



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ-ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΗPLC ΓΙΑ ΤΟΝ
ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΔΙΚΛΟΦΑΙΝΑΚΗΣ,
ΘΕΙΟΚΟΛΧΙΚΟΣΙΔΗ ΚΑΙ ΤΩΝ ΣΥΓΓΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΤΟΥΣ ΣΕ
ΔΕΡΜΑΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ**

ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΣΟΥΡΤΖΗ

ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΑΘΗΝΑ
2017**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΗPLC ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΔΙΚΛΟΦΑΙΝΑΚΗΣ, ΘΕΙΟΚΟΛΧΙΚΟΣΙΔΗ ΚΑΙ ΤΩΝ
ΣΥΓΓΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΤΟΥΣ ΣΕ ΔΕΡΜΑΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ

ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΣΟΥΡΤΖΗ

A.M. 1307-6

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

ΜΙΧΑΗΛ ΚΟΥΠΠΑΡΗΣ, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΙΧΑΗΛ ΚΟΥΠΠΑΡΗΣ, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΕΙΡΗΝΗ ΠΑΝΤΕΡΗ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΙΩΑΝΝΗΣ ΝΤΟΤΣΙΚΑΣ, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος «Φαρμακευτική Ανάλυση – Έλεγχος Ποιότητας» του Τμήματος Φαρμακευτικής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή, κ. Μιχαήλ Κουμπάρη, για την άριστη συνεργασία και την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Αικατερίνη Γκρεμηλογιάννη και την κα. Αικατερίνη Μπουτσίνη για τη συνεργασία και την τεχνική τους βοήθεια.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, κα. Ειρήνη Παντερή και κ. Ιωάννη Ντότσικα, για τον χρόνο που διέθεσαν για τη μελέτη και διόρθωση της παρούσας εργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδων προσδιορισμού των δραστικών συστατικών νατριούχου δικλοφαινάκης και θειοκολχικοσίδης και των συγγενών ουσιών τους σε δερματικό διάλυμα, με τη χρήση της τεχνικής της Υγροχρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (HPLC-PDA).

Η νατριούχος δικλοφαινάκη ανήκει στα Μη Στεροειδή Αντιφλεγμονώδη Φάρμακα (ΜΣΑΦ) και βρίσκει ευρεία εφαρμογή σε σκευάσματα για τοπική χορήγηση. Η αναλυτική μέθοδος που αναπτύχθηκε χαρακτηρίζεται από εκλεκτικότητα και επαναληψιμότητα και επιτρέπει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της νατριούχου δικλοφαινάκης και των προσμίξεών της. Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με ισοκρατική έκλουση σε στήλη C₁₈, 250×4,6 mm, 5 μm. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH 2,5) – μεθανόλης σε αναλογία 34:66 v/v. Η ταχύτητα ροής ήταν 1,0 mL/min, ενώ το μήκος κύματος του ανιχνευτή ορίστηκε στα 254 nm. Το όριο ανίχνευσης των προσμίξεων προσδιορίστηκε στα 0,012 μg/mL και το όριο ποσοτικοποίησης στα 0,036 μg/mL.

Ο θειοκολχικοσίδης, ο οποίος δε συμπεριλαμβάνεται στις μονογραφίες της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας, ανήκει στα μυοχαλαρωτικά φάρμακα των σκελετικών μυών και μπορεί να χορηγηθεί, επίσης, τοπικά. Ο προσδιορισμός του πραγματοποιήθηκε με ισοκρατική έκλουση σε στήλη Hypersil Silica, 250×4,6 mm, 5 μm και κινητή φάση αποτελούμενη από χλωροφόρμιο και μεθανόλη σε αναλογία 85:15 v/v. Η ταχύτητα ροής ήταν 1,0 mL/min, το μήκος κύματος ορίστηκε στα 370 nm και η θερμοκρασία στήλης στους 30 °C. Για τον προσδιορισμό των προσμίξεων του θειοκολχικοσίδης εφαρμόστηκε πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης, στις ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες. Τα όρια ανίχνευσης των προσμίξεων κυμαίνονταν μεταξύ 1,9 – 3,5 ng/mL και τα όρια ποσοτικοποίησης μεταξύ 5,7 – 10,6 ng/mL.

Οι μέθοδοι που αναπτύχθηκαν, επικυρώθηκαν σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες (ICH Guidelines), έπειτα από εξέταση και αξιολόγηση χαρακτηριστικών ποιότητας, όπως η ειδικότητα, η γραμμικότητα, η πιστότητα, η ακρίβεια, η ανθεκτικότητα και τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Δικλοφαινάκη, θειοκολχικοσίδης, συγγενείς ουσίες, επικύρωση, υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης

ABSTRACT

The purpose of this MSc Thesis is the development and validation of analytical methods for the determination of the active substances diclofenac sodium and thiolcolchicoside and their related substances in cutaneous solution, using High Performance Liquid Chromatography with PDA detector.

Diclofenac sodium is a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID), which is widely used in topical formulations. A selective and reproducible analytical method, for the simultaneous determination of diclofenac sodium and its related substances, was developed. Separation was performed isocratically on a C₁₈ (250×4.6 mm, 5 μm) column, with a mobile phase consisting of phosphate buffer pH 2.5 - methanol (34:66 v/v) at flow rate 1.0 mL/min. The detection was carried out at 254 nm. The limit of detection was found to be 0.012 μg/mL and the quantitation limit 0.036 μg/mL.

Thiolcolchicoside, which is not included in the European Pharmacopoeia, is a muscle skeletal relaxant and is also used in topical formulations. The determination was performed isocratically on an Hypersil Silica (250×4.6 mm, 5 μm) column, with a mobile phase consisting of chloroform – methanol (85:15 v/v) at flow rate 1.0 mL/min. The detection was carried out at 370 nm and the column temperature was set at 30 °C. Gradient elution was performed for the determination of the impurities, with the same chromatographic parameters. The limits of detection ranged from 1.9 to 3.5 ng/mL and the quantitation limits from 5.7 to 10.6 ng/mL.

The developed analytical methods were validated according to International Guidelines (ICH Guidelines), after examining and evaluating quality characteristics, such as linearity, precision, accuracy, robustness and detection and quantitation limits.

KEYWORDS: Diclofenac, thiolcolchicoside, related substances, validation, HPLC

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.	ΔΙΚΛΟΦΑΙΝΑΚΗ.....	19
1.1	Αντιφλεγμονώδη Φάρμακα.....	19
1.1.1	Φλεγμονή.....	19
1.1.2	Μηχανισμός Δράσης Μη Στεροειδών Αντιφλεγμονωδών Φαρμάκων.....	19
1.2	Ρευματικές παθήσεις.....	20
1.2.1	Οστεοαρθρίτιδα.....	21
1.3	Δικλοφαινάκη.....	22
1.3.1	Ιστορική αναδρομή.....	22
1.3.2	Χημική δομή – Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά.....	23
1.3.3	Προσμίξεις.....	24
1.4	Θεραπευτικές Ενδείξεις - Μηχανισμός Δράσης.....	25
1.5	Φαρμακοκινητικές Ιδιότητες.....	26
1.5.1	Απορρόφηση.....	26
1.5.2	Κατανομή.....	26
1.5.3	Μεταβολισμός.....	27
1.5.4	Απέκκριση.....	27
1.6	Ανεπιθύμητες Ενέργειες.....	27
1.7	Τοπική χορήγηση νατριούχου δικλοφαινάκης.....	28
1.8	Μέθοδοι προσδιορισμού δικλοφαινάκης.....	30
2.	ΘΕΙΟΚΟΛΧΙΚΟΣΙΔΗΣ.....	34
2.1	Μυοχαλαρωτικά σκελετικών μυών.....	34
2.2	Θειοκολχικοσίδη.....	34
2.2.1	Χημική δομή – Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά.....	34
2.2.2	Προσμίξεις.....	35
2.3	Θεραπευτικές ενδείξεις – Μηχανισμός δράσης.....	35
2.4	Ανεπιθύμητες Ενέργειες.....	36
2.5	Ειδικές προφυλάξεις – Θέματα ασφαλείας.....	36
2.6	Μέθοδοι προσδιορισμού θειοκολχικοσίδη.....	38
3.	ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ.....	41
3.1	Ορισμοί.....	41
3.2	Έλεγχος περιεκτικότητας πρώτων υλών.....	42
3.3	Έλεγχοι καθαρότητας.....	42
3.4	Έλεγχος τελικού προϊόντος.....	43
3.5	Μελέτες σταθερότητας.....	45
3.6	Επικύρωση Αναλυτικών Μεθόδων.....	45

3.6.1	Ειδικότητα (Specificity)	45
3.6.2	Γραμμικότητα (Linearity).....	46
3.6.3	Εύρος (Range)	46
3.6.4	Ακρίβεια (Accuracy)	46
3.6.5	Πιστότητα (Precision)	46
3.6.6	Ανιχνευσιμότητα (Detectability)	47
3.6.7	Ανθεκτικότητα (Robustness).....	47
3.7	Εφαρμογές της HPLC στη Φαρμακευτική Ανάλυση	48
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ		
4.	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	53
4.1	Εξοπλισμός.....	53
4.1.1	Χρωματογραφικό σύστημα	53
4.1.2	Αναλυτικές Στήλες	53
4.1.3	Συσκευές.....	53
4.2	Διαλύτες – Αντιδραστήρια	54
4.3	Πρότυπες Ουσίες.....	54
5.	ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΝΑΤΡΙΟΥΧΟΥ ΔΙΚΛΟΦΑΙΝΑΚΗΣ ΣΕ ΔΕΡΜΑΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ	55
5.1	Εισαγωγή.....	55
5.2	Ανάπτυξη μεθόδου	55
5.3	Παρασκευή διαλυμάτων.....	59
5.3.1	Παρασκευή προτύπου διαλύματος 500 ppm (standard solution)	59
5.3.2	Παρασκευή διαλυμάτων ελέγχου (test solutions).....	60
5.4	Ποσοτικοποίηση.....	60
5.5	Χρωματογραφικές παράμετροι.....	61
5.6	Έλεγχος καταλληλότητας του συστήματος (System Suitability)	61
5.7	Επικύρωση της μεθόδου.....	62
5.7.1	Ειδικότητα	62
5.7.2	Γραμμικότητα.....	65
5.7.3	Πιστότητα.....	68
5.7.4	Ακρίβεια	71
5.7.5	Εύρος.....	74
5.7.6	Ανθεκτικότητα.....	74
5.8	Συμπέρασμα	77
6.	ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ ΤΗΣ ΝΑΤΡΙΟΥΧΟΥ ΔΙΚΛΟΦΑΙΝΑΚΗΣ ΣΕ ΔΕΡΜΑΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ	78
6.1	Ανάπτυξη μεθόδου	78

6.2	Παρασκευή διαλυμάτων.....	81
6.2.1	Παρασκευή διαλυμάτων ελέγχου (test solutions).....	81
6.2.2	Παρασκευή διαλύματος αναφοράς 0,2% (reference solution).....	81
6.3	Ποσοτικοποίηση.....	81
6.4	Χρωματογραφικές παράμετροι.....	82
6.5	Ταυτοποίηση.....	82
6.6	Έλεγχος καταλληλότητας του συστήματος (System Suitability).....	82
6.7	Επικύρωση της μεθόδου.....	82
6.7.1	Ειδικότητα.....	82
6.7.2	Γραμμικότητα.....	84
6.7.3	Πιστότητα.....	87
6.7.4	Ακρίβεια.....	90
6.7.5	Εύρος.....	93
6.7.6	Ανθεκτικότητα.....	93
6.7.7	Όριο ανίχνευσης (LOD)/Όριο ποσοτικοποίησης (LOQ).....	95
6.8	Συμπέρασμα.....	96
7.	ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΘΕΙΟΚΟΛΧΙΚΟΣΙΔΗ ΣΕ ΔΕΡΜΑΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ.....	97
7.1	Ανάπτυξη της μεθόδου.....	97
7.2	Παρασκευή διαλυμάτων.....	109
7.2.1	Παρασκευή προτύπου διαλύματος θειοκολχικοσίδη (standard solution).....	109
7.2.2	Παρασκευή διαλυμάτων ελέγχου (test solutions).....	109
7.3	Ποσοτικοποίηση.....	110
7.4	Χρωματογραφικές παράμετροι.....	111
7.5	Έλεγχος καταλληλότητας του συστήματος.....	111
7.6	Επικύρωση της μεθόδου.....	111
7.6.1	Ειδικότητα.....	111
7.6.2	Γραμμικότητα.....	113
7.6.3	Πιστότητα.....	116
7.6.4	Ακρίβεια.....	117
7.6.5	Εύρος.....	119
7.6.6	Ανθεκτικότητα.....	119
7.7	Συμπέρασμα.....	122
8.	ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ ΤΟΥ ΘΕΙΟΚΟΛΧΙΚΟΣΙΔΗ ΣΕ ΔΕΡΜΑΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ.....	123
8.1	Ανάπτυξη της μεθόδου.....	123
8.2	Παρασκευή διαλυμάτων.....	125
8.2.1	Παρασκευή διαλύματος ελέγχου.....	125

8.2.2	Παρασκευή διαλύματος αναφοράς 0,2% (reference solution)	125
8.3	Ποσοτικοποίηση.....	125
8.4	Χρωματογραφικές παράμετροι.....	126
8.5	Επικύρωση της μεθόδου.....	126
8.5.1	Ειδικότητα	126
8.5.2	Γραμμικότητα.....	128
8.5.3	Παράγοντας Απόκρισης (Response Factor)	136
8.5.4	Πιστότητα.....	137
8.5.5	Ακρίβεια	139
8.5.6	Εύρος.....	142
8.5.7	Ανθεκτικότητα.....	142
8.5.8	Όριο ανίχνευσης (LOD)/ Όριο ποσοτικοποίησης (LOQ).....	146
8.5.9	Συμπέρασμα	147
	ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΗΜΗΣΕΩΝ	149
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	151

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1	Χημική δομή νατριούχου δικλοφαινάκης.....	23
Εικόνα 1.2	Χημική δομή πρόσμιξης Α.....	24
Εικόνα 1.3	Χημική δομή πρόσμιξης Β.....	24
Εικόνα 1.4	Χημική δομή πρόσμιξης C.....	24
Εικόνα 1.5	Χημική δομή πρόσμιξης D.....	25
Εικόνα 1.6	Χημική δομή πρόσμιξης E.....	25
Εικόνα 1.7	Χημική δομή πρόσμιξης F.....	25
Εικόνα 2.1	Χημική δομή θειοκολχικοσίδη.....	34
Εικόνα 2.2	Χημική δομή πρόσμιξης colchicine.....	35
Εικόνα 2.3	Χημική δομή πρόσμιξης N-Desacetyl-N-formyl thiocolchicoside.....	35
Εικόνα 2.4	Χημική δομή πρόσμιξης colchicoside.....	35
Εικόνα 5.1	Χρωματογράφημα και πίνακας δεδομένων κορυφών διαλύματος ελέγχου καταλληλότητας συστήματος.....	56
Εικόνα 5.2	Χρωματογράφημα και πίνακας δεδομένων κορυφών διαλύματος ελέγχου 500 ppm δικλοφαινάκης για το δερματικό διάλυμα περιεκτικότητας 1,5% w/w.....	57
Εικόνα 5.3	Χρωματογράφημα και πίνακας δεδομένων κορυφών διαλύματος ελέγχου 500 ppm για το δερματικό διάλυμα περιεκτικότητας 4,0% w/v.....	58
Εικόνα 5.4	Χρωματογράφημα διαλύματος placebo για το δερματικό διάλυμα περιεκτικότητας 1,5% w/w νατριούχου δικλοφαινάκης.....	63
Εικόνα 5.5	Χρωματογράφημα διαλύματος placebo για το δερματικό διάλυμα περιεκτικότητας 4,0% w/v νατριούχου δικλοφαινάκης.....	63
Εικόνα 5.6	Χρωματογράφημα και πίνακας δεδομένων κορυφής για το εμβολιασμένο διάλυμα Β για τη σύσταση 1,5% w/w.....	64
Εικόνα 5.7	Χρωματογράφημα και πίνακας δεδομένων για το εμβολιασμένο διάλυμα Β για τη σύσταση 4,0% w/v.....	64
Εικόνα 5.8	Γραφική παράσταση της καμπύλης βαθμονόμησης της νατριούχου δικλοφαινάκης.....	67
Εικόνα 5.9	Διάγραμμα υπολοίπων νατριούχου δικλοφαινάκης.....	67
Εικόνα 6.1	Χρωματογράφημα και πίνακας δεδομένων διαλύματος αναφοράς 0,2% για τη σύσταση νατριούχου δικλοφαινάκης 1,5% w/w.....	79
Εικόνα 6.2	Χρωματογράφημα και πίνακας δεδομένων διαλύματος αναφοράς 0,2% για τη σύσταση νατριούχου δικλοφαινάκης 4,0% w/v.....	79
Εικόνα 6.3	Χρωματογράφημα και πίνακας δεδομένων για το διάλυμα 0,05% για τη σύσταση νατριούχου δικλοφαινάκης 1,5% w/w.....	80
Εικόνα 6.4	Χρωματογράφημα και πίνακας δεδομένων για το διάλυμα 0,05% για τη σύσταση νατριούχου δικλοφαινάκης 4,0% w/v.....	80
Εικόνα 6.5	Χρωματογράφημα και πίνακας δεδομένων κορυφής για το εμβολιασμένο διάλυμα Β για τη σύσταση νατριούχου δικλοφαινάκης 1,5% w/w.....	84
Εικόνα 6.6	Χρωματογράφημα και πίνακας δεδομένων κορυφής για το εμβολιασμένο διάλυμα Β για τη σύσταση νατριούχου δικλοφαινάκης 4,0% w/v.....	84
Εικόνα 6.7	Γραφική παράσταση της καμπύλης βαθμονόμησης της μεθόδου προσδιορισμού των προσμίξεων της νατριούχου δικλοφαινάκης.....	87
Εικόνα 6.8	Διάγραμμα υπολοίπων της μεθόδου προσδιορισμού των προσμίξεων της νατριούχου δικλοφαινάκης.....	87
Εικόνα 7.1	Χρωματογράφημα από την ανάλυση μείγματος με πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης κατά την ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού του θειοκολχικοσίδη.....	104

Εικόνα 7.2 Χρωματογράφημα με πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης 7.10 σε μήκος κύματος 370nm.....	106
Εικόνα 7.3 Χρωματογράφημα εμβολιασμένου διαλύματος Β από τις δοκιμές σε συγκέντρωση εργασίας 500 ppm για την ανάπτυξη της μεθόδου προσδιορισμού του θειοκολχικοσίδη	107
Εικόνα 7.4 Χρωματογράφημα δοκιμής ισοκρατικής έκλουσης με CHCl ₃ :MeOH σε αναλογία 85:15.....	109
Εικόνα 7.5 Χρωματογράφημα διαλύματος placebo για τη μελέτη της ειδικότητας της μεθόδου προσδιορισμού του θειοκολχικοσίδη.....	112
Εικόνα 7.6 Χρωματογράφημα και πίνακας δεδομένων κορυφής για το εμβολιασμένο διάλυμα Β 50 µg/mL του θειοκολχικοσίδη	113
Εικόνα 7.7 Γραφική παράσταση της καμπύλης βαθμονόμησης του θειοκολχικοσίδη	115
Εικόνα 7.8 Διάγραμμα υπολοίπων του θειοκολχικοσίδη	115
Εικόνα 8.1 Χρωματογράφημα διαλύματος placebo για τη μελέτη της ειδικότητας της μεθόδου προσδιορισμού των προσμίξεων του θειοκολχικοσίδη.....	127
Εικόνα 8.2 Χρωματογράφημα και πίνακας δεδομένων κορυφών για το εμβολιασμένο διάλυμα Β για τις προσμίξεις του θειοκολχικοσίδη	127
Εικόνα 8.3 Γραφική παράσταση της καμπύλης βαθμονόμησης της κολχικίνης.....	130
Εικόνα 8.4 Διάγραμμα υπολοίπων της κολχικίνης.....	130
Εικόνα 8.5 Γραφική παράσταση της καμπύλης βαθμονόμησης του Ν-φορμυλο-θειοκολχικοσίδη	132
Εικόνα 8.6 Διάγραμμα υπολοίπων του Ν-φορμυλο-θειοκολχικοσίδη	132
Εικόνα 8.7 Γραφική παράσταση της καμπύλης βαθμονόμησης του κολχικοσίδη.....	134
Εικόνα 8.8 Διάγραμμα υπολοίπων του κολχικοσίδη.....	134
Εικόνα 8.9 Γραφική παράσταση της καμπύλης βαθμονόμησης του θειοκολχικοσίδη	136
Εικόνα 8.10 Διάγραμμα υπολοίπων του θειοκολχικοσίδη	136

