% v/v)	+επίπεδο: 65	-επίπεδο: 64
Παράγοντας C: pH κινητής φάσης	+επίπεδο: 5,0	-επίπεδο: 4,8

Πίνακας 30: Πειράματα ανθεκτικότητας στον προσδιορισμό προσμίξεων

Παράγοντες			Πείραμα	Διαχωριστότητα ανάμεσα σε κορυφές βαλπροϊκού και πρόσμιξης C
A	B	C		
+	+	+	Υ1	1,3
-	+	-	Υ2	1,3
+	-	-	Υ3	1,4
-	-	+	Υ4	1,3

2. Για τον έλεγχο σταθερότητας του διαλύματος παρασκευάστηκε εμβολιασμένο διάλυμα και αναλύθηκε την ίδια ημέρα και μετά από 24 ώρες (φυλαγμένο σε θερμοκρασία δωματίου). Υπολογίστηκε η %ανάκτηση από την εξίσωση :

$$\% \text{ανάκτηση} = \frac{\% \text{περιεκτικότητα μετα από 24 ώρες}}{\% \text{περιεκτικότητα σε διάλυμα ημέρας}} \times 100 \quad [34]$$

Κριτήρια αποδοχής: η % ανάκτηση πρέπει να είναι μεταξύ 98-102% και η αντίστοιχη %σχετική τυπική απόκλιση $\leq 2,0$.

Πίνακας 31: Αποτελέσματα ανθεκτικότητας διαλύματος στον προσδιορισμό προσμίξεων

	Εμβαδόν κορυφής βαλπροϊκού στο 0,10% διαλύματος αναφοράς	Εμβαδόν κορυφής της πρόσμιξης C σε εμβολιασμένο διάλυμα	%Ενίσχυση	%Ανάκτηση
Διάλυμα ημέρας	19190	20918	0,10	98,14
	18909	21207		99,49
	Μέσος όρος 19050	21010		98,57
Διάλυμα μετά από 24 ώρες	19123	21219	0,10	99,55
	19045	21137		99,16
	Μέσος όρος 19084	21113		99,05

Πίνακας 32: Αποτελέσματα %λόγων ανάκτησης που προκύπτουν από διάλυμα ημέρας και του ίδιου μετά από 24 ώρες.

	%Λόγος ανάκτησης έναντι διαλύματος ημέρας
1	101,44
2	99,67
3	100,49
Μέσος όρος (\pm SD)/ RSD %	100,53 (\pm0,89) 0,88

Τα εμβολιασμένα διαλύματα φαίνονται να είναι σταθερά για τουλάχιστον 24 ώρες στους 25 °C. Τα κριτήρια αποδοχής ικανοποιούνται.

7.5 Συμπέρασμα

Η μέθοδος προσδιορισμού προσμίξεων του βαλπροϊκού νατρίου κρίθηκε πως παρέχει αξιόπιστα αποτελέσματα. Αποδείχθηκε πως είναι ειδική, γραμμική, ακριβής, επαναλήψιμη, ανθεκτική και γενικά, ικανοποιεί όλα τα επιθυμητά κριτήρια.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας 33: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
Solvent reserver	Αποθήκη διαλυτών
Eluent	Έκλουσμα
Injector	Εγχυτήρας
Injection	Ένεση
Column	Στήλη
Column oven	Θερμοστάτης στήλης
Degasser	Απαερωτής
Waste	Απόβλητα
Electronic signal	Ηλεκτρονικό σήμα
Detector	Ανιχνευτής
Recorder	Καταγραφέας
Vials	Φιαλίδια
Ultraviolet	Υπεριώδης
Retention time	Χρόνος ανάσχεσης
Retention volume	Όγκος ανάσχεσης
Mass distribution ratio	Λόγος κατανομής μάζας