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1	Μέθοδοι προσδιορισμού νατριούχου δικλοφαινάκης με την τεχνική HPLC και LC-MS.....	31
Πίνακας 2.1	Μέθοδοι προσδιορισμού θειοκολχικοσίδη με την τεχνική HPLC.....	40
Πίνακας 3.1	Αξιολόγηση Αναλυτικών Μεθόδων για Επικύρωση.....	48
Πίνακας 5.1	Αποτελέσματα της μελέτης γραμμικότητας της μεθόδου προσδιορισμού της νατριούχου δικλοφαινάκης.....	66
Πίνακας 5.2	Αποτελέσματα της μελέτης πιστότητας της μεθόδου προσδιορισμού της νατριούχου δικλοφαινάκης για τη σύσταση 1,5% w/w.....	70
Πίνακας 5.3	Αποτελέσματα της μελέτης πιστότητας της μεθόδου προσδιορισμού της νατριούχου δικλοφαινάκης για τη σύσταση 4,0% w/v.....	71
Πίνακας 5.4	Αποτελέσματα της μελέτης ακρίβειας της μεθόδου προσδιορισμού της νατριούχου δικλοφαινάκης για τη σύσταση 1,5% w/w.....	73
Πίνακας 5.5	Αποτελέσματα της μελέτης ακρίβειας της μεθόδου προσδιορισμού της νατριούχου δικλοφαινάκης για τη σύσταση 4,0% w/v.....	74
Πίνακας 5.6	Πειραματικός σχεδιασμός μελέτης ανθεκτικότητας.....	75
Πίνακας 5.7	Αποτελέσματα της μελέτης σταθερότητας της μεθόδου προσδιορισμού της νατριούχου δικλοφαινάκης για τη σύσταση 1,5% w/w.....	76
Πίνακας 5.8	Αποτελέσματα της μελέτης σταθερότητας της μεθόδου προσδιορισμού της νατριούχου δικλοφαινάκης για τη σύσταση 4,0% w/v.....	77
Πίνακας 6.1	Πίνακας με τους παράγοντες διόρθωσης για τις προσμίξεις της νατριούχου δικλοφαινάκης.....	82
Πίνακας 6.2	Αποτελέσματα της μελέτης γραμμικότητας της μεθόδου προσδιορισμού των προσμίξεων της νατριούχου δικλοφαινάκης.....	86
Πίνακας 6.3	Αποτελέσματα της μελέτης πιστότητας της μεθόδου προσδιορισμού των προσμίξεων της νατριούχου δικλοφαινάκης για τη σύσταση 1,5% w/w.....	89
Πίνακας 6.4	Αποτελέσματα της μελέτης πιστότητας της μεθόδου προσδιορισμού των προσμίξεων της νατριούχου δικλοφαινάκης για τη σύσταση 4,0% w/v.....	90
Πίνακας 6.5	Αποτελέσματα της μελέτης ακρίβειας της μεθόδου προσδιορισμού των προσμίξεων της νατριούχου δικλοφαινάκης για τη σύσταση 1,5% w/w.....	92
Πίνακας 6.6	Αποτελέσματα της μελέτης ακρίβειας της μεθόδου προσδιορισμού των προσμίξεων της νατριούχου δικλοφαινάκης για τη σύσταση 4,0% w/v.....	93
Πίνακας 6.7	Πειραματικός σχεδιασμός μελέτης της ανθεκτικότητας.....	93
Πίνακας 6.8	Αποτελέσματα της μελέτης σταθερότητας της μεθόδου προσδιορισμού των προσμίξεων της νατριούχου δικλοφαινάκης για τη σύσταση 1,5% w/w.....	94
Πίνακας 6.9	Αποτελέσματα της μελέτης σταθερότητας της μεθόδου προσδιορισμού των προσμίξεων της νατριούχου δικλοφαινάκης για τη σύσταση 4,0% w/v.....	95
Πίνακας 7.1	Αποτελέσματα της μελέτης γραμμικότητας της μεθόδου προσδιορισμού του θειοκολχικοσίδη.....	114
Πίνακας 7.2	Αποτελέσματα της μελέτης πιστότητας της μεθόδου προσδιορισμού του θειοκολχικοσίδη.....	117
Πίνακας 7.3	Αποτελέσματα της μελέτης ακρίβειας της μεθόδου προσδιορισμού του θειοκολχικοσίδη.....	119
Πίνακας 7.4	Πειραματικός σχεδιασμός μελέτης ανθεκτικότητας.....	120
Πίνακας 7.5	Αποτελέσματα της μελέτης ανθεκτικότητας της μεθόδου προσδιορισμού του θειοκολχικοσίδη.....	120
Πίνακας 7.6	Αποτελέσματα της μελέτης σταθερότητας της μεθόδου προσδιορισμού του θειοκολχικοσίδη.....	121

Πίνακας 8.1	Αποτελέσματα της μελέτης γραμμικότητας της μεθόδου προσδιορισμού της κολχικίνης.....	129
Πίνακας 8.2	Αποτελέσματα της μελέτης γραμμικότητας της μεθόδου προσδιορισμού του N-φορμυλο-θειοκολχικοσίδη.....	131
Πίνακας 8.3	Αποτελέσματα της μελέτης γραμμικότητας της μεθόδου προσδιορισμού του κολχικοσίδη.....	133
Πίνακας 8.4	Αποτελέσματα της μελέτης γραμμικότητας της μεθόδου προσδιορισμού του θειοκολχικοσίδη.....	135
Πίνακας 8.5	Αποτελέσματα της μελέτης πιστότητας της μεθόδου προσδιορισμού της κολχικίνης.....	138
Πίνακας 8.6	Αποτελέσματα της μελέτης πιστότητας της μεθόδου προσδιορισμού του κολχικοσίδη.....	139
Πίνακας 8.7	Αποτελέσματα της μελέτης ακρίβειας της μεθόδου προσδιορισμού της κολχικίνης.....	141
Πίνακας 8.8	Αποτελέσματα της μελέτης ακρίβειας της μεθόδου προσδιορισμού του κολχικοσίδη.....	142
Πίνακας 8.9	Πειραματικός σχεδιασμός της μελέτης ανθεκτικότητας.....	143
Πίνακας 8.10	Αποτελέσματα της μελέτης ανθεκτικότητας της μεθόδου προσδιορισμού της κολχικίνης.....	143
Πίνακας 8.11	Αποτελέσματα της μελέτης ανθεκτικότητας της μεθόδου προσδιορισμού του κολχικοσίδη.....	144
Πίνακας 8.12	Αποτελέσματα της μελέτης σταθερότητας της μεθόδου προσδιορισμού της κολχικίνης.....	145
Πίνακας 8.13	Αποτελέσματα της μελέτης σταθερότητας της μεθόδου προσδιορισμού του κολχικοσίδη.....	145

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΔΙΚΛΟΦΑΙΝΑΚΗ

1.1 Αντιφλεγμονώδη Φάρμακα

1.1.1 Φλεγμονή

Ως φλεγμονή χαρακτηρίζεται η φυσιολογική απάντηση του οργανισμού σε μία ιστική βλάβη, η οποία μπορεί να προκύψει έπειτα από ένα σωματικό τραύμα, από την επίδραση βλαπτικών χημικών ουσιών ή από μικροβιολογικούς παράγοντες. Μέσω αυτού του μηχανισμού, ο οργανισμός προσπαθεί να αδρανοποιήσει ή να καταστρέψει τους βλαπτικούς παράγοντες και να επανορθώσει τους ιστούς που έχουν προσβληθεί. Η διαδικασία της φλεγμονής μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί και από αβλαβείς παράγοντες, όπως η γύρη, ή από μία αυτοάνοση αντίδραση, όπως συμβαίνει στο άσθμα ή στη ρευματοειδή αρθρίτιδα, περιπτώσεις κατά τις οποίες οι ίδιοι οι αμυντικοί μηχανισμοί μπορεί να προκαλέσουν ιστική βλάβη. Σημαντικό ρόλο για την πυροδότηση της φλεγμονής έχει η απελευθέρωση ειδικών χημικών μεσολαβητών από τους προσβεβλημένους ιστούς. Τέτοιοι χημικοί μεσολαβητές είναι αμίνες (ισταμίνη, 5-υδροξυτρυπταμίνη), λιπίδια (προσταγλανδίνες), μικρά πεπτίδια (βραδυκινίνη) και μεγαλύτερα πεπτίδια (ιντερλευκίνη-1), αναλόγως του τύπου της φλεγμονής [1].

1.1.2 Μηχανισμός Δράσης Μη Στεροειδών Αντιφλεγμονωδών Φαρμάκων

Τα Μη Στεροειδή Αντιφλεγμονώδη Φάρμακα (ΜΣΑΦ) δρουν μέσω της αναστολής της σύνθεσης των προσταγλανδινών, όπως προτάθηκε το 1971 από τον Vane [2]. Οι προσταγλανδίνες και οι συγγενείς τους ενώσεις (θρομβοξάνες, προστακυκλίνες, λευκοτριένια, υδροϋπεροξυεικοσιτετρανοϊκά και υδροξυεικοσιτετρανοϊκά οξέα) παράγονται από το αραχιδονικό οξύ σε όλους τους ιστούς, σε μικρές ποσότητες. Το αραχιδονικό οξύ αποτελεί συστατικό των φωσφολιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών. Οι προσταγλανδίνες, τα θρομβοξάνια και οι προστακυκλίνες συντίθενται από το αραχιδονικό οξύ μέσω της οδού της κυκλοοξυγενάσης, ενώ τα λευκοτριένια μέσω της οδού της λιποξυγενάσης [1]. Ο μηχανισμός δράσης των ΜΣΑΦ είναι η αναστολή του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος, μέσω της αναστολής των ενζύμων της κυκλοοξυγενάσης, και επομένως η αναστολή της παραγωγής των προσταγλανδινών. Η αναστολή των ενζύμων από τα ΜΣΑΦ, εκτός της ασπιρίνης, είναι αναστρέψιμη [3]. Υπάρχουν δύο ισομερή ένζυμα κυκλοοξυγενάσης, η κυκλοοξυγενάση-1 (COX-1) και η κυκλοοξυγενάση-2 (COX-2). Ο ρόλος της COX-1 είναι η φυσιολογική παραγωγή προστανοειδών και μέσω αυτών, η ρύθμιση φυσιολογικών διεργασιών, όπως η

γαστρική κυτταροπροστασία, η αγγειακή ομοιόσταση, η συσσώρευση αιμοπεταλίων και η νεφρική λειτουργία. Αντίθετα, η COX-2, εκφράζεται κυρίως σε καταστάσεις φλεγμονής. Φυσιολογικά η έκφρασή της γίνεται σε μικρό βαθμό σε λίγους ιστούς, όπως ο εγκέφαλος, ο νεφρός και τα οστά [1]. Επομένως, η αντιφλεγμονώδης δράση των ΜΣΑΦ οφείλεται στην αναστολή της COX-2. Τα ΜΣΑΦ, τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των μη εκλεκτικών COX αναστολέων, αναστέλλουν και τους δύο τύπους ενζύμων της κυκλοοξυγενάσης, κάθε έναν από αυτούς σε διαφορετικό βαθμό. Έτσι, ορισμένες από τις ανεπιθύμητες ενέργειες που παρουσιάζουν, και κυρίως αυτές που σχετίζονται με το γαστρεντερικό σύστημα, προέρχονται από την αναστολή της COX-1 [3]. Οι δομικές διαφορές στις ενεργές θέσεις των δύο ισομερών ενζύμων οδήγησαν στην ανάπτυξη των εκλεκτικών αναστολέων της COX-2. Η αναστολή της COX-2 εξαρτάται από τον χρόνο δράσης του φαρμάκου. Οι εκλεκτικοί αναστολείς της COX-2 φαίνεται να παρουσιάζουν μικρότερο κίνδυνο πρόκλησης γαστρεντερικής αιμορραγίας, ωστόσο αυξάνουν τον κίνδυνο υπέρτασης και κυρίως, μετά από μακροχρόνια χρήση, τον κίνδυνο για έμφραγμα του μυοκαρδίου και εγκεφαλικά επεισόδια. Τα ΜΣΑΦ έχουν αντιφλεγμονώδεις, αναλγητικές και αντιπυρετικές ιδιότητες. Η ισχύς για κάθε μία από αυτές τις δράσεις ποικίλλει μεταξύ των φαρμάκων αυτής της κατηγορίας [1].

1.2 Ρευματικές παθήσεις

Οι ρευματικές παθήσεις θεωρούνται από τις πιο παλιές αναγνωρισμένες ασθένειες, καθώς αναφορές σε αυτές χρονολογούνται αιώνες π. Χ. Ο Ιπποκράτης ήταν ο πρώτος ο οποίος αναγνώρισε την ύπαρξη των ρευματικών παθήσεων τον 4^ο αιώνα π.Χ., ενώ ο Γάλλος ιατρός Guillaume de Baillou, πρώτος κατέταξε τον ρευματισμό στις μυοσκελετικές παθήσεις. Ο όρος «οστεοαρθρίτιδα» εισήχθη για πρώτη φορά από τον John K. Spender το 1886, ως μία εναλλακτική ονομασία για τη ρευματοειδή αρθρίτιδα και όχι για να διαχωρίσει τις δύο ασθένειες. Η διαφοροποίηση των δύο παθήσεων έγινε το 1907, όταν ο Archibald E. Garrod αναγνώρισε τη συσχέτιση της οστεοαρθρίτιδας με την ηλικία, τη μεγαλύτερη επικράτησή της στο θηλυκό γένος σε σχέση με τη ρευματοειδή αρθρίτιδα και την κληρονομικότητα της ασθένειας, χωρίς όμως να διασαφηνιστούν πλήρως οι μηχανισμοί των δύο παθήσεων. Πολλές είναι οι ασθένειες που κατατάσσονται στις ρευματικές παθήσεις, όπως ο συστηματικός ερυθρεματοειδής λύκος, το σκληρόδερμα, η ινομυαλγία, η τενοντίτιδα κ.α. Η οστεοαρθρίτιδα και η

ρευματοειδής αρθρίτιδα, όμως, αποτελούν τις πιο συχνά εμφανιζόμενες ασθένειες αυτής της κατηγορίας, επηρεάζοντας μεγάλο μέρος του πληθυσμού [4].

1.2.1 Οστεοαρθρίτιδα

Η οστεοαρθρίτιδα είναι μία χρόνια εκφυλιστική νόσος, η οποία αποτελεί την πιο συχνή ρευματική πάθηση. Ο πόνος στις αρθρώσεις, η δυσκαμψία και η λειτουργική ανικανότητα αποτελούν συμπτώματα της νόσου, με αποτέλεσμα οι ασθενείς να αντιμετωπίζουν δυσκολίες στις καθημερινές τους δραστηριότητες και να επηρεάζεται αρνητικά η ποιότητα ζωής τους. Οι μορφές της οστεοαρθρίτιδας κατηγοριοποιούνται αναλόγως της άρθρωσης που έχει προσβληθεί (άνω άκρα, κάτω άκρα, σπονδυλική στήλη) και αναλόγως του εάν πρόκειται για πρωτογενή ή δευτερογενή (προκαλείται από μεταβολικές, ανατομικές, τραυματικές και φλεγμονώδεις καταστάσεις) οστεοαρθρίτιδα. Ως παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου θεωρούνται η μεγάλη ηλικία, το γυναικείο φύλο (σε ηλικία άνω των 50 ετών), η παχυσαρκία για οστεοαρθρίτιδα του γόνατος, ο τραυματισμός και η επαναλαμβανόμενη μηχανική επιβάρυνση και καταπόνηση μίας άρθρωσης [4]. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η οστεοαρθρίτιδα σχετίζεται με αλλοιώσεις ολόκληρης της άρθρωσης, και όχι μόνο του αρθρικού χόνδρου. Η απώλεια του αρθρικού χόνδρου θεωρείται η πρωταρχική αλλαγή που συμβαίνει, στη συνέχεια όμως, ακολουθεί μία σειρά αλλαγών, οι οποίες σχετίζονται με το υποχόνδριο οστό, τον αρθρικό υμένα, την αρθρική κάψα, το μηνίσκο και τη δημιουργία οστεοφύτων [5]. Σε αντίθεση με τη ρευματοειδή αρθρίτιδα, η οστεοαρθρίτιδα αναφέρεται ως μη φλεγμονώδης νόσος. Ωστόσο, η φλεγμονή φαίνεται να συμβάλλει στα συμπτώματα και στην εξέλιξη της νόσου, σε συνδυασμό με μία σειρά γενετικών, μεταβολικών και βιοχημικών παραγόντων [6]. Όσον αφορά το μηχανισμό με τον οποίο επηρεάζεται ο αρθρικός χόνδρος, τα χονδροκύτταρα θεωρούνται ότι έχουν πρωταρχικό ρόλο στη διαδικασία ανάπτυξης της οστεοαρθρίτιδας. Ο φυσιολογικός αρθρικός χόνδρος αποτελείται από την εξωκυτταρική μήτρα, η οποία περιέχει νερό, κολλαγόνο, πρωτεογλυκάνες και μικρή ποσότητα αλάτων ασβεστίου, και από τα χονδροκύτταρα. Η λειτουργία των χονδροκυττάρων μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες, όπως οι πολυπεπτιδικοί αυξητικοί παράγοντες, οι κυτοκίνες, μηχανικά και φυσικά ερεθίσματα και ακόμα και από τα ίδια τα συστατικά της μήτρας. Η εμφάνιση της οστεοαρθρίτιδας προκαλείται από τη μη ικανότητα των χονδροκυττάρων να διατηρήσουν την ομοιόσταση μεταξύ σύνθεσης και αποδόμησης των συστατικών της εξωκυτταρικής μήτρας. Δεν είναι ακριβώς γνωστό πού οφείλεται

αυτή η διαταραχή της ομοιόστασης, μία πιθανή αιτία όμως, θεωρείται ένα τραύμα το οποίο προκαλεί μία φλεγμονή. Στην περίπτωση αυτή προκαλείται μία ανοσολογική απόκριση, η οποία χαρακτηρίζεται από αυξημένη αναβολική και καταβολική δραστηριότητα. Τα χονδροκύτταρα απελευθερώνουν ένζυμα αποικοδόμησης, ενώ οι ουσίες που προκύπτουν από την αποδόμηση του κολλαγόνου και των πρωτεογλυκανών προκαλούν την απελευθέρωση κυτοκινών (TNFα, IL-6, IL-7). Η τελική απώλεια των χονδροκυττάρων οδηγεί στην ανάπτυξη της οστεοαρθρίτιδας και σε απώλεια του χόνδρου [5]. Όσον αφορά τον αρθρικό υμένα, τα T κύτταρα φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο στην αιτιοπαθογένεια της οστεοαρθρίτιδας [6]. Η διάγνωση της οστεοαρθρίτιδας γίνεται από την αξιολόγηση των κλινικών συμπτωμάτων και από ακτινογραφίες ή μαγνητική τομογραφία. Όσον αφορά τη θεραπευτική αντιμετώπιση, αυτή μπορεί να γίνει μη φαρμακευτικά, φαρμακευτικά ή με χειρουργική επέμβαση, αναλόγως του σταδίου στο οποίο βρίσκεται η νόσος. Η μη φαρμακευτική συμπτωματική αντιμετώπιση της οστεοαρθρίτιδας περιλαμβάνει την απώλεια βάρους, ασκήσεις για ενδυνάμωση των μυών της άρθρωσης και φυσικοθεραπεία. Η φαρμακευτική συμπτωματική θεραπεία περιλαμβάνει τη χορήγηση σκευασμάτων για τοπική χρήση, όπως κρέμες μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων ή καψαϊκίνης, την από του στόματος χορήγηση αναλγητικών και μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων, ενώ μπορούν να γίνουν και εγχύσεις μέσα στην άρθρωση (κορτιζόνης) ή γύρω από την άρθρωση (κορτιζόνης και τοπικού αναισθητικού) [7].

1.3 Δικλοφαινάκη

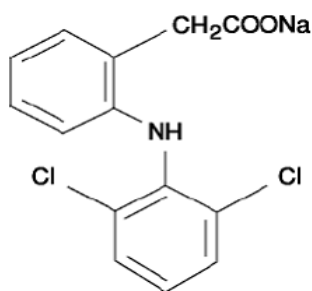
1.3.1 Ιστορική αναδρομή

Η δικλοφαινάκη, η οποία ανήκει στα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (ΜΣΑΦ), αποτελεί το πιο ευρέως συνταγογραφούμενο φάρμακο αυτής της κατηγορίας σε παγκόσμια κλίμακα. Η σύνθεσή της έγινε από τους Alfred Sallmann και Rudolf Pfister και εισήχθη για πρώτη φορά στη φαρμακευτική βιομηχανία από την Ciba-Geigy (σημερινή Novartis) το 1973. Η φαινυλοβουταζόνη ήταν το πρώτο ΜΣΑΦ που ανακαλύφθηκε, έπειτα από το σαλικυλικό και ακετυλοσαλικυλικό οξύ, και στη συνέχεια ακολούθησε η ανακάλυψη άλλων χημικών ενώσεων, όπως η ινδομεθακίνη, η ιβουπροφαίνη και το μεφαιναμικό οξύ. Η ανακάλυψη του μηχανισμού δράσης των ΜΣΑΦ και η ανάλυση των δομικών και φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των ήδη υπάρχοντων φαρμάκων της κατηγορίας αυτής, αποτέλεσε το έναυσμα για τη σύνθεση

νέων αντιφλεγμονωδών φαρμάκων με βελτιωμένη αποτελεσματικότητα, όπως η δικλοφαινάκη [8]. Με βάση τρία κοινά χαρακτηριστικά τα οποία παρουσίαζαν η φαινυλοβουταζόνη, το μεφαιναμικό οξύ και η ινδομεθακίνη, οι δημιουργοί της δικλοφαινάκης κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ένα αποτελεσματικό αντιφλεγμονώδες φάρμακο θα πρέπει να πληροί τα ακόλουθα κριτήρια: να είναι ασθενές οξύ με τιμή pKa μεταξύ 4 και 5, ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης/νερού σε pH 7,4 να είναι περίπου 10 και να διαθέτει δύο αρωματικούς δακτυλίους, οι οποίοι να σχηματίζουν γωνία μεταξύ τους. Οι επιθυμητές αυτές ιδιότητες παίζουν σημαντικό ρόλο, διότι η τιμή pKa μίας χημικής ένωσης και ο συντελεστής κατανομής σχετίζονται με τις φαρμακοκινητικές της ιδιότητες, όπως η απορρόφησή της, η σύνδεση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος και τους υποδοχείς και η απέκκρισή της, ενώ η στερεοχημική διάταξη των αρωματικών δακτυλίων σχετίζεται, επίσης, με τη σύνδεση στους υποδοχείς. Έτσι, με βάση τα παραπάνω κριτήρια έγινε η σύνθεση της δικλοφαινάκης, η οποία έχει τιμή pKa ίση με 4,0 και συντελεστή κατανομής 13,4 [9]. Τα στερεοχημικά χαρακτηριστικά της περιγράφονται στη συνέχεια.

1.3.2 Χημική δομή – Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά

Η δικλοφαινάκη ανήκει στα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα και είναι παράγωγο του φαινυλοξεικού οξέος. Στα φαρμακευτικά σκευάσματα που κυκλοφορούν βρίσκεται συνήθως υπό τη μορφή άλατος, είτε ως νατριούχος ή ως καλιούχος δικλοφαινάκη [8]. Η ονομασία «νατριούχος δικλοφαινάκη» αποτελεί την κοινόχρηστη ονομασία για το [2-[(2,6-διχλωροφαινυλ)αμινο]φαινυλ]οξικό νάτριο. Ο χημικός τύπος της ένωσης είναι $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$ και η σχετική μοριακή μάζα 318,1 [10].

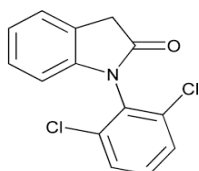


Εικόνα 1.1 Χημική δομή νατριούχου δικλοφαινάκης

Η νατριούχος δικλοφαινάκη αποτελείται από μία ομάδα φαινυλοξεικού οξέος, μία δευτεροταγή αμινομάδα και μία φαινυλομάδα, η οποία στις δύο όρθο θέσεις της διαθέτει από ένα άτομο χλωρίου. Λόγω της ύπαρξης των ατόμων χλωρίου, οι δύο δακτύλιοι του μορίου σχηματίζουν γωνία μεταξύ τους [9]. Αποτελεί μία λευκή ή ελαφρώς κίτρινη και ελαφρώς υγροσκοπική κρυσταλλική σκόνη. Είναι δυσδιάλυτη στο νερό, ευδιάλυτη σε μεθανόλη, διαλυτή σε αιθανόλη (96%) και ελαφρώς διαλυτή σε ακετόνη [10].

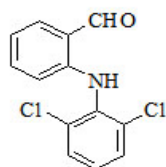
1.3.3 Προσμίξεις

Στη συνέχεια παρατίθενται οι προσμίξεις της νατριούχου δικλοφαινάκης που αναφέρονται στην Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία. Για τις προσμίξεις A και F υπάρχουν καθορισμένες προδιαγραφές (specified impurities).



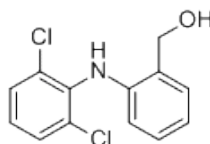
Εικόνα 1.2 Χημική δομή πρόσμιξης A

1-(2,6-dichlorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-one



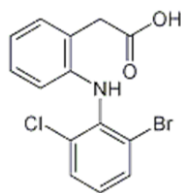
Εικόνα 1.3 Χημική δομή πρόσμιξης B

2-[(2,6-dichlorophenyl)amino]benzaldehyde



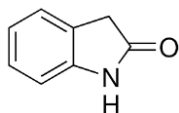
Εικόνα 1.4 Χημική δομή πρόσμιξης C

[2-[(2,6-dichlorophenyl)amino]phenyl]methanol



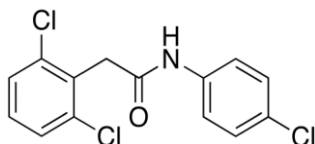
Εικόνα 1.5 Χημική δομή πρόσμιξης D

[2-[(2-bromo-6-chlorophenyl)amino]phenyl]acetic acid



Εικόνα 1.6 Χημική δομή πρόσμιξης E

1,3-dihydro-2*H*-indol-2-one



Εικόνα 1.7 Χημική δομή πρόσμιξης F

N-(4-chlorophenyl)-2-(2,6-dichlorophenyl)acetamide

1.4 Θεραπευτικές Ενδείξεις - Μηχανισμός Δράσης

Η δικλοφαινάκη έχει αντιφλεγμονώδεις, αναλγητικές και αντιπυρετικές ιδιότητες. Ενδείκνυται για την αντιμετώπιση οξέων ή χρόνιων επώδυνων καταστάσεων. Χρησιμοποιείται ως συμπτωματική θεραπεία σε χρόνιες ρευματικές παθήσεις, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η οστεοαρθρίτιδα και η αγκυλωτική σπονδυλοαρθρίτιδα. Χορηγείται επίσης σε καταστάσεις οξείας ημικρανίας και στην πρωτοπαθή δυσμηνόρροια [8].

Η δικλοφαινάκη ανήκει στην κατηγορία των ΜΣΑΦ τα οποία επιδρούν στην οδό της κυκλοοξυγενάσης, αναστέλλοντας τα ένζυμα κυκλοοξυγενάση-1 (COX-1) και κυκλοοξυγενάση-2 (COX-2). Η σύνδεσή της στα ισοένζυμα της κυκλοοξυγενάσης παρεμποδίζει τη σύνθεση των προστανοειδών (προσταγλανδίνες PGE₂, PGD₂, PGF₂, προστακυκλίνη PGI₂ και θρομβοξάνη TXA₂). Η προσταγλανδίνη PGE₂ είναι εκείνη που κυριαρχεί σε περιπτώσεις φλεγμονής, επομένως η αναστολή της σύνθεσής της από τη δικλοφαινάκη θεωρείται ότι είναι ο κύριος μηχανισμός για την εκδήλωση της αναλγητικής και αντιφλεγμονώδους δράσης του φαρμάκου αυτού. Παρόλο που η δικλοφαινάκη ανήκει στα παραδοσιακά ΜΣΑΦ και όχι στους εκλεκτικούς αναστολείς

της COX-2, φαίνεται να εμφανίζει μεγαλύτερη εκλεκτικότητα για την COX-2 σε σχέση με την COX-1. Σε κάποιες περιπτώσεις η εκλεκτικότητα αυτή πιθανώς να σχετίζεται με το μέγεθος της δόσης [8].

Η δικλοφαινάκη κυκλοφορεί σε διάφορες φαρμακοτεχνικές μορφές, όπως εντεροδιαλυτά δισκία, δισκία ελεγχόμενης αποδέσμευσης, καψάκια, κοκκία για πόσιμο διάλυμα, ενέσιμο διάλυμα, υπόθετα, γέλη, δερματικό διάλυμα και έμπλαστρο [8].

1.5 Φαρμακοκινητικές Ιδιότητες

1.5.1 Απορρόφηση

Έπειτα από του στόματος χορήγηση, η απορρόφηση της δικλοφαινάκης είναι ταχεία και ανάλογη της χορηγούμενης δόσης. Ο βαθμός απορρόφησης εξαρτάται από τη μορφή του άλατος στην οποία βρίσκεται η δικλοφαινάκη, από τη σύσταση και τη φαρμακοτεχνική μορφή του σκευάσματος και από τον χρόνο λήψης της σε σχέση με τη λήψη τροφής. Η μέγιστη συγκέντρωσή της στο πλάσμα, καθώς και ο χρόνος κατά τον οποίο αυτή επιτυγχάνεται μπορεί να ποικίλλουν. Αυτό οφείλεται στις διαφορές που υπάρχουν στο pH του γαστρικού υγρού κάθε ατόμου, στον διαφορετικό χρόνο γαστρικής κένωσης και σε διαφορές στην εντεροηπατική κυκλοφορία. Λόγω του μεταβολισμού της πρώτης δόσης, περίπου το 60% της χορηγούμενης δόσης δικλοφαινάκης φτάνει στη συστηματική κυκλοφορία [8]. Έπειτα από λήψη εντεροδιαλυτού δισκίου 50 mg δικλοφαινάκης, η μέση μέγιστη συγκέντρωση (C_{max}) επιτυγχάνεται σε περίπου 2 ώρες [11].

1.5.2 Κατανομή

Η δικλοφαινάκη δεσμεύεται στις πρωτεΐνες του πλάσματος, κυρίως στη λευκωματίνη, σε ποσοστό μεγαλύτερο από 99% [8, 11]. Ο φαινόμενος όγκος κατανομής είναι 0,12-0,17 L/Kg [12]. Εκτός από τη συστηματική κυκλοφορία, η δικλοφαινάκη εισέρχεται στο αρθρικό υγρό, όπου τελικά τα επίπεδα συγκέντρωσής της φτάνουν σε επίπεδα μεγαλύτερα από εκείνα του πλάσματος και διατηρούνται για περισσότερο χρονικό διάστημα, παρόλο που η συγκέντρωση στο πλάσμα αρχίζει να μειώνεται. Η νατριούχος δικλοφαινάκη μπορεί να ανιχνευτεί στο αρθρικό υγρό 11 ώρες έπειτα από χορήγηση εντεροδιαλυτού δισκίου 50 mg και έως 25 ώρες έπειτα από χορήγηση δισκίου παρατεταμένης αποδέσμευσης 100 mg [8]. Η δικλοφαινάκη εντοπίζεται στο αρθρικό υγρό 2 ώρες έπειτα από του στόματος χορήγηση, ενώ μετά από 4 ώρες οι τιμές συγκέντρωσής της στο αρθρικό υγρό είναι μεγαλύτερες από αυτές στο πλάσμα. Ο

χρόνος ημίσειας ζωής της δικλοφαινάκης στο πλάσμα είναι 1-2 ώρες, ενώ στο αρθρικό υγρό 3-6 ώρες [11].

1.5.3 Μεταβολισμός

Η βιομετατροπή της δικλοφαινάκης γίνεται κυρίως με μονή ή πολλαπλή υδροξυλίωση και μεθοξυλίωση και οι μεταβολίτες που προκύπτουν είναι οι εξής: 3'-υδροξυδικλοφαινάκη, 4'-υδροξυδικλοφαινάκη, 5-υδροξυδικλοφαινάκη, 4',5-διυδροξυδικλοφαινάκη και 3'-υδροξυ-4'-μεθοξυδικλοφαινάκη. Οι μεταβολίτες αυτοί, καθώς και η δικλοφαινάκη που δεν έχει υποστεί βιομετατροπή, υπόκεινται κυρίως σε σύζευξη με γλυκουρονίδια [12]. Ο κύριος μεταβολίτης, η 4'-υδροξυδικλοφαινάκη, φαίνεται να διατηρεί σε μικρό βαθμό τις αντιφλεγμονώδεις και αναλγητικές ιδιότητες [8].

1.5.4 Απέκκριση

Έπειτα από του στόματος χορήγηση της δικλοφαινάκης, το 60% περίπου της χορηγούμενης δόσης απεκκρίνεται στα ούρα ως συζευγμένα γλυκουρονίδια δικλοφαινάκης και των μεταβολιτών της, ενώ το υπόλοιπο μέσω της χολής στα κόπρανα. Περίπου 1% της χορηγούμενης δόσης απεκκρίνεται αμετάβλητο στα ούρα [12].

1.6 Ανεπιθύμητες Ενέργειες

Οι πιο συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες, έπειτα από του στόματος χορήγηση δικλοφαινάκης, και γενικότερα μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων, προέρχονται από το γαστρεντερικό σύστημα. Οι ανεπιθύμητες αυτές ενέργειες είναι αποτέλεσμα της αναστολής της COX-1 και συνεπώς της αναστολής της σύνθεσης των προσταγλανδινών, οι οποίες φυσιολογικά αναστέλλουν την έκκριση του γαστρικού οξέος και προστατεύουν τον γαστρικό βλεννογόνο [3, 8]. Ο κίνδυνος εμφάνισης γαστρεντερικών διαταραχών μειώνεται όταν η δικλοφαινάκη χορηγείται σε χαμηλές δόσεις (≤ 75 mg ημερησίως) [8]. Οι πιο συχνές γαστρεντερικές διαταραχές που εμφανίζονται είναι δυσπεψία, ναυτία, έμετος και διάρροια, ενώ πιο σπάνια μπορεί να προκύψει γαστρική αιμορραγία και εξέλκωση [3]. Ανεπιθύμητες ενέργειες στους νεφρούς μπορεί να εμφανιστούν κυρίως σε ευπαθείς ομάδες με την πρόκληση οξείας νεφρικής ανεπάρκειας, η οποία όμως είναι αναστρέψιμη. Επίσης, μπορεί να εμφανιστούν ηπατικές διαταραχές, δερματικές αντιδράσεις και πρόκληση ή επιδείνωση του βρογχόσπασμου σε ασθματικούς ασθενείς [3]. Ο κίνδυνος για εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών από το καρδιαγγειακό σύστημα, όπως θρομβωτικά επεισόδια,

οφείλονται στην αναστολή της COX-2 και παρατηρούνται έπειτα από λήψη μεγάλων δόσεων δικλοφαινάκης (≥ 150 mg ημερησίως), επομένως περιορίζονται με τη μείωση της χορηγούμενης δόσης [8].

1.7 Τοπική χορήγηση νατριούχου δικλοφαινάκης

Παρά την αποτελεσματικότητα των ΜΣΑΦ, συμπεριλαμβανομένης της δικλοφαινάκης, η εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών έπειτα από την απορρόφησή τους από τη συστηματική κυκλοφορία, αποτελεί περιοριστικό παράγοντα στη χρήση τους. Έτσι, υπήρξε η ανάγκη για ανάπτυξη σκευασμάτων για τοπική χορήγηση, τα οποία θα είχαν μειωμένη συστηματική απορρόφηση και θα εμφάνιζαν λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες. Τα σκευάσματα αυτά εφαρμόζονται τοπικά στην πάσχουσα περιοχή, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται ικανοποιητικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου στους ιστούς-στόχους, χωρίς όμως, τα επίπεδα συγκεντρώσεων στη συστηματική κυκλοφορία να είναι τόσο υψηλά, όσο έπειτα από την από του στόματος χορήγηση του φαρμάκου. Ένα φάρμακο, για να διέλθει μέσω της επιδερμίδας και να φθάσει στο σημείο δράσης του, θα πρέπει να διαθέτει ορισμένες ιδιότητες, όπως υδροφιλικές, αλλά και υδροφοβικές ιδιότητες και το μοριακό του βάρος να είναι < 500 Da [13]. Η δικλοφαινάκη, ως ασθενές οργανικό οξύ, διαθέτει λιποφιλικές ιδιότητες, ενώ τα άλατά της είναι υδατοδιαλυτά σε ουδέτερο pH. Επομένως, είναι δυνατή η διείσδυσή της μέσω της επιδερμίδας και έτσι αναπτύχθηκαν διάφορα σκευάσματα για τοπική χορήγηση, όπως η γέλη νατριούχου δικλοφαινάκης 1% και τα δερματικά διαλύματα νατριούχου δικλοφαινάκης 1,5% και 2%. Η νατριούχος δικλοφαινάκη αποτελεί το μοναδικό μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο, το οποίο έχει λάβει έγκριση από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) των ΗΠΑ, για τοπική χρήση σε ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα. Χαρακτηριστικά αναφέρεται το δερματικό διάλυμα νατριούχου δικλοφαινάκης 1,5%, το οποίο ενδείκνυται για την ανακούφιση των συμπτωμάτων στην οστεοαρθρίτιδα του γόνατος. Τα ΜΣΑΦ, τα οποία χορηγούνται τοπικά, επιτυγχάνουν 3-5% της συνολικής συστηματικής απορρόφησης που επιτυγχάνεται έπειτα από του στόματος χορήγηση της δικλοφαινάκης [8]. Η φαρμακοτεχνική μορφή και η σύσταση των τοπικών σκευασμάτων των ΜΣΑΦ, όπως επίσης το δέρμα του ασθενούς και η ανατομική θέση, στην οποία γίνεται η τοπική εφαρμογή, μπορεί να επηρεάσουν την απορρόφηση και τη διείσδυση του φαρμάκου μέσω του δέρματος. Από μελέτες σε διάφορα τοπικά σκευάσματα, προκύπτει ότι παρατηρούνται χαμηλότερες συγκεντρώσεις στο πλάσμα και στο αρθρικό υγρό, σε σχέση με την από του στόματος

χορήγηση του φαρμάκου. Παρ' όλα αυτά, φαίνεται ότι οι συγκεντρώσεις των ΜΣΑΦ στο χόριο του δέρματος, στον σκελετικό μυ, στον αρθρικό υμένα και στον αρθρικό χόνδρο, κοντά στο σημείο όπου γίνεται η τοπική εφαρμογή, είναι ικανοποιητικές ώστε να προσφέρουν ανακούφιση από τα συμπτώματα για τα οποία προορίζονται [13]. Όσον αφορά τα επίπεδα συγκέντρωσης στο πλάσμα, έπειτα από τοπική χορήγηση δικλοφαινάκης, από μελέτες που έχουν γίνει, φαίνεται ότι επιτυγχάνεται το 0,4-2,2% της μέγιστης συγκέντρωσης ορού του αίματος που επιτυγχάνεται με την από του στόματος χορήγηση της [14]. Για την καλύτερη διείσδυση του φαρμάκου μέσω της επιδερμίδας, χρησιμοποιούνται διάφορες ουσίες, γνωστές ως ενισχυτές διαπερατότητας, όπως το διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethyl sulphoxide, DMSO). Έτσι, η τοπική εφαρμογή δερματικού διαλύματος νατριούχου δικλοφαινάκης 1,5% w/w με 45,5% w/w DMSO, σε μελέτη που έγινε, διαπιστώθηκε ότι παρέχει παρατεταμένη διείσδυση του φαρμάκου μέσω του δέρματος, με τη μέγιστη συγκέντρωση να εμφανίζεται κατά μέσο όρο 30 ώρες μετά την εφαρμογή και χωρίς τις υψηλές συγκεντρώσεις που εμφανίζονται στο πλάσμα μετά τη λήψη δισκίων δικλοφαινάκης [13]. Τα τοπικά σκευάσματα δικλοφαινάκης ανακουφίζουν τον πόνο, ο οποίος σχετίζεται με την οστεοαρθρίτιδα. Η γέλη νατριούχου δικλοφαινάκης 1% ενδείκνυται για τη συμπτωματική θεραπεία οστεοαρθρίτιδας των αρθρώσεων, όπως τα γόνατα και τα χέρια, ενώ τα έμπλαστρα δικλοφαινάκης ενδείκνυται για την αντιμετώπιση του οξέος πόνου έπειτα από τραυματισμούς, όπως διαστρέμματα, εξάρθρωσεις ή θλάσεις. Το δερματικό διάλυμα νατριούχου δικλοφαινάκης 1,5% w/w ενδείκνυται για την ανακούφιση του πόνου σε οστεοαρθρίτιδα γόνατος, βελτιώνοντας τη φυσική λειτουργία και την ακαμψία. Η αποτελεσματικότητα των σκευασμάτων δικλοφαινάκης για τοπική χορήγηση έχει αποδειχθεί από πολλές μελέτες, ενώ θεωρείται ισάξια με την αποτελεσματικότητα που προσφέρουν τα σκευάσματα που χορηγούνται από το στόμα. Το πλεονέκτημά τους είναι η εμφάνιση λιγότερων και μικρότερης σημασίας ανεπιθύμητων ενεργειών και για το λόγο αυτό προτιμάται η χρήση τους, κυρίως σε ασθενείς μεγάλης ηλικίας ή σε ασθενείς οι οποίοι έχουν αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση καρδιαγγειακών, γαστρεντερικών ή νεφρικών παρενεργειών [14]. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες των τοπικών σκευασμάτων είναι κυρίως δερματικές αντιδράσεις, όπως η εμφάνιση εξανθήματος, κνησμού ή ξηρότητας του δέρματος. Η ξηρότητα του δέρματος εμφανίζεται σε μεγαλύτερο βαθμό από τη χρήση δερματικών διαλυμάτων λόγω της περιεκτικότητάς τους σε DMSO. Οι παρενέργειες που οφείλονται στη συστηματική απορρόφηση της δικλοφαινάκης εμφανίζονται σε πολύ

μικρότερο βαθμό και σε ηπιότερη μορφή σε σχέση με την από του στόματος χορήγηση [13, 15].

1.8 Μέθοδοι προσδιορισμού δικλοφαινάκης

Στο υποκεφάλαιο αυτό, αναφέρονται αντιπροσωπευτικές μέθοδοι προσδιορισμού νατριούχου δικλοφαινάκης που έχουν δημοσιευθεί στη διεθνή βιβλιογραφία. Πρόκειται για μία δραστική ουσία, η οποία λόγω της διαδεδομένης χρήσης της, έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό και έχει προσδιοριστεί με διάφορων ειδών τεχνικές, ενώ μεγάλος αριθμός των μεθόδων προσδιορισμού της αφορά την τεχνική της HPLC αντίστροφης φάσης.

Χαρακτηριστικά αναφέρονται:

- Βολταμμετρικές μέθοδοι σε φαρμακευτικά σκευάσματα [16, 17] και σε δείγματα ούρων [17]
- TLC πυκνομετρία (TLC densitometry) σε δισκία [18]
- GC-MS σε πλάσμα αίματος [16, 19, 20]
- Ανοσοχημικές μέθοδοι [21]
- Τριχοειδής ισοταχοφόρηση – φασματομετρία μαζών (capillary isotachopheresis-ESI-MS) σε ύδατα [22] και τριχοειδής ηλεκτροφόρηση σε φαρμακευτικά σκευάσματα (capillary zone electrophoresis) [23]
- Ποτενσιομετρικές μέθοδοι σε φαρμακευτικά σκευάσματα [24, 25] και δείγματα ούρων [24]
- Φασματοφωτομετρία σε πρώτες ύλες και φαρμακευτικά σκευάσματα [26 – 28]
- Φασματοσκοπία Raman (FT-Raman Spectroscopy) σε δισκία και καψάκια [29]

Πίνακας 1.1 Μέθοδοι προσδιορισμού νατριούχου δικλοφαινάκης με την τεχνική HPLC και LC-MS

Τεχνική	Υπόστρωμα	Στήλη	Είδος έκλουσης	Κινητή φάση	Χρωματογρ. συνθήκες	t _R (min)	Έτος	Αναφορά
RP-HPLC-UV PDA	Νανο-Γέλη	Grace Smart C ₁₈ (250×4,6 mm, 5 μm)	Ισοκρατική	Ακετονιτρίλιο:0,05 M δισόξινο φωσφορικό νάτριο (pH=2,5 ρύθμιση με αραιό διάλυμα OPA ^a) 50:50 v/v	1,5 mL/min 281 nm 20 μL	4,0	2016	[30]
LC-MS-MS	Πλάσμα αίματος	Zorbax XDB phenyl column (75×4,6 mm, 3,5 μm)	Ισοκρατική	Ακετονιτρίλιο : 0,2 % οξικό οξύ σε νερό 80:20 v/v	1,0 mL/min 15 μL	1,12	2015	[31]
RP-HPLC-UV PDA	Υπόθετα	Phenomenex C ₁₈ (25 cm×4,6 mm, 5 μm)	Ισοκρατική	Ακετονιτρίλιο:ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου ορθοφωσφορικού καλίου (pH=3,0) 60:40 v/v	1,0 mL/min 254 nm	5,91	2014	[32]
RP-HPLC-UV	Πλάσμα αίματος	Synchroback RP (250×4,6 mm)	Ισοκρατική	Ακετονιτρίλιο:νερό (pH=4,0) 65:35 v/v	1,5 mL/min 278 nm	3,4	2014	[33]
UPLC-UV PDA	Σκεύασμα	Acquity® UPLC BEH C ₁₈ (2,1×50 mm, 1,7 μm)	Ισοκρατική	Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου 0,05 M (pH=2,5) : ακετονιτρίλιο 50:50 v/v	0,5 mL/min 254 nm 1,0 μL 50 °C	0,94	2014	[34]
HPLC-DAD	Υπόθετα	Zorbax SB- C ₈ (4,6×250 mm, 5 μm)	Ισοκρατική	0,05 M φωσφορικό οξύ: ακετονιτρίλιο: μεθανόλη 40:48:12 v/v/v	1,0 mL/min 228 nm 20 μL	9,5	2013	[35]