Symmetry factor	Παράγοντας συμμετρίας
Tailing factor	Παράγοντας ασυμμετρίας
System suitability	Σύστημα σταθερότητας
Resolution	Διαχωριστότητα
Peak to valley ratio	Λόγος ύψος κορυφής προς κοιλάδα
Signal to noise	Λόγος σήμα προς θόρυβο
Repeatability	Επαναληψιμότητα
Chiral chromatography	Χειρική χρωματογραφία
Axial dispersion	Αξονική διασπορά
External mass transfer	Εξωτερική μεταφορά μάζας
Intraparticle diffusion	Ενδοσωματιδιακή διάχυση
Adsorption	Προσρόφηση
Desorption kinetics	Κινητική εκρόφησης
Pore diffusion	Διάχυση μέσω πόρου
Surface diffusion	Επιφανειακή διάχυση
Molecular diffusion	Μοριακή διάχυση
Isosteric heat of adsorption	Ισοστερική θερμότητα διάχυσης επιφάνειας
Activation energy of surface diffusion	Ενέργεια ενεργοποίησης διάχυσης επιφάνειας
Quality characteristics	Χαρακτηριστικά ποιότητας
Accuracy	Ακρίβεια

Precision	Πιστότητα
Sensitivity	Ευαισθησία
Detectability	Ανιχνευσιμότητα
Selectivity	Εκλεκτικότητα
Specificity	Ειδικότητα
Ruggedness	Αντοχή
Robustness	Ανθεκτικότητα
Spiked	Εμβολιασμένο
Reference material	Υλικό αναφοράς
Recovery	Ανάκτηση
Dispersion	Διασπορά
Error	Σφάλμα
Random fluctuations	Τυχαίες διακυμάνσεις
Normal distribution	Τυχαία κατανομή
Reproducibility	Αναπαραγωγιμότητα
Standard deviation	Τυπική απόκλιση
Variance	Διακύμανση
Relative standard deviation	Σχετική τυπική απόκλιση
Coefficient of variation	Συντελεστής μεταβλητότητας
Detection Limit	Όριο ανιχνεύσεως

Quantitation limit	Όριο ποσοτικοποίησης
Protocol	Πρωτόκολλο
Report	Έκθεση
Test data	Δεδομένα ελέγχου
Identification test	Έλεγχοι ταυτοποίησης
Quantitative measurements	Ποσοτικοί προσδιορισμοί
Impurity	Πρόσμιξη
Active moieties	Δραστικές ουσίες
Assay	Ποσοτικοί προσδιορισμοί
Purity	Καθαρότητα
Mass spectrometry	Φασματομετρία μαζών
Stock solution	Διάλυμα παρακαταθήκης
Slope	Κλίση
Visual evaluation	Οπτική αξιολόγηση
Baseline noise	Γραμμή βάσης
Background	Υπόβαθρο
Response	Απόκριση
Placebo	Λευκό δείγμα
Mean	Μέσος όρος
Intercept	Τομή

Intermediate precision	Ενδιάμεση πιστότητα
Residual test	Έλεγχος υπολειμμάτων
Voltage	Δυναμικό
Channel	Κανάλι
Receptor	Υποδοχέας
Glutamate	Γλουταμινικό
Test solution	Διάλυμα ελέγχου

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantitation
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
UV	Ultraviolet
DAD	Diode Array Detector
RSD%	Relative Standard Deviation
PDA	Photo Diode Array
ISO	International Organization for Standardization
SD	Standard Deviation
CV	Coefficient of variation
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
GABA	γ -aminobutyric acid
VPA	Valproic acid
FDA	Food and Drug Administration
GC	Gas Chromatography
LC	Liquid Chromatography

UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
MS	Mass Spectrometry

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Skoog, Holler, Nieman, «*Αρχές της ενόργανης ανάλυσης*», εκδόσεις Κωσταράκης, 2005, σελ. 785.
2. Yuri Kazakevich, Rosario Lobrutto, «*HPLC for pharmaceutical scientists*», 2007, Novartis Pharmaceuticals, East Hanover, New Jersey.
3. Θ.Π Χατζηγιάννου, Μ. Κουππάρης, *Ενόργανη Ανάλυση*, Αθήνα, 1990.
4. European Pharmacopoeia 2.2.46, Chromatographic separation techniques.
5. European Pharmacopoeia 2.2.29, Liquid chromatography.
6. Kanji Miyabea, Georges Guiochonb, *Surface diffusion in reversed-phase liquid chromatography*, Journal of Chromatography A, 1217 (2010) 1713–1734.
7. Kanji Miyabe, *Surface diffusion in reversed-phase liquid chromatography using silica gel stationary phases of different C1 and C18 ligand densities*, Journal of Chromatography A, 1167 (2007) 161–170.
8. Μ. Κουππάρης, *Επικύρωση*, Σημειώσεις για το μάθημα Χημειομετρία του μεταπτυχιακού προγράμματος “Χημική Ανάλυση – Έλεγχος Ποιότητας”, 2012
9. Note for guidance on validation of analytical procedures: text and methodology (CPMP/ICH/381/95), June 1995.
10. Ludwig Huber, *Validation of analytical method*, 2010, Agilent technologies.
11. Μ. Κουππάρης, Ν. Θωμαΐδης, *Διασφάλιση Ποιότητας*, Σημειώσεις για το μάθημα Συστήματα Διασφάλισης Ποιότητας, 2012.
12. Μ. Κουππάρης, *Έλεγχος Ποιότητας Φαρμάκων*, Σημειώσεις για το μάθημα Έλεγχος Ποιότητας Φαρμάκων του μεταπτυχιακού προγράμματος “Χημική Ανάλυση – Έλεγχος Ποιότητας”, 2012.

13. J.N. Miller, J.C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 4th edition, Pearson Education Limited, 2000.
14. Wolfgang Löscher, *valproate: a reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action*, Progress in Neurobiology, Vol. 58, pp. 31±59, 1999.
15. Meir Bialer, *Chemical properties of antiepileptic drugs (AEDs)*, Advanced Drug Delivery Reviews 64 (2012) 887–895.
16. Κυριακή Σιδηροπούλου, «Βασικές αρχές λειτουργίας του νευρικού συστήματος», Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
17. Heidrun Potschka, *Pharmacological treatment strategies: Mechanisms of antiepileptic drugs*, Epileptology 1(2013) 31–37.
18. Ahamed Zawab, John Carmody, *Safe use of sodium valproate*, Australian Prescriber 2014;37:124–7.
19. Asher Ornoy, *Neuroteratogens in man: An overview with special emphasis on the teratogenicity of antiepileptic drugs in pregnancy*, Reproductive Toxicology 22 (2006) 214–226.
20. Nicole Terbach and Robin S.B. Williams, *Structure–function studies for the panacea, valproic acid*, Biochemical Society Transactions (2009) Volume 37, part 5.
21. Ε. Θεοχάρη, Χ. Μπουλάς, Α. Χαϊδεμένος, *Η χρήση των αντιεπιληπτικών φαρμάκων στη σχιζοφρένεια: Ανασκόπηση των νεότερων δεδομένων*, Ψυχιατρική 18 (3), 2007.
22. Paula Proença, João Miguel Franco, Carla Mustra, Mariana Marcos, Ana Rita Pereira, Francisco Corte-Real, Duarte Nuno Vieira, *An UPLC-MS/MS method for the determination of valproic acid in blood of a fatal intoxication case*, Journal of Forensic and Legal Medicine 18 (2011) 320-324.
23. Shouhong Gao, Haijun Miao, Xia Tao, Bo Jiang, Ying Xiao, Fei Cai, Yunlei Yun, Jingxian Li, Wansheng Chen, *LC–MS/MS method for simultaneous determination of valproic acid and major metabolites in human plasma*, Journal of Chromatography B, 879 (2011) 1939– 1944.

24. Ibrahim A. Alsarra, M. Al-Omar and F. Belal, *Valproic Acid and Sodium Valproate: Comprehensive Profile*, Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, King Saud University.
25. European Pharmacopoeia, *sodium valproate*, 04/2012:0678.
26. British Pharmacopoeia, *sodium valproate oral solution*, volume (III), 2013.
27. European Pharmacopoeia, *sodium valproate*, 01/2005:0678.