RP-HPLC-UV	Γέλη	RP-LiChrospher select B C ₈ (125 cm×3 mm, 5 μm)	Ισοκρατική	Μεθανόλη: Υδατικό διάλυμα ο-φωσφορικού οξέος και 0,05 M τριαιθυλαμίνης, pH=2,8 63:37 v/v	0,8 mL/min 220 nm 20 μL	5,5	2012	[36]
RP-HPLC-UV	Καψάκια	Phenomenex C ₁₈ (250×4,6 mm, 5 μm)	Ισοκρατική	Νερό:Μεθανόλη 10:90 v/v	1,0 mL/min 301 nm	5,31	2012	[37]
SBSE ^β -HPLC-UV	Ούρα	SunFire™ C ₁₈ (4,6×150 mm, 5μm)	Ισοκρατική	Ακετονιτρίλιο: Μεθανόλη: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,01 M (pH=4,1) 40:10:50 v/v/v	1,0 mL/min 281 nm 20 μL 20±2 °C	6,3	2011	[38]
RP-HPLC-UV	Δισκία	Intersite RP ODS C ₁₈ (4,6 mm×2,5 cm)	Ισοκρατική	Ακετονιτρίλιο: Μεθανόλη 90:10 v/v	1,0 mL/min 254 nm 20 μL	3,9	2011	[39]
LC-MS-MS	Πλάσμα αίματος	Gemini NX C ₁₈ (50×2,0 mm, 3 μm)	Ισοκρατική	0,2% οξικό οξύ σε νερό: Ακετονιτρίλιο 47:53 v/v	0,6 mL/min 5 μL 45 °C	1,3	2011	[40]
RP-HPLC-UV	Καψάκια	BDS Hypersil C ₈ (250×4,6 mm, 5 μm)	Ισοκρατική	Ακετονιτρίλιο:ρυθμιστικό διάλυμα τριαιθυλαμίνης, pH=5,0 (ρύθμιση με φωσφορικό οξύ) 50:50 v/v	2,0 mL/min 284 nm 10 μL	3,3	2010	[41]
HPLC-UV	Δισκία	Zorbax SB C ₁₈ (150×4,6 mm)	Ισοκρατική	Μεθανόλη:Νερό 60:40 v/v	1,0 mL/min 278 nm	2,73	2008	[42]

RP-HPLC- UV	Πλάσμα αίματος	μ-bondapack C ₁₈ (150 cm×4,6 mm)	Ισοκρατική	Ακετονιτρίλιο:νερό:ορθοφωσφορικό οξύ 45:54,5:0,5 v/v/v pH=3,5	1,0 mL/min 276 nm	7,9	2007	[43]
----------------	-------------------	---	------------	---	----------------------	-----	------	------

^α OPA: Ortho-phosphoric acid

^β SBSE: Stir bar sorptive extraction

2. ΘΕΙΟΚΟΛΧΙΚΟΣΙΔΗΣ

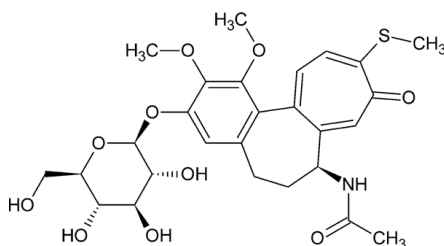
2.1 Μυοχαλαρωτικά σκελετικών μυών

Τα μυοχαλαρωτικά φάρμακα διακρίνονται σε δύο θεραπευτικές κατηγορίες: σε εκείνα που χρησιμοποιούνται βοηθητικά κατά τη γενική αναισθησία σε χειρουργικές επεμβάσεις, προκαλώντας μυϊκή χαλάρωση και διευκολύνοντας τη διασωλήνωση και σε εκείνα που μειώνουν τον μυϊκό σπασμό σε επώδυνες καταστάσεις, όπως η οσφυαλγία και η ισχιαλγία. Τα τελευταία, στα οποία ανήκει και ο θειοκολχικοσίδης, δρουν κεντρικά στο ΚΝΣ και είναι επίσης γνωστά ως κεντρικώς δρώντα μυοχαλαρωτικά φάρμακα. Ο μηχανισμός δράσης των φαρμάκων αυτής της κατηγορίας ποικίλλει, ενώ δεν είναι πλήρως κατανοητός για όλα τα φάρμακα. Εκτός από την ανακούφιση των επώδυνων μυϊκών σπασμών, ορισμένα κεντρικώς δρώντα μυοχαλαρωτικά φάρμακα μειώνουν τη σπαστικότητα που προέρχεται από βλάβες του νωτιαίου μυελού, πολλαπλή σκλήρυνση ή εγκεφαλική παράλυση [44].

2.2 Θειοκολχικοσίδης

2.2.1 Χημική δομή – Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά

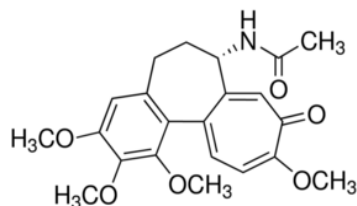
Ο θειοκολχικοσίδης είναι ένα ημισυνθετικό θειοπαράγωγο του κολχικοσίδη, ενός φυσικού γλυκοσίδη, ο οποίος συναντάται στα φυτά *Gloriosa superba* και *Colchicum autumnale*. Ανήκει στην κατηγορία των μυοχαλαρωτικών φαρμάκων, που δρουν ως μυοχαλαρωτικά των σκελετικών μυών κεντρικά στο ΚΝΣ [45, 46]. Ο χημικός τύπος της ένωσης είναι $C_{27}H_{33}NO_{10}S$, ενώ η ονομασία «θειοκολχικοσίδης» αποτελεί την κοινόχρηστη ονομασία για το N-[(7S)-1,2-διμεθοξυ-10-μεθυλοσουλφανυλ-9-οξο-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-τριυδροξυ-6-(υδροξυμεθυλ)οξαν-2-υλ]οξυ-6,7-διυδρο-5H-βενζο[α]επταλεν-7-υλ]ακεταμίδιο. Η σχετική μοριακή μάζα ισούται με 563,62 [47]. Αποτελεί μία κίτρινη κρυσταλλική σκόνη [46].



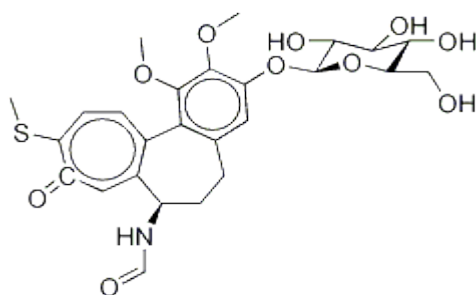
Εικόνα 2.1 Χημική δομή θειοκολχικοσίδη

2.2.2 Προσμίξεις

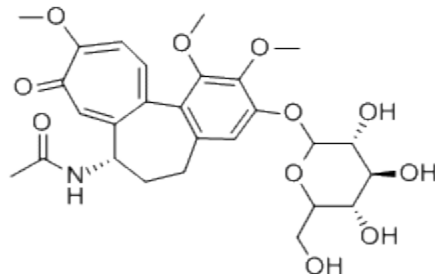
Ορισμένες από τις γνωστές προσμίξεις του θειοκολχικοσίδη είναι οι παρακάτω:



Εικόνα 2.2 Χημική δομή πρόσμιξης colchicine



Εικόνα 2.3 Χημική δομή πρόσμιξης N-Desacetyl-N-formyl thiocolchicoside



Εικόνα 2.4 Χημική δομή πρόσμιξης colchicoside

2.3 Θεραπευτικές ενδείξεις – Μηχανισμός δράσης

Ο θειοκολχικοσίδης χρησιμοποιείται για τη συμπτωματική ανακούφιση επώδυνων μυϊκών σπασμών, οι οποίοι σχετίζονται με τραυματικές βλάβες των μυών ή με ρευματικές και νευρολογικές παθήσεις. Εκτός από τις μυοχαλαρωτικές του ιδιότητες, ο θειοκολχικοσίδης παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη και αναλγητική δράση [45]. Είναι αποτελεσματικός σε περιπτώσεις ισχιαλγίας, οσφυαλγίας, αυχενοβραχιόνιας νευραλγίας και σπαστικού ραιβόκρανου [46]. Ωστόσο, η Επιτροπή για τα Φαρμακευτικά Προϊόντα Ανθρώπινης Χρήσης (CHMP) του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Φαρμάκων (ΕΜΕΑ), έπειτα από ανησυχία ότι η χρήση του θειοκολχικοσίδη μπορεί να

σχετίζεται με ανευπλοειδία και ύστερα από κλινικές μελέτες που διενεργήθηκαν, αποφάσισε τον περιορισμό στη χρήση του, τόσο όσον αφορά στις εγκεκριμένες χρήσεις του, όσο και στον χρόνο λήψης του. Έτσι, ο θειοκολχικοσίδης ενδείκνυται πλέον μόνο ως επικουρική θεραπεία για την αντιμετώπιση επώδυνων μυϊκών συσπάσεων σε περιπτώσεις οξείας σπονδυλικής παθολογίας, σε ενήλικες και εφήβους 16 ετών και άνω. Περιορισμοί υπάρχουν και στη δοσολογία αναλόγως του τρόπου χορήγησης. Για από του στόματος χορήγηση, η συνιστώμενη και μέγιστη επιτρεπόμενη δόση είναι 8 mg κάθε 12 ώρες και όχι για περισσότερες από 7 συνεχόμενες ημέρες. Για ενδομυϊκή χορήγηση, η συνιστώμενη και μέγιστη επιτρεπόμενη δόση είναι 4 mg κάθε 12 ώρες και όχι για περισσότερες από 5 συνεχόμενες ημέρες [45, 49]. Οι περιορισμοί αυτοί δεν ισχύουν για σκευάσματα τοπικής εφαρμογής, καθώς στις περιπτώσεις αυτές ο μεταβολίτης του θειοκολχικοσίδη, ο οποίος φαίνεται να είναι υπεύθυνος για την ανευπλοειδία, δεν παράγεται σε μεγάλο βαθμό [45]. Όσον αφορά τον μηχανισμό δράσης του θειοκολχικοσίδη, δεν έχει διασαφηνιστεί πλήρως το πού οφείλονται οι μυοχαλαρωτικές του ιδιότητες. Ο θειοκολχικοσίδης θεωρείται πλέον ότι δρα ως ανταγωνιστής του GABA_A υποδοχέα, σε αντίθεση με παλαιότερες μελέτες που υποστήριζαν την αγωνιστική του δράση ως προς τον υποδοχέα αυτό. Βέβαια, η ανταγωνιστική δράση ως προς τον υποδοχέα GABA_A, δε μπορεί να εξηγήσει τη μυοχαλαρωτική δράση του θειοκολχικοσίδη, η οποία πιθανώς να οφείλεται στην αλληλεπίδρασή του με τους υποδοχείς γλυκίνης [45, 48].

2.4 Ανεπιθύμητες Ενέργειες

Αναφυλακτικές αντιδράσεις, όπως κνησμός, κνίδωση και αγγειοοίδημα, καθώς και αναφυλακτική καταπληξία έχουν αναφερθεί έπειτα από ενδομυϊκή χορήγηση θειοκολχικοσίδη. Επίσης, υπνηλία και λιποθυμία, η οποία συνήθως παρουσιάζεται τα επόμενα λεπτά έπειτα από την ενδομυϊκή ένεση. Ακόμα, μπορεί να παρουσιαστούν παρενέργειες, όπως διάρροια, επιγαστραλγία, ναυτία, έμετος, ζάλη και δερματικές αλλεργικές αντιδράσεις. Οι ανεπιθύμητες αυτές ενέργειες ποικίλλουν, τόσο ως προς τη συχνότητα εμφάνισής τους, όσο και ως προς την έντασή τους. Κάποιες από αυτές μπορούν να εξαλειφθούν χωρίς ιατρική παρέμβαση [45].

2.5 Ειδικές προφυλάξεις – Θέματα ασφαλείας

Λόγω του ότι η χρήση του θειοκολχικοσίδη έχει συσχετιστεί σε κάποιες έρευνες με την εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων, η χρήση του θα πρέπει να αποφεύγεται σε ασθενείς που έχουν παρουσιάσει κάποια επιληπτική κρίση στο παρελθόν [45].

Τα τελευταία χρόνια υπήρξε μία μεγάλη ανησυχία, σχετικά με το εάν η ανευπλοειδία μπορεί να προκληθεί από έναν μεταβολίτη του θειοκολχικοσίδη και έτσι ακολούθησε μία σειρά μελετών, ώστε να επαναπροσδιοριστεί η σχέση οφέλους – κινδύνου από τη χρήση των φαρμακευτικών σκευασμάτων που περιέχουν τη δραστική αυτή ουσία. Η ανευπλοειδία είναι μία χρωμοσωμική ανωμαλία, όπου υπάρχει μεταβολή του αριθμού των χρωμοσωμάτων (υπάρχει ένα επιπλέον ή ένα λιγότερο χρωμόσωμα). Αποτελεί παράγοντα κινδύνου για εμφάνιση καρκίνου, τερατογένεσης, εμβρυϊκής τοξικότητας και αυτόματων αποβολών, καθώς και μειωμένης γονιμότητας στους άνδρες. Στις μελέτες που διενεργήθηκαν και με βάση τις οποίες η CHMP επανεξέτασε το θέμα ασφαλείας του θειοκολχικοσίδη, εξετάστηκε η γονοτοξικότητα της ίδιας της δραστικής ουσίας και των μεταβολιτών της. Δύο είναι οι μεταβολίτες του θειοκολχικοσίδη: η 3-Ο-γλυκουρονιδική αγλυκόνη (M1 ή SL18.0740), η οποία αποτελεί το βασικό και δραστικό μεταβολίτη του, και ο αγλυκονικός μεταβολίτης 3-διμεθυλοθειοκολχικίνη (M2 ή SL59.0955). Ο θειοκολχικοσίδης, σύμφωνα με τις φαρμακοκινητικές του ιδιότητες, έπειτα από χορήγηση από το στόμα δεν ανιχνεύεται στο πλάσμα. Αυτό συμβαίνει διότι μεταβολίζεται από το έντερο στον μεταβολίτη M2. Ο βασικός μεταβολίτης M1, στον οποίο οφείλεται η φαρμακολογική του δράση, προκύπτει έπειτα από γλυκουρονιδίωση του μεταβολίτη M2. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις των δύο μεταβολιτών στο πλάσμα εμφανίζονται έπειτα από περίπου μία ώρα από την από του στόματος χορήγηση του θειοκολχικοσίδη, ενώ αποβάλλονται από τα κόπρανα κυρίως, και από τα ούρα.

Τα αποτελέσματα των μελετών για τον μεταβολίτη M1 έδειξαν ότι δεν προκαλεί μεταλλάξεις στα γονίδια, ούτε δομικές βλάβες στα χρωμοσώματα. Μπορεί, ωστόσο, να προκαλέσει μεταβολή στον αριθμό των χρωμοσωμάτων, δηλαδή ανευπλοειδία. Αυτό, όμως, μπορεί να συμβεί εάν ο ανθρώπινος οργανισμός εκτεθεί σε κατά πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του μεταβολίτη M1, από αυτές που επιτυγχάνονται μετά από του στόματος χορήγηση 8 mg δύο φορές την ημέρα. Επομένως, όσον αφορά τον μεταβολίτη M1 κρίθηκε ότι δεν μπορεί να προκαλέσει ανευπλοειδία και έτσι δεν τίθεται θέμα ασφαλείας από τη χρήση των σκευασμάτων που περιέχουν θειοκολχικοσίδη [45, 49]. Για το μεταβολίτη M2 τα αποτελέσματα ήταν διαφορετικά. Έπειτα από τις μελέτες που έγιναν, η CHMP κατέληξε στο συμπέρασμα ότι σε συγκεντρώσεις τετραπλάσιες από αυτές που επιτυγχάνονται στο πλάσμα μετά τη χορήγηση 8 mg θειοκολχικοσίδη δύο φορές την ημέρα από το στόμα, μπορεί δυνητικά

να προκληθεί ανευπλοειδία. Από τις μελέτες αυτές δεν ήταν δυνατό να τεκμηριωθεί το επίπεδο δόσης όπου δεν προκαλείται ανευπλοειδία, οπότε δε μπορεί να αποκλειστεί ένας δυνητικός κίνδυνος για τον ανθρώπινο οργανισμό. Επίσης, μελετήθηκαν αναφορές περιστατικών από τη βάση δεδομένων της φαρμακοεπαγρύπνησης. Υπήρξαν αναφορές περιστατικών, όπου η έκθεση στον θειοκολχικοσίδη κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης προκάλεσε ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως εμφάνιση συγγενών ανωμαλιών, τερατογένεσης και αυτόματων αποβολών. Ο αριθμός των περιστατικών αυτών ήταν περιορισμένος, γεγονός το οποίο ενδεχομένως να οφείλεται στο ότι η χρήση του φαρμάκου αυτού αντενδείκνυται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Παρόλο που η ανευπλοειδία αποτελεί ένα συνηθισμένο χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων, δεν έχει αποδειχθεί αν συμβάλλει σε αυτή την εξέλιξη ή αν είναι αποτέλεσμά της. Επίσης, δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία για το συσχετισμό της χρήσης του θειοκολχικοσίδη με την εμφάνιση καρκίνου. Έτσι, η CHMP έκρινε ότι από τις αναφορές των περιστατικών δεν μπορούν να εξαχθούν βέβαια αποτελέσματα [49].

Κρίνοντας συνολικά τις μελέτες που διενεργήθηκαν, καθώς και τις αναφορές των περιστατικών, η CHMP καταλήγει στο πόρισμα ότι η ανευπλοειδία και η εμφάνιση καρκίνου, πρέπει να ληφθούν υπόψη ως παράγοντες κινδύνου κατά τη χρήση του θειοκολχικοσίδη. Συνεπώς θέτει κάποιους περιορισμούς στη χρήση του, ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι κίνδυνοι τερατογένεσης, εμβρυικής τοξικότητας, αυτόματων αποβολών, διαταραχής της ανδρικής γονιμότητας και εμφάνισης καρκίνου. Οι περιορισμοί όσον αφορά τη δοσολογία και το διάστημα χορήγησης έχουν αναφερθεί ήδη στο υποκεφάλαιο 2.3, ενώ επίσης αντενδείκνυται η χορήγησή του κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και της γαλουχίας, καθώς και σε γυναίκες που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία και δε χρησιμοποιούν αντισύλληψη [49].

2.6 Μέθοδοι προσδιορισμού θειοκολχικοσίδη

Στο υποκεφάλαιο αυτό, αναφέρονται αντιπροσωπευτικές μέθοδοι προσδιορισμού θειοκολχικοσίδη που έχουν δημοσιευθεί στη διεθνή βιβλιογραφία. Συγκριτικά με τη νατριούχο δικλοφαινάκη, υπάρχουν λιγότερες μέθοδοι προσδιορισμού, γεγονός που υποδεικνύει την ανάγκη για την ανάπτυξη νέων μεθόδων. Οι υπάρχουσες μέθοδοι αφορούν στην πλειοψηφία τους την εφαρμογή της τεχνικής HPLC.

Συγκεκριμένα αναφέρονται:

- TLC πυκνομετρία (TLC densitometry) σε δισκία [50]

- Φασματοφωτομετρία σε φαρμακευτικά σκευάσματα [27, 28, 51]
- ΗPTLC μέθοδος σε φαρμακευτικά σκευάσματα [52]

Ακολουθεί πίνακας στον οποίο παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές μέθοδοι προσδιορισμού του θειοκολχικοσίδη με την τεχνική HPLC.

Πίνακας 2.1 Μέθοδοι προσδιορισμού θειοκολχικισίδης με την τεχνική HPLC

Τεχνική	Υπόστρωμα	Στήλη	Είδος έκλουσης	Κινητή φάση	Χρωματογρ. συνθήκες	R _t (min)	Έτος	Αναφορά
RP-HPLC-UV	Σκεύασμα (υγρό, στερεό)	Synergi™ Polar-RP 80 Å (150×4,6 mm, 4 μm) (Phenomenex)	Βαθμιδωτή	A: ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 20 mM, pH=5,0 B: MeOH:CH ₃ CN (20:80 v/v)	1,0 mL/min 254 nm 20 μL	7,7	2017	[53]
RP-HPLC-UV PDA	Δισκία	Zorbax SB CN (250 mm×4,6 mm, 5μm)	Βαθμιδωτή	A: 5 mM δισόξινο φωσφορικό νάτριο, pH=2,5 B: Μεθανόλη	1,0 mL/min 258 nm 20 μL	5,8	2015	[54]
RP-HPLC-UV	Δισκία	Thermo Hypersil C ₁₈ (4,6 mm×100 mm, 3 μm)	Βαθμιδωτή	A: ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου 0,1 M B: Μεθανόλη	1,0 mL/min 257 nm 20 μL 40 °C	3,24	2014	[55]
RP-HPLC-UV PDA	Δισκία	Waters Symmetry Shilde Rp18 (250×4,6 mm, 5 μm)	Ισοκρατική	Νερό (pH=9,2 ρύθμιση με μονόξινο φωσφορικό κάλιο):μεθανόλη 60:40 v/v	1,0 mL/min 223 nm 10 μL 30 °C	4,99	2014	[56]
RP-HPLC-DAD	Σκεύασμα	Kromasil C ₁₈ (250×4,6 mm, 5 μm)	Βαθμιδωτή	A: 15 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH=3,25 B: Ακετονιτρίλιο	1,1 mL/min 230 nm 35 °C	5,9	2013	[57]
RP-HPLC-UV	Δισκία	BDS Hypersil C ₁₈ (250 mm×4,6 mm, 5μm)	Ισοκρατική	Ρυθμιστικό διάλυμα τριφθοροξικού οξέος (pH=2,6):ακετονιτρίλιο 75:25 v/v	1,5 mL/min 220 nm 20 μL	3,1	2011	[58]

3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

3.1 Ορισμοί

Ως φάρμακο νοείται κάθε ουσία ή συνδυασμός ουσιών που προορίζεται για ανθρώπινη χρήση ή για χρήση σε ζώα και έχει ως σκοπό τη θεραπεία ή την πρόληψη ασθενειών. Επίσης, ως φάρμακο χαρακτηρίζεται κάθε ουσία ή συνδυασμός ουσιών που χορηγείται με σκοπό την ιατρική διάγνωση σε ανθρώπους και την αποκατάσταση, διόρθωση ή τροποποίηση φυσιολογικών λειτουργιών σε ανθρώπους ή ζώα [59].

Ως Διασφάλιση Ποιότητας ορίζεται το σύνολο των οργανωμένων ρυθμίσεων που γίνονται με σκοπό να εξασφαλιστεί ότι τα φαρμακευτικά προϊόντα είναι της απαιτούμενης ποιότητας για το σκοπό για τον οποίο προορίζονται. Οι Κανόνες Καλής Παρασκευής (GMP) αποτελούν το μέρος εκείνο της Διασφάλισης Ποιότητας, με το οποίο εξασφαλίζεται ότι τα προϊόντα παράγονται και ελέγχονται σύμφωνα με τα πρότυπα ποιότητας για τα οποία προορίζονται και όπως απαιτείται από την άδεια κυκλοφορίας και αναφέρονται, τόσο στην ποιότητα, όσο και στον έλεγχο ποιότητας [60].

Ως Έλεγχος Ποιότητας ορίζεται το μέρος των Κανόνων Καλής Παρασκευής που ασχολείται με τη δειγματοληψία, τις προδιαγραφές, τις δοκιμασίες και με την οργάνωση, την τεκμηρίωση και τις διαδικασίες αποδέσμευσης που εξασφαλίζουν ότι εκτελούνται πράγματι οι σχετικές δοκιμασίες και ότι τα υλικά δεν αποδεσμεύονται προς χρήση, ούτε τα προϊόντα διατίθενται προς πώληση ή προμήθεια, μέχρις ότου κριθεί ότι η ποιότητά τους είναι ικανοποιητική [60].

Οι έλεγχοι γίνονται σε δείγματα α' υλών, υλικών συσκευασίας, ενδιάμεσων, χύμα και τελικών προϊόντων. Έτσι, εφαρμόζονται μέθοδοι ελέγχου με σκοπό την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των πρώτων υλών και του τελικού προϊόντος, καθώς ελέγχονται και τα ενδιάμεσα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας. Επίσης, εκτελούνται ειδικές δοκιμασίες, όπως ο έλεγχος στεριότητας, ο έλεγχος πυρετογόνων, ο προσδιορισμός βαρέων μετάλλων, η μελέτη σταθερότητας, βιολογικές διαδικασίες και τοξικολογικοί έλεγχοι [60].

3.2 Έλεγχος περιεκτικότητας πρώτων υλών

Με τον έλεγχο αυτό διαπιστώνεται εάν η πρώτη ύλη περιέχει το δραστικό συστατικό σύμφωνα με τις προδιαγραφές της μονογραφίας. Εάν υπάρχει απόκλιση της περιεκτικότητας της πρώτης ύλης σε δραστική ουσία από τα επιτρεπόμενα όρια, αυτό σημαίνει ότι η καθαρότητα της πρώτης ύλης δεν είναι αποδεκτή ή ότι έχει επέλθει διάσπαση του φαρμάκου. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του δραστικού συστατικού σε πρώτες ύλες γίνεται, είτε με ογκομετρικές τεχνικές (μη υδατικές και υδατικές ογκομετρήσεις) ή με ενόργανες τεχνικές (υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης, φασματοφωτομετρία υπεριώδους, φασματοφωτομετρία ορατού μετά από χαρακτηριστικές αντιδράσεις, αεριοχρωματογραφία για πτητικές ουσίες ή ουσίες που μετατρέπονται σε πτητικές, φθορισμομετρία κ.α.). Για την επιλογή της μεθόδου αξιολογούνται η ακρίβεια και η επαναληψιμότητά της, η απαίτηση για την ύπαρξη χημικών ουσιών αναφοράς, η ικανότητα της μεθόδου να παρέχει πληροφορίες για τα όρια των συγγενών ουσιών (έλεγχος καθαρότητας) και η διαλυτότητα της ουσίας στους διαλύτες που απαιτεί η μέθοδος [60].

3.3 Έλεγχοι καθαρότητας

Οι έλεγχοι αυτοί περιλαμβάνουν δοκιμασίες για την ύπαρξη προσμίξεων σε ένα φάρμακο έτσι, ώστε να διαπιστωθεί η καθαρότητά του. Ως προσμίξεις νοούνται οι ουσίες που προβλέπεται να συνυπάρχουν στην πρώτη ύλη ως υπολείμματα αντιδραστηρίων παρασκευής ή ως παραπροϊόντα, και διακρίνονται σε εκείνες που επιτρέπονται σε ανεκτά όρια και σε εκείνες που η παρουσία τους είναι ανεπίτρεπτη [60]. Οι προσμίξεις των πρώτων υλών διακρίνονται σε οργανικές, ανόργανες και σε υπολείμματα διαλυτών. Οι οργανικές προσμίξεις προέρχονται από την παραγωγική διαδικασία ή εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των πρώτων υλών και μπορεί να είναι γνωστές ή άγνωστες. Οι ανόργανες προσμίξεις μπορεί να είναι αποτέλεσμα της παραγωγικής διαδικασίας και συνήθως είναι γνωστές [61]. Οι διαλύτες είναι ανόργανα ή οργανικά υγρά, τα οποία χρησιμοποιούνται για την παρασκευή διαλυμάτων ή εναιωρημάτων κατά τη σύνθεση των ουσιών ή ως μέσα εκχυλίσεως κατά τα στάδια του διαχωρισμού και του καθαρισμού τους [60, 61]. Εφαρμόζονται οι ακόλουθοι έλεγχοι καθαρότητας [60]:

1. Έλεγχος pH
2. Εμφάνιση διαλύματος
3. Απορρόφηση

4. Ειδική στροφή
5. Οξύτητα
6. Συγγενείς ουσίες
7. Αριθμοί
8. Τέφρα
9. Απώλεια κατά την ξήρανση
10. Βαρέα μέταλλα
11. Έλεγχοι ορίων ανόργανων ιόντων
12. Έλεγχος ορίων υπολειμμάτων διαλυτών

3.4 Έλεγχος τελικού προϊόντος

Σε κάθε παρτίδα προϊόντος εφαρμόζονται ορισμένοι έλεγχοι, ώστε να αξιολογηθεί η ποιότητά της και να κριθεί έτοιμη προς αποδέσμευση. Η λήψη δειγμάτων από κάθε παρτίδα τελικού προϊόντος γίνεται με βάση εγκεκριμένες γραπτές διαδικασίες. Οι έλεγχοι που εφαρμόζονται στο τελικό προϊόν είναι οι εξής:

α) Έλεγχοι γενικών χαρακτηριστικών τελικού προϊόντος: Οι έλεγχοι αυτοί αφορούν τον καθορισμό των μέσων μαζών και των μέγιστων αποκλίσεων, τις μηχανικές, φυσικές και μικροβιολογικές δοκιμασίες και τα φυσικά χαρακτηριστικά (πυκνότητα, pH, δείκτης διαθλάσεως), όπου κρίνονται ως υποχρεωτικοί [60]. Επίσης, ελέγχονται τα ποιοτικά χαρακτηριστικά της φαρμακοτεχνικής μορφής με σκοπό να διαπιστωθεί αν υπάρχει κάποια αλλαγή σε αυτά, όπως για παράδειγμα αλλαγή χρώματος, κατά τη διάρκεια της παραγωγής ή της αποθήκευσης [62].

β) Έλεγχοι ταυτοποίησης: Οι έλεγχοι αυτοί αποσκοπούν στον προσδιορισμό ταυτότητας του δραστικού ή των δραστικών συστατικών και των προσμίξεων που περιλαμβάνονται στο τελικό προϊόν.

Ο έλεγχος ταυτοποίησης γίνεται με επιβεβαίωση:

- Φυσικών ιδιοτήτων: φυσικές σταθερές, σημείο τήξεως, σημείο ζέσεως, δείκτες διαθλάσεως, διαλυτότητα, ειδική στροφική ικανότητα
- Χημικών ιδιοτήτων: χαρακτηριστικές αντιδράσεις χημικών ομάδων, όπως χρωστικές αντιδράσεις και αντιδράσεις κατιόντων ή ανιόντων αλάτων
- Φυσικοχημικών ιδιοτήτων: φάσματα υπεριώδους και υπέρυθρου και ποιοτικά χαρακτηριστικά χρωματογραφιών (παράγοντας απόκρισης, χρόνοι κατακράτησης). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί χρωματογραφία TLC, χάρτη ή HPLC [60].

γ) Ποσοτικός προσδιορισμός δραστικής ουσίας: Ελέγχεται το τελικό προϊόν ως προς την περιεκτικότητά του σε δραστική ουσία. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι η φασματοφωτομετρία υπεριώδους, οι ογκομετρήσεις και η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Η HPLC, λόγω της ειδικότητας που προσφέρει, είναι η μέθοδος που προτιμάται και βρίσκει ευρεία εφαρμογή στον ποσοτικό προσδιορισμό των δραστικών συστατικών [63]. Σε περιπτώσεις που χρησιμοποιείται κάποια μη ειδική μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό, όπως μία ογκομέτρηση, μπορεί να χρησιμοποιηθεί υποστηρικτικά μία άλλη μέθοδος, ώστε να αποδεικνύεται η ειδικότητα. Επίσης, όταν ο προσδιορισμός της δραστικής ουσίας με μία μη ειδική μέθοδο παρεμποδίζεται από την ύπαρξη των εκδόχων ή όταν υπάρχουν πάνω από ένα δραστικά συστατικά στο προϊόν, απαιτείται η εφαρμογή μίας ειδικής μεθόδου, η οποία χαρακτηρίζεται από μεγάλη εκλεκτικότητα [62]. Οι μέγιστες ανεκτές αποκλίσεις της περιεκτικότητας σε δραστικά συστατικά στο τελικό προϊόν δεν επιτρέπεται να υπερβαίνουν το $\pm 5\%$ κατά τη στιγμή της παραγωγής [60].

δ) Ποσοτικός προσδιορισμός προσμίξεων: Σύμφωνα με την διεθνή οδηγία ICH Q3B(R2), ο έλεγχος αυτός αφορά τις προσμίξεις, οι οποίες υπάρχουν στο τελικό φαρμακευτικό σκεύασμα ως προϊόντα αποικοδόμησης της δραστικής ουσίας ή ως προϊόντα αντίδρασης της δραστικής ουσίας με κάποιο έκδοχο ή με τον περιέκτη [64]. Ελέγχονται οι οργανικές προσμίξεις, οι οποίες προκύπτουν από την αποικοδόμηση της δραστικής ουσίας και οι προσμίξεις που προέρχονται από τη διαδικασία παραγωγής του τελικού προϊόντος [62]. Τα προϊόντα αποικοδόμησης διακρίνονται σε εκείνα, τα οποία περιλαμβάνονται στις προδιαγραφές του φαρμακευτικού προϊόντος με συγκεκριμένα κριτήρια αποδοχής (specified degradation products) και μπορεί να είναι είτε γνωστά (identified) ή άγνωστα (unidentified), και σε εκείνα, τα οποία δεν περιλαμβάνονται στις προδιαγραφές και η ύπαρξή τους περιορίζεται από τα γενικά κριτήρια αποδοχής των προσμίξεων στο φαρμακευτικό σκεύασμα (unspecified degradation products). Έτσι, στις προδιαγραφές κάθε νέου φαρμακευτικού προϊόντος αναφέρονται τα κριτήρια αποδοχής για τις ακόλουθες προσμίξεις:

- για κάθε γνωστό προϊόν αποικοδόμησης ειδικών προδιαγραφών
- για κάθε άγνωστο προϊόν αποικοδόμησης ειδικών προδιαγραφών
- για κάθε προϊόν αποικοδόμησης, για το οποίο δεν υπάρχουν ειδικές προδιαγραφές και το κριτήριο αποδοχής τους είναι να βρίσκονται σε επίπεδο χαμηλότερο από το όριο ταυτοποίησης

- για το σύνολο των προϊόντων αποικοδόμησης

Με βάση την οδηγία ICH Q3B(R2), κατά τον έλεγχο των προσμίξεων μελετώνται:

- το όριο αναφοράς (reporting threshold)
- το όριο ταυτοποίησης (identification threshold)
- το όριο αξιολόγησης (qualification threshold)

Τα όρια αυτά καθορίζονται με βάση τη μέγιστη ημερήσια δόση της δραστικής ουσίας του φαρμακευτικού προϊόντος [64].

3.5 Μελέτες σταθερότητας

Οι μελέτες σταθερότητας αποσκοπούν στην αξιολόγηση της επίδρασης ορισμένων περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως η θερμοκρασία, η υγρασία και το φως, στην ποιότητα του φαρμακευτικού προϊόντος με την πάροδο του χρόνου. Από τις μελέτες αυτές καθορίζεται η ημερομηνία λήξης του σκευάσματος, καθώς και οι συνθήκες φύλαξής του. Ελέγχονται κυρίως τα χαρακτηριστικά του προϊόντος τα οποία ενδέχεται να μεταβληθούν κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής του και τα οποία ενδέχεται να επηρεάσουν την ποιότητα, την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητά του. Οι έλεγχοι που γίνονται είναι φυσικοί, χημικοί, βιολογικοί και μικροβιολογικοί, καθώς επίσης ελέγχονται τα συστατικά τα οποία περιέχονται στο φαρμακευτικό σκεύασμα ως συντηρητικά και ορισμένα χαρακτηριστικά της φαρμακοτεχνικής μορφής [65].

3.6 Επικύρωση Αναλυτικών Μεθόδων

Η επικύρωση μίας αναλυτικής μεθόδου αποσκοπεί στην αξιολόγηση των χαρακτηριστικών ποιότητάς της, μέσω πειραματικής τεκμηρίωσης και στην εξέταση της ανταπόκρισής της προς προδιαγραφές έτσι, ώστε να αποδειχθεί ότι είναι κατάλληλη για τον σκοπό για τον οποίο προορίζεται [66].

Στη συνέχεια, παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά, τα οποία ελέγχονται κατά την επικύρωση μίας μεθόδου.

3.6.1 Ειδικότητα (Specificity)

Εκφράζει την ικανότητα μίας μεθόδου να προσδιορίζει με ακρίβεια τη συγκέντρωση ενός αναλύτη σε ένα δείγμα, παρουσία άλλων συστατικών, χωρίς την επίδρασή τους. Η απόδειξη ειδικότητας της μεθόδου απαιτείται στον έλεγχο ταυτοποίησης, στον έλεγχο προσμίξεων και στον ποσοτικό προσδιορισμό δραστικής ουσίας [66, 67].

3.6.2 Γραμμικότητα (Linearity)

Εκφράζει την ικανότητα μιας αναλυτικής μεθόδου να παρέχει αποτελέσματα, τα οποία μεταβάλλονται ευθέως ανάλογα ως προς τη συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα, σε μία καθοριζόμενη περιοχή συγκεντρώσεων. Αξιολογείται με στατιστικές μεθόδους και υπολογίζεται η εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης και ο συντελεστής συσχέτισεως [66, 67].

3.6.3 Εύρος (Range)

Το εύρος αποτελεί την περιοχή ανάμεσα στην υψηλότερη και τη χαμηλότερη τιμή συγκέντρωσης του αναλύτη στο δείγμα (συμπεριλαμβανομένων και των δύο αυτών τιμών), για την οποία έχει αποδειχθεί ότι η αναλυτική μέθοδος παρέχει αποδεκτό βαθμό γραμμικότητας, ακρίβειας και επαναληψιμότητας. Η περιοχή αυτή των συγκεντρώσεων προκύπτει από τη μελέτη γραμμικότητας [66, 67].

3.6.4 Ακρίβεια (Accuracy)

Η ακρίβεια εκφράζει τη διαφορά μεταξύ μίας τιμής, η οποία γίνεται αποδεκτή ως η αληθής τιμή της μετρούμενης ποσότητας και της μετρούμενης τιμής ή του μέσου όρου μίας σειράς μετρήσεων [66, 67].

3.6.5 Πιστότητα (Precision)

Η πιστότητα εκφράζει την εγγύτητα της συμφωνίας (ή το βαθμό διασποράς) μεταξύ μίας σειράς διαδοχικών αποτελεσμάτων, όταν η αναλυτική μεθοδολογία επαναλαμβάνεται σε ένα δείγμα. Η πιστότητα μίας αναλυτικής μεθόδου εκφράζεται από την επαναληψιμότητα και την αναπαραγωγιμότητα και αξιολογείται από τον υπολογισμό της τυπικής απόκλισης (SD) και της σχετικής τυπικής απόκλισης (RSD).

- Επαναληψιμότητα (Repeatability): αποτελεί το μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων μεταξύ διαδοχικών μετρήσεων στο ίδιο δείγμα, όταν οι μετρήσεις αυτές πραγματοποιούνται κάτω από τις ίδιες συνθήκες, δηλαδή με την ίδια μέθοδο ελέγχου, από τον ίδιο αναλυτή, στην ίδια συσκευή, στο ίδιο εργαστήριο και σε βραχύ χρονικό διάστημα.
- Αναπαραγωγιμότητα (Reproducibility): αποτελεί το μέτρο της διασποράς μεταξύ των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από μετρήσεις που πραγματοποιούνται με την ίδια μέθοδο, στο ίδιο δείγμα, κάτω από διαφορετικές συνθήκες, δηλαδή από διαφορετικό αναλυτή, σε διαφορετικές συσκευές, με διαφορετικές παρτίδες αντιδραστηρίων και σε διαφορετικούς χρόνους. Όταν πρόκειται για αποτελέσματα, τα οποία λαμβάνονται στο ίδιο εργαστήριο

χαρακτηρίζεται ως Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα ή Ενδιάμεση Πιστότητα (Intermediate Precision), ενώ όταν πρόκειται για αποτελέσματα από διαφορετικά εργαστήρια χαρακτηρίζεται ως Διεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα [66].

3.6.6 Ανιχνευσιμότητα (Detectability)

Εκφράζει την ικανότητα μίας αναλυτικής μεθόδου να ανιχνεύει ή να ποσοτικοποιεί χαμηλές συγκεντρώσεις του αναλύτη [66].

Όριο ανίχνευσης (Detection Limit ή LOD): είναι η ελάχιστη ποσότητα του αναλύτη που μπορεί να ανιχνευθεί σε ένα δείγμα, χωρίς απαραίτητα να είναι δυνατή η ποσοτικοποίησή του [67]. Εκφράζει τη συγκέντρωση του αναλύτη, της οποίας το αναλυτικό σήμα, διαφέρει από το σήμα του λευκού δείγματος κατά 3,3 φορές την τυπική απόκλιση του σήματος του λευκού [66].

Όριο ποσοτικοποίησης (Quantitation Limit ή LOQ): είναι η ελάχιστη ποσότητα του αναλύτη που μπορεί να ποσοτικοποιηθεί σε ένα δείγμα, με ακρίβεια και πιστότητα. Χρησιμοποιείται στον έλεγχο προσδιορισμού των προσμίξεων [67]. Εκφράζει τη συγκέντρωση του αναλύτη, της οποίας το αναλυτικό σήμα, διαφέρει από το σήμα του λευκού δείγματος κατά 10 φορές την τυπική απόκλιση του σήματος του λευκού [66].

3.6.7 Ανθεκτικότητα (Robustness)

Σχετίζεται με την αντοχή της μεθόδου σε σκοπούμενες μικρές μεταβολές των πειραματικών παραμέτρων. Εξετάζεται κατά τη φάση της ανάπτυξης της μεθόδου [66].

Ακολουθεί πίνακας με τα χαρακτηριστικά που αξιολογούνται για την επικύρωση της μεθόδου σύμφωνα με τη διεθνή οδηγία ICH [66].

Πίνακας 3.1 Αξιολόγηση Αναλυτικών Μεθόδων για Επικύρωση

Χαρακτηριστικό Μεθόδου	Έλεγχος Ταυτοποίησης	Έλεγχος Προσμίξεων - Ποσοτικοποίηση	Έλεγχος Προσμίξεων- Όρια	Ποσοτικός Προσδιορισμός Δραστικής Ουσίας
Γραμμικότητα	-	+	-	+
Επαναληψιμότητα Συστήματος	-	+	- (2)	+
Επαναληψιμότητα Μεθόδου	-	+	- (2)	+
Ενδιάμεση Πιστότητα	-	+	-	+
Ακρίβεια	-	+	-	+
Ειδικότητα (1)	+	+	+	+
Όριο Ανίχνευσης	-	-	+	-
Όριο Ποσοτικοποίησης	-	+	-	-
Περιοχή	-	+	-	+
(1) Έλλειψη ειδικότητας σε μία μέθοδο μπορεί να αντιμετωπισθεί με μία άλλη υποστηρικτική αναλυτική μέθοδο			(2) Μπορεί να απαιτηθεί σε μερικές περιπτώσεις	

3.7 Εφαρμογές της HPLC στη Φαρμακευτική Ανάλυση

Η Υγροχρωματογραφία Υψηλής Αποδόσεως (HPLC) βρίσκει, τα τελευταία χρόνια, ευρεία εφαρμογή στον κλάδο της φαρμακευτικής βιομηχανίας, τόσο κατά τα στάδια της ανακάλυψης νέων φαρμάκων, όσο και στα μετέπειτα στάδια της ανάπτυξης και παραγωγής των φαρμακευτικών σκευασμάτων. Πρόκειται για μία τεχνική αξιόπιστη, η οποία παρέχει υψηλή διαχωριστικότητα και αποτελέσματα, τα οποία χαρακτηρίζονται από ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Η χρήση της HPLC ξεκινά από τα αρχικά στάδια της ανακάλυψης ενός νέου μορίου με θεραπευτικές ιδιότητες, στα οποία σημαντικό ρόλο παίζει η συνθετική χημεία, και όπου ανάμεσα από έναν μεγάλο αριθμό ενώσεων, γίνεται ο διαχωρισμός και η επιλογή του κατάλληλου για θεραπευτική χρήση μορίου. Η ταυτοποίηση των ενώσεων στο στάδιο της έρευνας και ανακάλυψης γίνεται με την τεχνική HPLC σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών (LC-MS) και για τις ενώσεις που επιλέγονται, μελετώνται στη συνέχεια οι

φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες, πάλι με το συνδυασμό των δύο τεχνικών (HPLC-MS/MS). Η μελέτη της απορρόφησης, της κατανομής, του μεταβολισμού και της απέκκρισης της υποψήφιας ένωσης γίνεται με τον ποσοτικό προσδιορισμό της σε βιολογικά υγρά. Σημαντικός είναι ο ρόλος της HPLC κατά τη διάρκεια της παραγωγικής διαδικασίας, με τον έλεγχο των ενδιάμεσων προϊόντων, καθώς και στον έλεγχο ποιότητας του τελικού φαρμακευτικού σκευάσματος. Για παράδειγμα, η ταυτοποίηση του δραστικού συστατικού στο φαρμακευτικό προϊόν μπορεί να γίνει από τον χρόνο συγκράτησης της κορυφής του στο χρωματογράφημα που λαμβάνεται. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του δραστικού συστατικού στην πρώτη ύλη ή στο τελικό προϊόν μπορεί να χρησιμοποιηθεί μία επικυρωμένη μέθοδος HPLC-UV. Το ίδιο ισχύει και για τον έλεγχο των εκδόχων, όταν αυτό είναι απαραίτητο. Οι έλεγχοι καθαρότητας των φαρμάκων και η μελέτη για την ύπαρξη προσμίξεων, περιλαμβάνουν επίσης τη χρήση της τεχνικής HPLC. Κατά τον έλεγχο ποιότητας μίας στερεής φαρμακοτεχνικής μορφής (δισκία) μελετάται η αποδέσμευση του δραστικού συστατικού με μελέτες διαλυτοποίησης. Λόγω της ειδικότητας και της ευαισθησίας που παρέχει η τεχνική HPLC, για τις μελέτες αυτές προτιμάται η εφαρμογή μίας μεθόδου HPLC-UV. Σημαντικό στάδιο στον έλεγχο ποιότητας αποτελεί ο ποσοτικός προσδιορισμός των προσμίξεων, είτε αυτές προέρχονται από την παραγωγή της πρώτης ύλης ή υπάρχουν στο τελικό προϊόν ως προϊόντα αποικοδόμησης ή αντίδρασης της δραστικής ουσίας με κάποιο έκδοχο ή με τον περιέκτη. Στην περίπτωση αυτή απαιτείται υψηλή διαχωριστικότητα ώστε να διακρίνονται τόσο το δραστικό συστατικό, όσο και οι συγγενείς ουσίες με παραπλήσια δομή, καθώς και υψηλή ευαισθησία για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων. Η κατεργασία των δειγμάτων θα πρέπει να είναι απλή, ώστε να μην προκύπτουν νέες προσμίξεις. Η τεχνική HPLC συγκεντρώνει τα απαραίτητα αυτά χαρακτηριστικά και συνήθως χρησιμοποιείται ένα πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης ώστε να γίνεται ο διαχωρισμός όλων των συστατικών. Τέλος, η HPLC χρησιμοποιείται για τον έλεγχο ομοιομορφίας περιεχομένου της φαρμακοτεχνικής μορφής και για την εκτίμηση της σταθερότητας του φαρμακευτικού προϊόντος. Συμπεραίνεται επομένως, ότι η τεχνική της HPLC αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο στη φαρμακευτική βιομηχανία, καθώς βρίσκει εφαρμογή σε όλα τα στάδια, από την ανάπτυξη μέχρι την κυκλοφορία ενός φαρμακευτικού προϊόντος [63, 68].

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

4.1 Εξοπλισμός

4.1.1 Χρωματογραφικό σύστημα

Σύστημα HPLC-DAD της σειράς Prominence της εταιρείας Shimadzu, το οποίο αποτελείται από έναν απαερωτή κινητής φάσης DGU-20A5, μία αντλία δύο πιστονιών LC-20 AD, έναν αυτόματο δειγματολήπτη SIL-20ACHT, έναν φούρνο για ρύθμιση της θερμοκρασίας της στήλης CTO-20AC, έναν ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων SPD-M20 UV/Vis και έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή, με εγκατεστημένο το λογισμικό LC Solutions (v.1.11 SP1) της εταιρείας Shimadzu, για τον έλεγχο του συστήματος και την επεξεργασία των δεδομένων.

4.1.2 Αναλυτικές Στήλες

YMC, YMC-Pack Pro C₁₈, 250×4,6 mm, 5 μm

Thermo, Hypersil Silica, 250 × 4,6 mm, 5 μm

Thermo, CPS Hypersil, 250 × 4 mm, 5 μm

Phenomenex-Kinetex C₈, 150 × 4,6 mm, 2,6 μm

4.1.3 Συσκευές

Αναλυτικός ζυγός Shimadzu AUW320, 4 δεκαδικών ψηφίων

Αναλυτικός ζυγός Mettler AT250, 4-5 δεκαδικών ψηφίων

Αναλυτικός ζυγός Shimadzu TX223L, 3 δεκαδικών ψηφίων

Πεχάμετρο Consort multi-parameter analyser C3010

Συσκευή Vortex της εταιρείας J.P. Selecta

Φυγόκεντρος Hermle Z400

Συσκευή υπερήχων Select Ultrasons H-D

Φούρνος Binder 40 °C/ 75% RH (Humid)

Φούρνος Memmert 70±2 °C

4.2 Διαλύτες – Αντιδραστήρια

Απιονισμένο και απεσταγμένο νερό βαθμού καθαρότητας HPLC (αγωγιμότητα < 5 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)

Μεθανόλη βαθμού καθαρότητας HPLC (Fischer)

Μονοϋδρικό μονοβασικό φωσφορικό νάτριο (Sodium phosphate monobasic monohydrate) (Carlo Erba)

Φωσφορικό οξύ 85% (Fischer)

Χλωροφόρμιο (Fischer)

4.3 Πρότυπες Ουσίες

Υλικό αναφοράς νατριούχου δικλοφαινάκης καθαρότητας 99,70% (Lot No: DS03/10/115, Kairav Chemicals Ltd, India)

Δικλοφαινάκη για έλεγχο καταλληλότητας συστήματος της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας (EP CRS Batch 1.0)

Υλικό αναφοράς θειοκολχικοσίδη καθαρότητας 99,36% (Lot No: 2921113, Alkaloids Private Ltd, India)

Πρότυπη ουσία κολχικοσίδη καθαρότητας 99,68% (Batch No: CCEP/WS/01/14, APL, India)

Πρότυπη ουσία N-φορμυλο-θειοκολχικοσίδη καθαρότητας 95,03% (Batch No: TCE-NFI/02/11, APL, India)

Πρότυπη ουσία κολχικίνης USP καθαρότητας 99,93% (Batch No: COL/WS/01/14, APL, India)

5. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΝΑΤΡΙΟΥΧΟΥ ΔΙΚΛΟΦΑΙΝΑΚΗΣ ΣΕ ΔΕΡΜΑΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ

5.1 Εισαγωγή

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να αναπτυχθεί κοινή μέθοδος προσδιορισμού της νατριούχου δικλοφαινάκης και των προσμίξεών της σε δερματικό διάλυμα τελικού φαρμακευτικού προϊόντος σε δύο διαφορετικές περιεκτικότητες:

- νατριούχος δικλοφαινάκη 1,5% w/w
- νατριούχος δικλοφαινάκη 4,0% w/v

Το δερματικό διάλυμα δικλοφαινάκης περιεκτικότητας 4,0% w/v περιέχει μία επιπλέον δραστική ουσία, τον θειοκολχικοσίδη, σε περιεκτικότητα 0,25% w/v. Επομένως, η μέθοδος προσδιορισμού θα πρέπει να είναι εκλεκτική ως προς τη δικλοφαινάκη.

Τα δερματικά διαλύματα που μελετώνται περιέχουν τα εξής έκδοχα:

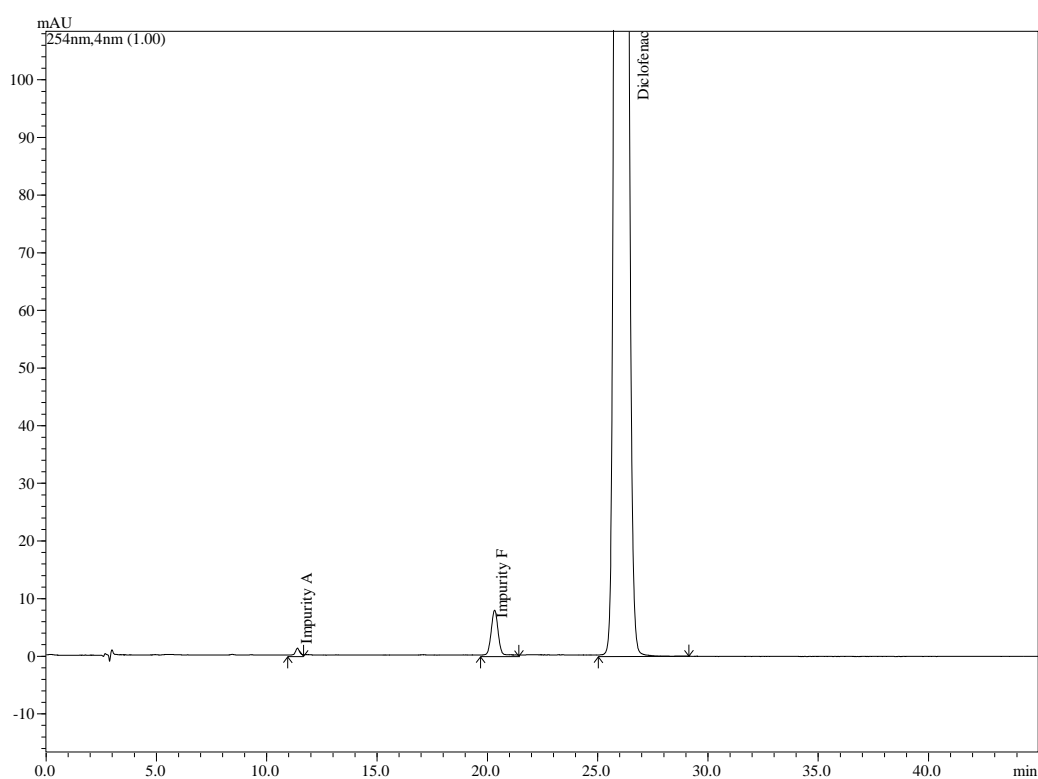
- Δερματικό διάλυμα σύστασης 1,5% w/w: DMSO, νερό, αιθανόλη προπυλενογλυκόλη και γλυκερόλη (85%)
- Δερματικό διάλυμα σύστασης 4,0% w/v: ισοπροπυλική αλκοόλη, αιθανόλη, προπυλενογλυκόλη, μινθέλαιο, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 8,0-8,5.

5.2 Ανάπτυξη μεθόδου

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε βασίστηκε στη μέθοδο που προτείνει η Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία (Ε.Φ.) για τον προσδιορισμό των προσμίξεων της νατριούχου δικλοφαινάκης σε πρώτη ύλη. Στόχος ήταν η επέκταση της μεθόδου αυτής στον προσδιορισμό της δραστικής ουσίας σε σκεύασμα.

Για τον προσδιορισμό των προσμίξεων, η Ε.Φ. προτείνει υδροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Η μέθοδος της Ε.Φ. περιλαμβάνει στήλη C₁₈ (end-capped) 5 μm, κινητή φάση αποτελούμενη από μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 2,5-μεθανόλης σε αναλογία 34:66, ταχύτητα ροής 1,0 mL/min, μήκος κύματος ανιχνευτή 254 nm και όγκο ένεσης 20 μL Η συγκέντρωση εργασίας των διαλυμάτων ελέγχου που προτείνεται είναι 1000 ppm.

Αρχικά έγινε έλεγχος για την καταλληλότητα του συστήματος (system suitability). Μία μικρή ποσότητα υλικού αναφοράς δικλοφαινάκης (CRS) διαλύθηκε σε 1,0 mL κινητής φάσης. Με βάση την Ε.Φ., το σύστημα κρίνεται κατάλληλο όταν η διαχωριστικότητα (Resolution, R_s) μεταξύ των κορυφών της πρόσμιξης F και της δικλοφαινάκης είναι τουλάχιστον 4,0. Στη συνέχεια παρατίθεται το χρωματογράφημα του διαλύματος ελέγχου καταλληλότητας του συστήματος, καθώς και ο πίνακας με τα χαρακτηριστικά των κορυφών (χρόνος συγκράτησης t_R , εμβαδόν, παράγοντας ασυμμετρίας, διαχωριστικότητα).

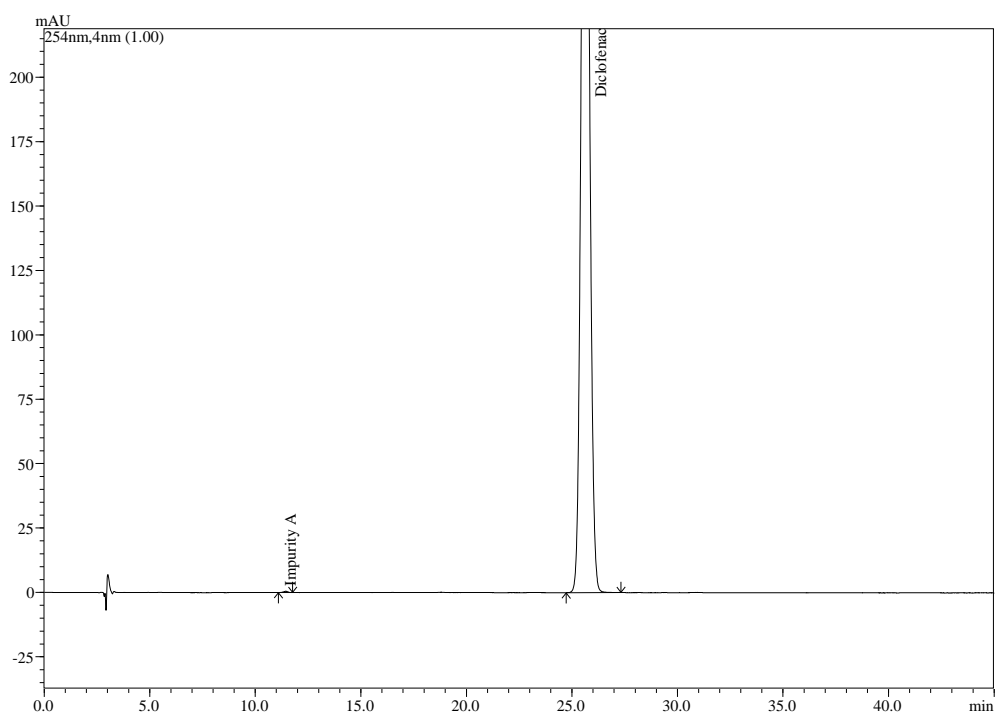


Ουσία	t_R (min)	Εμβαδόν κορυφής	Tailing Factor	R_s
Πρόσμιξη A	11,380	15351	1,14	--
Πρόσμιξη F	20,318	163446	1,03	19,82
Δικλοφαινάκη	26,033	22113575	1,14	8,99

Εικόνα 5.1 Χρωματογράφημα και πίνακας δεδομένων κορυφών διαλύματος ελέγχου καταλληλότητας συστήματος

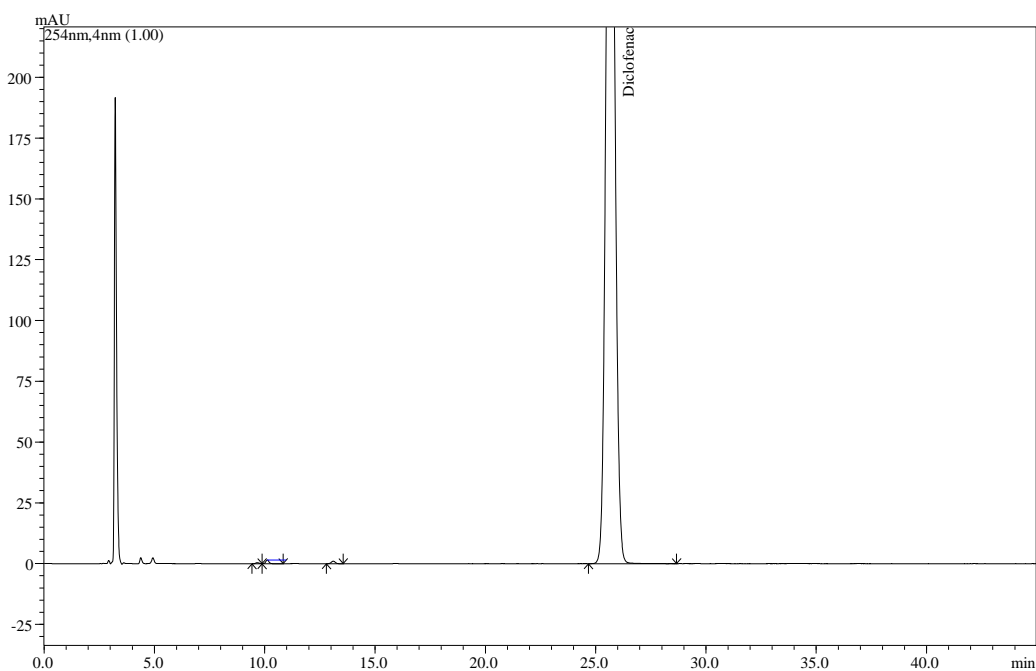
Από το χρωματογράφημα βλέπουμε ότι $R_s = 9,0$ μεταξύ πρόσμιξης F και δικλοφαινάκης, οπότε το σύστημα κρίνεται κατάλληλο και επομένως συνεχίστηκαν οι δοκιμές για την ανάπτυξη της μεθόδου.

Ακολούθησε η παρασκευή προτύπου διαλύματος δικλοφαινάκης και διαλύματος ελέγχου σε συγκέντρωση 1000 ppm. Τα χρωματογραφήματα των διαλυμάτων αυτών εμφάνιζαν κορυφές με καλή μεν συμμετρία, αλλά με πολύ μεγάλο εμβαδό. Επομένως, η συγκέντρωση των 1000 ppm, ως διάλυμα εργασίας, κρίθηκε πολύ μεγάλη και αποφασίστηκε να γίνει μείωση στα 500 ppm. Παρασκευάστηκαν διαλύματα ελέγχου, ξεχωριστά για τα δύο δερματικά διαλύματα περιεκτικότητας 1,5% w/w και 4,0% w/v σε νατριούχο δικλοφαινάκη, με διαδικασία η οποία περιγράφεται στη συνέχεια στο πρωτόκολλο της μεθόδου. Από τα παρακάτω χρωματογραφήματα φαίνεται πως οι κορυφές που εμφανίστηκαν ήταν οξείες και με καλή συμμετρία, ενώ ο χρόνος συγκράτησης της δικλοφαινάκης ήταν περίπου 25,6 min.



Ουσία	t _R (min)	Εμβαδόν κορυφής	Tailing Factor	Rs	Θεωρητικές πλάκες
Πρόσμιξη Α	11,444	8393	0,87	--	13127
Δικλοφαινάκη	25,620	10795777	1,09	26,03	22090

Εικόνα 5.2 Χρωματογράφημα και πίνακας δεδομένων κορυφών διαλύματος ελέγχου 500 ppm δικλοφαινάκης για το δερματικό διάλυμα περιεκτικότητας 1,5% w/w



Ουσία	t _R (min)	Εμβαδόν κορυφής	Tailing Factor	Rs	Θεωρητικές πλάκες
Δικλοφαινάκη	25,651	10915256	1,10	24,15	22099

Εικόνα 5.3 Χρωματογράφημα και πίνακας δεδομένων κορυφών διαλύματος ελέγχου 500 rpm για το δερματικό διάλυμα περιεκτικότητας 4,0% w/v

Στο χρωματογράφημα του διαλύματος δικλοφαινάκης περιεκτικότητας 4,0% w/v, η κορυφή που εμφανίστηκε στα 10 min περίπου δεν προέρχεται από την ύπαρξη της πρόσμιξης A, όπως διαπιστώθηκε έπειτα από σύγκριση των χρωματογραφημάτων που προέκυψαν από εμβολιασμένο με πρόσμιξη A διάλυμα ελέγχου και από το διάλυμα placebo για την περιεκτικότητα 4,0% w/v.

Το pH της κινητής φάσης (μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών-μεθανόλης σε αναλογία 34:66), όπως προτείνεται από την Ε.Φ., θα πρέπει να είναι ίσο με 2,5. Το pH του ρυθμιστικού διαλύματος, όπως παρασκευάστηκε σύμφωνα με την οδηγία, βρέθηκε ίσο με 2,16, επομένως θα πρέπει να γίνεται ρύθμιση της τιμής του pH με NaOH. Ο λόγος για τον οποίο απαιτείται ρύθμιση του pH είναι διότι σε τιμές μικρότερες από 2,5 αυξάνεται ο χρόνος έκλυσης της δικλοφαινάκης. Σε pH 2,5 η δικλοφαινάκη είναι υπό τη μορφή αδιάστατου οξέος (pKa=4,0), ενώ σε pH < 2,5 είναι πιθανή η πρωτονίωση της δευτεροταγούς αμινομάδας και ο σχηματισμός λιπόφιλου ιοντικού ζεύγους με τα φωσφορικά.

Στη συνέχεια, από τα διαλύματα ελέγχου παρασκευάστηκαν διαλύματα αναφοράς σε συγκέντρωση 0,2% και 0,05%. Οι τιμές αυτές αποτελούν το μέγιστο αποδεκτό όριο για την πρόσμιξη Α και το κατώτατο όριο αναφοράς προσμίξεων, αντίστοιχα. Ελέγχθηκε το κατά πόσο τα χρωματογραφήματα που λαμβάνονται κρίνονται ως ικανοποιητικά και επομένως, αν η συγκέντρωση εργασίας είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό των προσμίξεων. Επίσης, μελετήθηκε η πιθανή παρεμπόδιση της κορυφής της πρόσμιξης Α από τις κορυφές του διαλύματος placebo. Παρατηρήθηκε ότι υπάρχει καλός διαχωρισμός μεταξύ των κορυφών. Τα αποτελέσματα των ελέγχων αυτών, τα οποία παρουσιάζονται αναλυτικά στο υποκεφάλαιο 6.1, έδειξαν ότι πληρούνται τα απαιτούμενα κριτήρια για τον προσδιορισμό των προσμίξεων.

Το δερματικό διάλυμα περιεκτικότητας 4,0% w/v, εκτός από τη νατριούχο δικλοφαινάκη περιέχει άλλη μία δραστική ουσία, τον θειοκολχικοσίδη. Επομένως ήταν αναγκαίο να μελετηθεί το αν οι προσμίξεις της, καθώς και ο ίδιος ο θειοκολχικοσίδης, παρεμποδίζουν την ανάλυση. Έτσι, μικρή ποσότητα από την κάθε πρόσμιξη διαλύθηκε σε 1,0 mL κινητής φάσης και ελήφθησαν τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα, από τα οποία προέκυψε ότι τόσο ο θειοκολχικοσίδης, όσο και οι προσμίξεις του, εκλύονται σε χρόνο < 5 min, οπότε δεν παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό της δικλοφαινάκης. Επομένως, η μέθοδος είναι εκλεκτική ως προς τη δικλοφαινάκη.

Έπειτα από τους παραπάνω ελέγχους και εφόσον αποδείχτηκε ότι πληρούνται οι αναγκαίες προϋποθέσεις, αποφασίστηκε ότι η μέθοδος που προτείνει η Ε.Φ. για τον προσδιορισμό των προσμίξεων της νατριούχου δικλοφαινάκης σε πρώτη ύλη, είναι κατάλληλη για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της νατριούχου δικλοφαινάκης και των προσμίξεών της στα δερματικά διαλύματα δύο διαφορετικών περιεκτικότητας που μελετώνται, με μόνη διαφορά την αλλαγή στη συγκέντρωση εργασίας από τα 1000 ppm που προτείνονται στα 500 ppm.

5.3 Παρασκευή διαλυμάτων

5.3.1 Παρασκευή προτύπου διαλύματος 500 ppm (standard solution)

Για την παρασκευή του προτύπου διαλύματος ζυγίστηκαν με ακρίβεια 25,0 mg υλικού αναφοράς δικλοφαινάκης και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 50,0 mL, όπου διαλύθηκαν με κινητή φάση και στη συνέχεια έγινε αραίωση με τον ίδιο διαλύτη μέχρι τη χαραγή. Ακολούθησε καλή ανάδευση.

5.3.2 Παρασκευή διαλυμάτων ελέγχου (test solutions)

Η παρασκευή των διαλυμάτων ελέγχου έγινε με διαφορετικό τρόπο για τα δύο δερματικά διαλύματα διαφορετικής περιεκτικότητας σε νατριούχο δικλοφαινάκη:

- Νατριούχος δικλοφαινάκη 1,5% w/w

Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 1,667 g δερματικού διαλύματος (τα οποία αντιστοιχούν σε 25,0 mg νατριούχου δικλοφαινάκης) απευθείας σε ογκομετρική φιάλη των 50,0 mL και αραιώθηκαν με κινητή φάση μέχρι τη χαραγή. Ακολούθησε καλή ανάδευση.

- Νατριούχος δικλοφαινάκη 4,0% w/v

Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 0,606 g δερματικού διαλύματος (τα οποία αντιστοιχούν σε 25,0 mg νατριούχου δικλοφαινάκης) απευθείας σε ογκομετρική φιάλη των 50,0 mL και αραιώθηκαν με κινητή φάση μέχρι τη χαραγή. Ακολούθησε καλή ανάδευση.

5.4 Ποσοτικοποίηση

Η % περιεκτικότητα της νατριούχου δικλοφαινάκης ως προς τη δηλούμενη τιμή υπολογίζεται από τους παρακάτω τύπους:

$$\text{Νατριούχος δικλοφαινάκη 1,5\% w/w : \% περιεκτικότητα} = \frac{A_{\text{ελεγ}}}{A_{\text{προτ}}} \times \frac{W_{\text{προτ}}}{W_{\text{ελεγ}}} \times \frac{\%P}{15}$$

$$\text{Νατριούχος δικλοφαινάκη 4,0\% w/v : \% περιεκτικότητα} = \frac{A_{\text{ελεγ}}}{A_{\text{προτ}}} \times \frac{W_{\text{προτ}} \times d}{W_{\text{ελεγ}}} \times 0,025 \times \%P$$

όπου:

$A_{\text{ελεγ}}$: το εμβαδόν της κορυφής της νατριούχου δικλοφαινάκης στο χρωματογράφημα του διαλύματος ελέγχου

$A_{\text{προτ}}$: το εμβαδόν της κορυφής της νατριούχου δικλοφαινάκης στο χρωματογράφημα του προτύπου διαλύματος

$W_{\text{ελεγ}}$: το ακριβές βάρος του δερματικού διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του διαλύματος ελέγχου (g)

$W_{\text{προτ}}$: το ακριβές βάρος του υλικού αναφοράς νατριούχου δικλοφαινάκης που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του προτύπου διαλύματος (mg)

%P : η % καθαρότητα του υλικού αναφοράς νατριούχου δικλοφαινάκης

d : η πυκνότητα του τελικού προϊόντος που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του διαλύματος ελέγχου (g/mL)

Οι συντελεστές 15 και 0,025 υπολογίστηκαν από την ονομαστική τιμή και τις αραιώσεις

5.5 Χρωματογραφικές παράμετροι

Ανιχνευτής	UV/PDA
Στήλη	YMC, YMC-Pack Pro C ₁₈ , 250 × 4,6 mm, 5 μm
Κινητή φάση	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών/MeOH : 34/66 Ρυθμιστικό : υδατικό διάλυμα 0,5 g/L H ₃ PO ₄ και 0,8 g/L NaH ₂ PO ₄ και ρύθμιση του pH στο 2,5
Ταχύτητα ροής κινητής φάσης	1,0 mL/min
Όγκος ένεσης	20 μL
Θερμοκρασία στήλης	25 °C
Θερμοκρασία δειγματολήπτη	25 °C
Μήκος κύματος	254 nm
Χρόνος ανάλυσης	45 min

5.6 Έλεγχος καταλληλότητας του συστήματος (System Suitability)

Για να αποδειχτεί η καταλληλότητα του συστήματος παρασκευάστηκε το εξής διάλυμα:

Μικρή ποσότητα υλικού αναφοράς (CRS) δικλοφαινάκης για καταλληλότητα του συστήματος, το οποίο περιείχε και τις προσμίξεις A και F, διαλύθηκε σε 1,0 mL κινητής φάσης. Με βάση την Ε.Φ., για να κριθεί το σύστημα κατάλληλο, θα πρέπει η διαχωριστικότητα (R_s), μεταξύ των κορυφών της πρόσμιξης F και της δικλοφαινάκης

να είναι τουλάχιστον 4,0. Από το χρωματογράφημα (Εικόνα 5.1) φαίνεται ότι η διαχωριστικότητα μεταξύ των δύο αυτών κορυφών είναι 9,0, οπότε ικανοποιείται το κριτήριο για την καταλληλότητα του συστήματος.

5.7 Επικύρωση της μεθόδου

5.7.1 Ειδικότητα

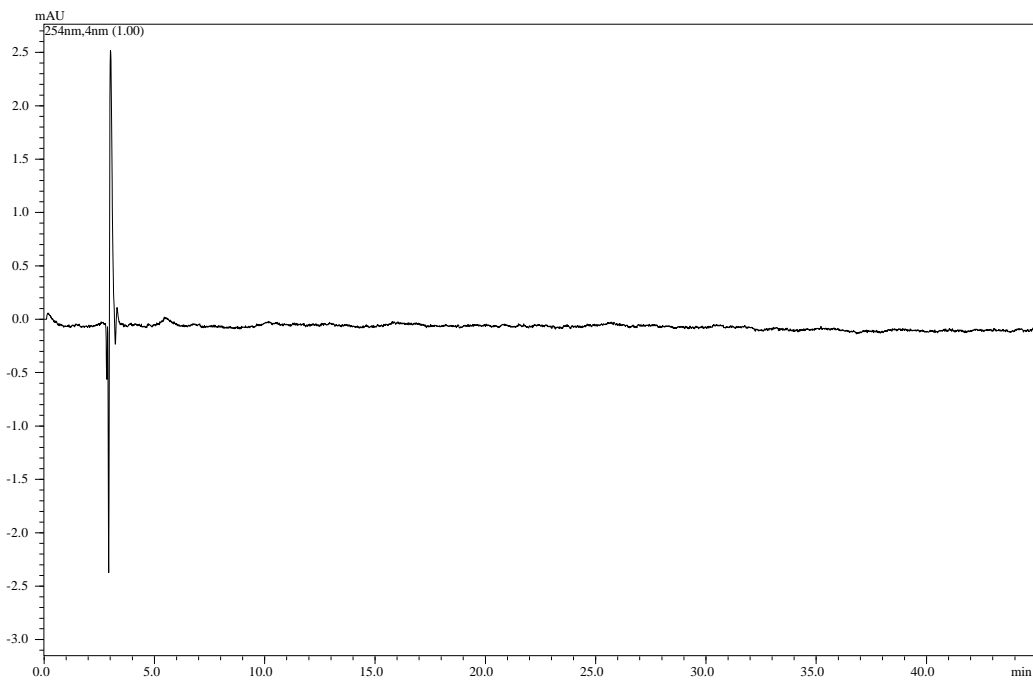
Για αμφότερα τα δερματικά διαλύματα (1,5% w/w και 4,0% w/v νατριούχου δικλοφαινάκης) που εξετάζονται, παρασκευάστηκαν διαλύματα placebo, με την ίδια διαδικασία που παρασκευάζονται τα διαλύματα ελέγχου, τα οποία περιείχαν όλα τα συστατικά του σκευάσματος, εκτός από τη δραστική ουσία.

Επίσης παρασκευάστηκε εμβολιασμένο διάλυμα Β στη συγκέντρωση εργασίας και για τις δύο συστάσεις, με διαδικασία η οποία περιγράφεται αναλυτικά στο εδάφιο 5.7.4.

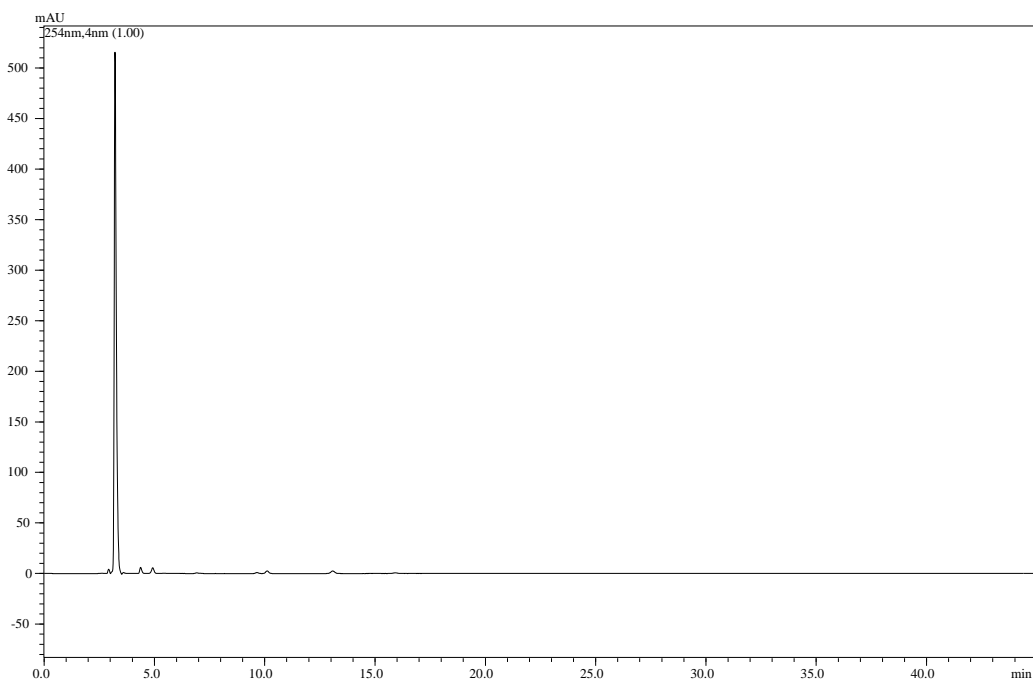
Τα κριτήρια αποδοχής για την ειδικότητα της μεθόδου είναι τα εξής:

1. Στα χρωματογραφήματα των διαλυμάτων placebo να μην εμφανίζεται κορυφή στον ίδιο χρόνο που εμφανίζεται η κορυφή της δικλοφαινάκης (25-26 min)
2. Η καθαρότητα της κορυφής (peak purity) της δικλοφαινάκης στα χρωματογραφήματα του εμβολιασμένου διαλύματος Β για τις δύο συστάσεις να είναι $\geq 0,98$
3. Στο χρωματογράφημα του διαλύματος που παρασκευάστηκε για τον έλεγχο καταλληλότητας του συστήματος, η διαχωριστικότητα μεταξύ των κορυφών της πρόσμειξης F και της δικλοφαινάκης να είναι τουλάχιστον 4,0. Το κριτήριο αυτό πληρούται, όπως ήδη αναφέρθηκε στο υποκεφάλαιο 5.6.

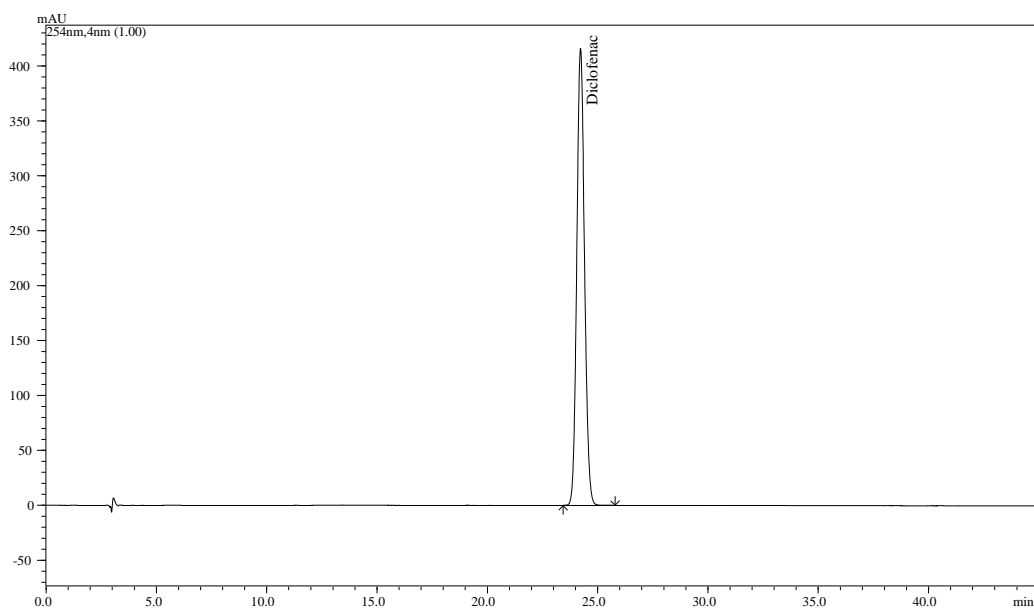
Από τα χρωματογραφήματα που παρατίθενται στη συνέχεια, συμπεραίνεται ότι πληρούνται και τα υπόλοιπα κριτήρια, εφόσον στα διαλύματα placebo δεν εμφανίζεται κορυφή στα 25-26 min και η καθαρότητα της κορυφής της δικλοφαινάκης και για τα δύο εμβολιασμένα διαλύματα Β είναι ίση με 1,0. Επομένως η μέθοδος χαρακτηρίζεται ως ειδική.



Εικόνα 5.4 Χρωματογράφημα διαλύματος placebo για το δερματικό διάλυμα περιεκτικότητας 1,5% w/w νατριούχου δικλοφαινάκης

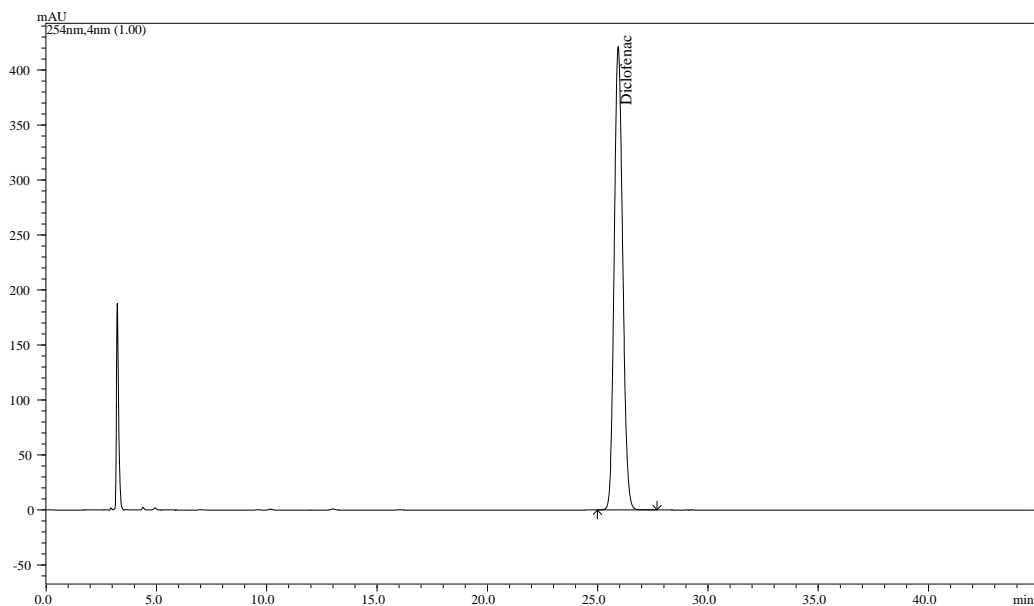


Εικόνα 5.5 Χρωματογράφημα διαλύματος placebo για το δερματικό διάλυμα περιεκτικότητας 4,0% w/v νατριούχου δικλοφαινάκης



Ουσία	t _R (min)	Εμβαδόν κορυφής	Tailing Factor	Καθαρότητα κορυφής	Θεωρητικές πλάκες
Δικλοφαινάκη	24,214	10169506	1,13	1,00	22210

Εικόνα 5.6 Χρωματογράφημα και πίνακας δεδομένων κορυφής για το εμβολιασμένο διάλυμα Β για τη σύσταση 1,5% w/w



Ουσία	t _R (min)	Εμβαδόν κορυφής	Tailing Factor	Καθαρότητα κορυφής	Θεωρητικές πλάκες
Δικλοφαινάκη	25,925	11235342	1,14	1,00	21414

Εικόνα 5.7 Χρωματογράφημα και πίνακας δεδομένων για το εμβολιασμένο διάλυμα Β για τη σύσταση 4,0% w/v

5.7.2 Γραμμικότητα

Για τον έλεγχο της γραμμικότητας παρασκευάστηκαν πέντε πρότυπα διαλύματα νατριούχου δικλοφαινάκης, σε συγκεντρώσεις που καλύπτουν ομοιόμορφα το 80-120 % της συγκέντρωσης εργασίας. Ο έλεγχος γραμμικότητας είναι κοινός και για τα δύο διαλύματα που μελετώνται (1,5% w/w και 4,0% w/v). Αρχικά παρασκευάστηκε ένα πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης 5000 µg/mL νατριούχου δικλοφαινάκης. Για την παρασκευή αυτού του διαλύματος ζυγίστηκαν με ακρίβεια 0,125 g υλικού αναφοράς νατριούχου δικλοφαινάκης, μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 25,0 mL όπου διαλύθηκαν σε κινητή φάση και στη συνέχεια έγινε αραιώση με τον ίδιο διαλύτη μέχρι τη χαραγή. Από το διάλυμα παρακαταθήκης παρασκευάστηκαν τα παρακάτω πρότυπα διαλύματα:

- A. 400 µg/mL (80% της συγκέντρωσης εργασίας): 0,400 mL προτύπου διαλύματος παρακαταθήκης μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 5,0 mL και αραιώθηκαν μέχρι τη χαραγή με κινητή φάση
- B. 450 µg/mL (90% της συγκέντρωσης εργασίας): όπως το διάλυμα A, χρησιμοποιώντας 0,450 mL προτύπου διαλύματος παρακαταθήκης
- Γ. 500 µg/mL (100% της συγκέντρωσης εργασίας): όπως το διάλυμα A, χρησιμοποιώντας 0,500 mL προτύπου διαλύματος παρακαταθήκης
- Δ. 550 µg/mL (110% της συγκέντρωσης εργασίας): όπως το διάλυμα A, χρησιμοποιώντας 0,550 mL προτύπου διαλύματος παρακαταθήκης
- E. 600 µg/mL (120% της συγκέντρωσης εργασίας): όπως το διάλυμα A, χρησιμοποιώντας 0,600 mL προτύπου διαλύματος παρακαταθήκης

Για καθένα από τα παραπάνω πρότυπα διαλύματα έγιναν τρεις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Υπολογίστηκε ο μέσος όρος των εμβαδών των κορυφών, η τυπική απόκλιση (standard deviation, SD) και η σχετική τυπική απόκλιση (relative standard deviation, RSD).

Ο μέσος όρος των εμβαδών των κορυφών, χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης. Εφαρμόζοντας τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων (least squares regression method), υπολογίστηκε η εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης, ο συντελεστής συσχέτισης (correlation coefficient, r), η τομή στον άξονα των y (y -intercept) και η κλίση (slope) της ευθείας παλινδρόμησης. Επίσης, κατασκευάστηκε το διάγραμμα των υπολοίπων (residuals plot) για τον έλεγχο της εμφάνισης έκτροπων

τιμών. Στη συνέχεια παρατίθενται ο πίνακας με τα αποτελέσματα των μετρήσεων, η γραφική παράσταση της καμπύλης βαθμονόμησης και το διάγραμμα των υπολοίπων.

Πίνακας 5.1 Αποτελέσματα της μελέτης γραμμικότητας της μεθόδου προσδιορισμού της νατριούχου δικλοφαινάκης

% συγκέντρωση εργασίας προτύπου διαλύματος	Συγκέντρωση προτύπου διαλύματος δικλοφαινάκης ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Εμβαδόν κορυφής	Μέσος όρος ($\pm\text{SD}$)/%RSD
80	400	8411674	840,35 ($\pm 0,77$) x 10⁴ 0,092
		8396328	
		8402560	
90	450	9305678	930,603 ($\pm 0,060$) x 10⁴ 0,0064
		9306721	
		9305703	
100	500	10394280	1036,6 ($\pm 2,8$) x 10⁴ 0,27
		10365964	
		10338806	
110	550	11372878	1137,1 ($\pm 1,7$) x 10⁴ 0,15
		11387157	
		11352606	
120	600	12178391	1212,3 ($\pm 4,8$) x 10⁴ 0,40
		12087525	
		12104460	

Η ευθεία παλινδρόμησης που προκύπτει είναι η εξής:

$$y = 19,01 (\pm 0,59) \times 10^3 x + 8,1 (\pm 3,0) \times 10^5$$

Μονάδες τομής στον άξονα των y: Μονάδες εμβαδού

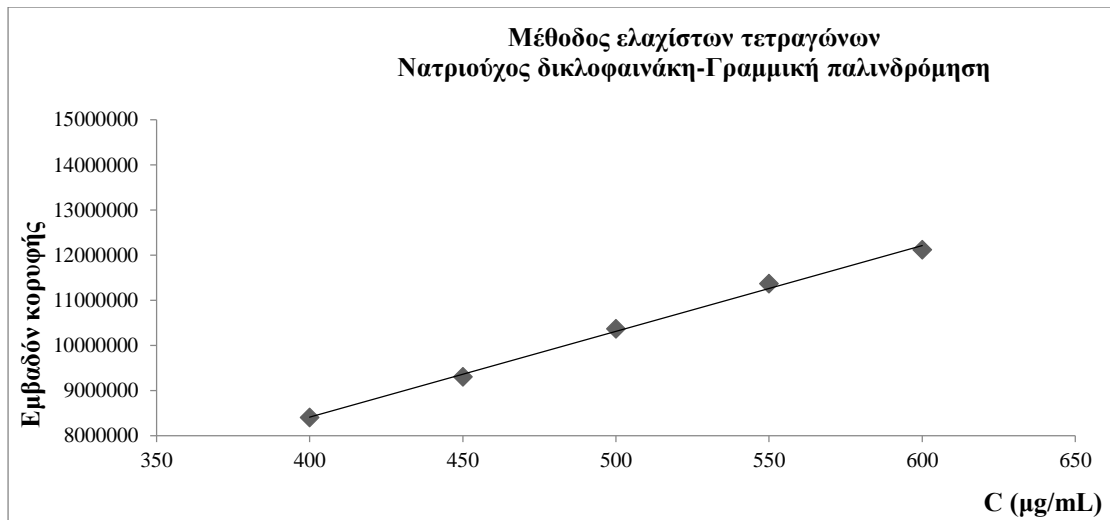
Μονάδες κλίσης: Μονάδες εμβαδού $\cdot \text{mL} \cdot \mu\text{g}^{-1}$

Συντελεστής συσχέτισης (r) : 0,999

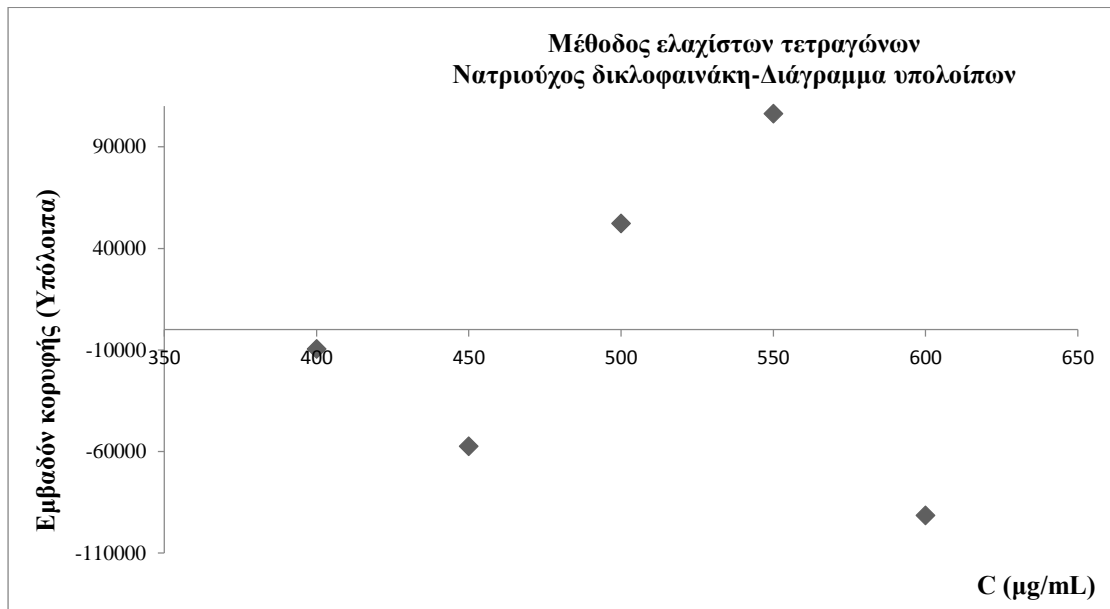
Ελέγχεται εάν η ευθεία παλινδρόμησης διέρχεται από το μηδέν:

$$t_{\text{πειρ}} = \frac{\text{τομή}}{S_a} = \frac{8,1}{3,0} = 2,73 < 3,18 = t_{\text{θεωρ}}, \text{ για } n = 3 \text{ βαθμούς ελευθερίας και σε στάθμη}$$

εμπιστοσύνης 95%, επομένως θεωρείται ότι η ευθεία διέρχεται από το μηδέν και μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος του ενός προτύπου κατά την ποσοτικοποίηση.



Εικόνα 5.8 Γραφική παράσταση της καμπύλης βαθμονόμησης της νατριούχου δικλοφαινάκης



Εικόνα 5.9 Διάγραμμα υπολοίπων νατριούχου δικλοφαινάκης

Η προϋπόθεση για τη γραμμικότητα της μεθόδου είναι ο συντελεστής συσχέτισης να είναι $\geq 0,99$. Η καμπύλη βαθμονόμησης φαίνεται οπτικά γραμμική και ο συντελεστής συσχέτισης βρέθηκε ίσος με 0,999, επομένως η μέθοδος χαρακτηρίζεται από γραμμικότητα.

5.7.3 Πιστότητα

Πιστότητα Συστήματος

Για τον έλεγχο της πιστότητας του συστήματος έγιναν τρεις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις σε κάθε ένα από τα πρότυπα διαλύματα που παρασκευάστηκαν για τον έλεγχο της γραμμικότητας και υπολογίστηκε το εμβαδό της κάθε κορυφής. Η πιστότητα εκφράζεται από την % σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) του εμβαδού των κορυφών της δικλοφαινάκης. Η %RSD θα πρέπει να είναι $\leq 1,5$.

Από τον πίνακα 5.1 προκύπτει ότι $\%RSD \leq 0,40$, οπότε βρίσκεται εντός του αποδεκτού ορίου.

Επαναληψιμότητα

Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας παρασκευάστηκαν έξι διαλύματα ελέγχου στη συγκέντρωση εργασίας (500 ppm), για κάθε μία από τις δύο συστάσεις ξεχωριστά. Επίσης, παρασκευάστηκε ένα πρότυπο διάλυμα νατριούχου δικλοφαινάκης 500 ppm. Στη συνέχεια, έγιναν οι μετρήσεις των παραπάνω διαλυμάτων και υπολογίστηκαν η % περιεκτικότητα δραστικής ουσίας κάθε διαλύματος και η % σχετική τυπική απόκλιση μεταξύ αυτών των τιμών.

Η % περιεκτικότητα υπολογίζεται από τον τύπο: $\% \text{περιεκτικότητα} = \frac{A_{\text{test}}}{A_{\text{std}}} \times \frac{C_{\text{theor}}}{C_{\text{test}}} \times 100$

Για να θεωρηθεί επαναλήψιμη η μέθοδος θα πρέπει $\%RSD \leq 2,0$.

Ενδιάμεση πιστότητα (Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα)

Για να ελεγχθεί η ενδιάμεση πιστότητα γίνονται δύο επιπλέον μελέτες επαναληψιμότητας, με μετρήσεις οι οποίες έγιναν: α) σε διαφορετική ημέρα και β) από διαφορετικό αναλυτή και σε διαφορετικό όργανο, με τις ίδιες συνθήκες ανάλυσης. Για την πραγματοποίηση αυτών των μελετών παρασκευάστηκαν ένα πρότυπο διάλυμα νατριούχου δικλοφαινάκης και τρία ανεξάρτητα διαλύματα ελέγχου με την ίδια διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας της μεθόδου, για τις δύο συστάσεις που μελετώνται. Στη συνέχεια υπολογίστηκαν η % περιεκτικότητα και η % σχετική τυπική απόκλιση.

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας τη μονόδρομη ANOVA (One Way Anova). Η τυπική απόκλιση της ενδιάμεσης πιστότητας S_R υπολογίστηκε ως εξής:

$$S_R = \sqrt{S_f^2 + S_g^2}$$

όπου:

S_f^2 : η ενδοδειγματική διακύμανση (within groups MS)

S_g^2 : η διαδειγματική διακύμανση (between groups variance), η οποία ισούται με:

$$S_g^2 = (\text{διαδειγματική διακύμανση MS} \times (k,n) - S_f^2 \times (k,n))$$

εάν $S_f^2 \times (k,n) >$ διαδειγματική διακύμανση $\text{MS} \times (k,n)$, τότε $S_g^2 =$ διαδειγματική διακύμανση $\text{MS} \times (k,n)$

όπου:

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

όπου:

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

n = ο αριθμός των μετρήσεων σε κάθε σειρά j (6,3,3 σε αυτή την περίπτωση)

Συνεπώς, σε αυτή την περίπτωση, $k,n = 0,26667$.

Υπολογίστηκαν οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις % RSD_f και % RSD_R ως εξής:

$$\% RSD_f = \frac{S_f}{\text{ολικός μέσος όρος μετρήσεων}} \times 100$$

$$\% RSD_R = \frac{S_R}{\text{ολικός μέσος όρος μετρήσεων}} \times 100$$

Θα πρέπει να ισχύει $\%RSD_f \leq 2,0$ και $\%RSD_R \leq 5,0$.

Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη μελέτη της πιστότητας για τα δύο δερματικά διαλύματα που μελετώνται.

Πίνακας 5.2 Αποτελέσματα της μελέτης πιστότητας της μεθόδου προσδιορισμού της νατριούχου δικλοφαινάκης για τη σύσταση 1,5% w/w

	Εμβαδόν κορυφής δικλοφαινάκης σε πρότυπο διάλυμα	Εμβαδόν κορυφής δικλοφαινάκης σε διάλυμα ελέγχου	Συγκέντρωση διαλύματος ελέγχου ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	% περιεκτικότητα	Μέσος όρος(\pm SD)/RSD, %
	10689034	10443100	499,38	99,39	
Αναλυτής 1	10602980	10649114	499,71	101,29	
Ημέρα 1	Μέσος όρος 10646007	10679285	503,37	100,84	100,49(\pm0,85)
Όργανο 1		10459489	499,38	99,55	0,85
	$C_{\text{std}}(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ 506,00	10657363	499,71	101,37	
		10645801	503,37	100,52	
	11065232				
Αναλυτής 2	11070371	10699210	502,50	101,19	101,74(\pm0,47)
	Μέσος όρος 11067802	10846333	505,08	102,06	0,47
Όργανο 2		10810489	503,91	101,96	
	$C_{\text{std}}(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ 526,00				
	11127214				
	11146733	10837353	502,50	101,86	102,31(\pm0,41)
Ημέρα 2	Μέσος όρος 11136974	10953962	505,08	102,43	0,40
		10952178	503,91	102,65	
	$C_{\text{std}}(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ 526,00				

Επαναληψιμότητα %RSD = 0,85

%RSD_f = 0,69

Ενδιάμεση πιστότητα %RSD_R = 1,2

Με βάση τα παραπάνω αποδεικνύεται ότι %RSD_f \leq 2,0 και %RSD_R \leq 5,0, επομένως πληρούνται τα κριτήρια αποδοχής για την πιστότητα της μεθόδου για το δερματικό διάλυμα νατριούχου δικλοφαινάκης 1,5% w/w.

Πίνακας 5.3 Αποτελέσματα της μελέτης πιστότητας της μεθόδου προσδιορισμού της νατριούχου δικλοφαινάκης για τη σύσταση 4,0% w/v

	Εμβαδόν κορυφής δικλοφαινάκης σε πρότυπο διάλυμα	Εμβαδόν κορυφής δικλοφαινάκης σε διάλυμα ελέγχου	Συγκέντρωση διαλύματος ελέγχου ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	% περιεκτικότητα	Μέσος όρος(\pm SD)/RSD, %
	10689034	10958369	523,14	99,56	
Αναλυτής 1	10602980	10894494	516,11	100,33	
Ημέρα 1	Μέσος όρος 10646007		502,96	99,61	99,42(\pm0,55)
Όργανο 1		10869405	523,14	98,75	0,56
	$C_{\text{std}}(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ 506,00	10749453	516,11	98,99	
		10505860	502,96	99,28	
	11065232				
Αναλυτής 2	11070371	10552333	503,04	99,69	100,61(\pm0,93)
	Μέσος όρος 11067802		513,05	101,56	0,93
Όργανο 2		10737189	507,34	100,58	
	$C_{\text{std}}(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ 526,00				
	11127214				
	11146733	10671740	503,04	100,20	100,77(\pm0,61)
Ημέρα 2	Μέσος όρος 11136974		513,05	101,41	0,61
		10818020	507,34	100,71	
	$C_{\text{std}}(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ 526,00				

Επαναληψιμότητα %RSD = 0,56

%RSD_F = 0,67

Ενδιάμεση πιστότητα %RSD_R = 0,99

Με βάση τα παραπάνω αποδεικνύεται ότι %RSD_F \leq 2,0 και %RSD_R \leq 5,0, επομένως πληρούνται τα κριτήρια αποδοχής για την πιστότητα της μεθόδου για το δερματικό διάλυμα νατριούχου δικλοφαινάκης περιεκτικότητας 4,0% w/v.

5.7.4 Ακρίβεια

Για τον προσδιορισμό της ακρίβειας, για κάθε μία από τις δύο συστάσεις νατριούχου δικλοφαινάκης, παρασκευάστηκαν τρία ανεξάρτητα εμβολιασμένα διαλύματα, τα οποία περιείχαν, τόσο την προσδιοριζόμενη δραστική ουσία, όσο και τα έκδοχα

(υποκεφάλαιο 5.1), σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων, τα οποία καλύπτουν το εύρος της γραμμικότητας. Η ποσότητα του διαλύματος placebo που ζυγίστηκε για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης αντιστοιχεί στο 100 % της συγκέντρωσης εργασίας.

Τα εμβολιασμένα διαλύματα για τη σύσταση 1,5% w/w, παρασκευάστηκαν ως εξής:

- **Εμβολιασμένο διάλυμα Α (επίπεδο συγκέντρωσης δικλοφαινάκης 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, που αντιστοιχεί στο 80% της συγκέντρωσης εργασίας):** Ζυγίστηκαν με ακρίβεια, απευθείας σε ογκομετρική φιάλη των 50,0 mL, 1,667 g διαλύματος placebo. Στη συνέχεια προστέθηκαν 20,0 mg υλικού αναφοράς νατριούχου δικλοφαινάκης. Διαλύθηκαν με κινητή φάση και αραιώθηκαν με τον ίδιο διαλύτη μέχρι τη χαραγή.
- **Εμβολιασμένο διάλυμα Β (επίπεδο συγκέντρωσης δικλοφαινάκης 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, που αντιστοιχεί στο 100% της συγκέντρωσης εργασίας):** όπως το εμβολιασμένο διάλυμα Α, με τη διαφορά ότι ζυγίστηκαν 25,0 mg υλικού αναφοράς.
- **Εμβολιασμένο διάλυμα Γ (επίπεδο συγκέντρωσης δικλοφαινάκης 600 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, που αντιστοιχεί στο 120% της συγκέντρωσης εργασίας):** όπως το εμβολιασμένο διάλυμα Α, με τη διαφορά ότι ζυγίστηκαν 30,0 mg υλικού αναφοράς.

Τα εμβολιασμένα διαλύματα για τη σύσταση 4,0% w/v, παρασκευάστηκαν ως εξής:

- **Εμβολιασμένο διάλυμα Α (επίπεδο συγκέντρωσης δικλοφαινάκης 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, που αντιστοιχεί στο 80% της συγκέντρωσης εργασίας):** Ζυγίστηκαν με ακρίβεια, απευθείας σε ογκομετρική φιάλη των 50,0 mL, 0,606 g διαλύματος placebo. Στη συνέχεια προστέθηκαν 20,0 mg υλικού αναφοράς νατριούχου δικλοφαινάκης. Διαλύθηκαν με κινητή φάση και αραιώθηκαν με τον ίδιο διαλύτη μέχρι τη χαραγή.
- **Εμβολιασμένο διάλυμα Β (επίπεδο συγκέντρωσης δικλοφαινάκης 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, που αντιστοιχεί στο 100% της συγκέντρωσης εργασίας):** όπως το εμβολιασμένο διάλυμα Α, με τη διαφορά ότι ζυγίστηκαν 25,0 mg υλικού αναφοράς.
- **Εμβολιασμένο διάλυμα Γ (επίπεδο συγκέντρωσης δικλοφαινάκης 600 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, που αντιστοιχεί στο 120% της συγκέντρωσης εργασίας):** όπως το

εμβολιασμένο διάλυμα Α, με τη διαφορά ότι ζυγίστηκαν 30,0 mg υλικού αναφοράς.

Επίσης, παρασκευάστηκε ένα πρότυπο διάλυμα νατριούχου δικλοφαινάκης σύμφωνα με το πρωτόκολλο της μεθόδου. Υπολογίστηκε η % ανάκτηση κάθε εμβολιασμένου διαλύματος στα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων, για κάθε μία από τις δύο συστάσεις, σε σχέση με το πρότυπο διάλυμα, καθώς και η %RSD των ανακτήσεων σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης.

Η % ανάκτηση υπολογίστηκε ως εξής:

$$\% \text{ Ανάκτηση} = \frac{\% \text{ περιεκτικότητα δικλοφαινάκης}}{\% \text{ ενίσχυση}} \times 100$$

Για να κριθεί η μέθοδος ως ακριβής, θα πρέπει οι τιμές της % ανάκτησης να βρίσκονται μεταξύ 98-102% και η %RSD των ανακτήσεων σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης να είναι $\leq 2,0$.

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων από τη μελέτη της ακρίβειας της μεθόδου.

Πίνακας 5.4 Αποτελέσματα της μελέτης ακρίβειας της μεθόδου προσδιορισμού της νατριούχου δικλοφαινάκης για τη σύσταση 1,5% w/w

Εμβολ. δ/μα	Εμβαδόν δικλοφαινάκης σε πρότυπο διάλυμα (C _{std} = 526,0 μg · mL ⁻¹)	Εμβαδόν δικλοφαινάκης σε εμβολιασμένο διάλυμα	% Ενίσχυση	% Ανάκτηση	Μέσος όρος (±SD)/ RSD, %
Α		8256284		99,80	100,51 (±0,80) 0,80
		8302889	78,40	100,36	
		8387579		101,39	
Β	11002576	10167936		98,32	98,25 (±0,15) 0,15
	11148594	10169506	98,00	98,34	
	11151867	10141860		98,07	
Γ	Μέσος όρος	10552293		101,82	100,98 (±0,73) 0,72
		12763969	118,80	100,64	
		12615799		100,49	
		12597570			

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι η % ανάκτηση βρίσκεται μεταξύ 98,07-101,82% και η %RSD είναι $\leq 0,80$. Επομένως, η μέθοδος είναι ακριβής για τον ποσοτικό προσδιορισμό της δικλοφαινάκης στο σκεύασμα περιεκτικότητας 1,5% w/w.

Πίνακας 5.5 Αποτελέσματα της μελέτης ακρίβειας της μεθόδου προσδιορισμού της νατριούχου δικλοφαινάκης για τη σύσταση 4,0% w/v

Εμβολ. δ/μα	Εμβασδόν δικλοφαινάκης σε πρότυπο διάλυμα ($C_{std} = 526,0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Εμβασδόν δικλοφαινάκης σε εμβολιασμένο διάλυμα	% Ενίσχυση	% Ανάκτηση	Μέσος όρος (\pm SD)/ RSD, %
Α		8986298		100,85	
		9052013	80,95	101,59	101,26 (\pm0,37)
		9029573		101,33	0,37
Β	11002576	11130705		99,85	
	11148594	11235342	100,45	100,79	100,39 (\pm0,48)
	11151867	11206487		100,53	0,48
Γ	Μέσος όρος	10552293		99,47	
		12965934		99,66	99,53 (\pm0,11)
		12990254	120,15	99,48	0,11
		12966685			

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι η % ανάκτηση βρίσκεται μεταξύ 99,47-101,59% και η %RSD είναι $\leq 0,48$. Επομένως, η μέθοδος είναι ακριβής για τον ποσοτικό προσδιορισμό της δικλοφαινάκης στο σκεύασμα περιεκτικότητας 4,0% w/v.

5.7.5 Εύρος

Από τις μελέτες γραμμικότητας και ακρίβειας προκύπτει ότι το εύρος συγκεντρώσεων είναι $400 - 600 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, το οποίο αντιστοιχεί στο 80 – 120% της συγκέντρωσης εργασίας.

5.7.6 Ανθεκτικότητα

Η μελέτη της ανθεκτικότητας πραγματοποιείται κατά τη φάση της ανάπτυξης της μεθόδου. Σκοπός της είναι να αποδειχτεί η αντοχή της μεθόδου σε διάφορες μεταβολές των πειραματικών παραμέτρων και να εντοπιστεί ποιες από αυτές επηρεάζουν περισσότερο τη μέθοδο.

I. Για τη μελέτη της ανθεκτικότητας παρασκευάστηκε διάλυμα, όπως ακριβώς για τον έλεγχο καταλληλότητας του συστήματος. Έτσι, μικρή ποσότητα υλικού αναφοράς (CRS) νατριούχου δικλοφαινάκης, το οποίο περιείχε και τις προσμίξεις Α και Β, διαλύθηκε σε κινητή φάση. Στη συνέχεια, έγινε η εκτίμηση της επίδρασης των παρακάτω παραγόντων στην ανθεκτικότητα της μεθόδου:

- Ταχύτητα ροής της κινητής φάσης
- pH ρυθμιστικού διαλύματος
- Αναλογία σύστασης κινητής φάσης ρυθμιστικού διαλύματος/MeOH

Συγκεκριμένα, έγιναν οι ακόλουθες μεταβολές:

Παράγοντας Α: Ταχύτητα ροής κινητής φάσης +επίπεδο: 1,0 -επίπεδο: 1,1
(mL/min)

Παράγοντας Β: pH ρυθμιστικού διαλύματος +επίπεδο: 2,5 -επίπεδο: 2,2

Παράγοντας Γ: Αναλογία ρυθμιστικού/MeOH +επίπεδο: 34/66 -επίπεδο: 32/68

Για να κριθεί η μέθοδος ως ανθεκτική, θα πρέπει η διαχωριστικότητα (R_s) μεταξύ των κορυφών της πρόσμιξης F και της δικλοφαινάκης, έπειτα από κάθε μεταβολή, να είναι τουλάχιστον 4,0.

Πίνακας 5.6 Πειραματικός σχεδιασμός μελέτης ανθεκτικότητας

Παράγοντες			Πείραμα	Διαχωριστικότητα μεταξύ των κορυφών της πρόσμιξης F και της δικλοφαινάκης
A	B	Γ		
+	+	+	Y1	9,0
-	-	+	Y2	9,0
+	-	-	Y3	8,1
-	+	-	Y4	7,0

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι και για τις τρεις μεταβολές που έγιναν, ισχύει ότι $R_s > 4$, επομένως δεν επηρεάζουν σημαντικά τη μέθοδο.

II. Σταθερότητα διαλυμάτων

Για τον έλεγχο της σταθερότητας, παρασκευάστηκαν διαλύματα ελέγχου για τις δύο συστάσεις, τα οποία αναλύθηκαν αμέσως μετά την παρασκευή τους και στη συνέχεια, μετά από 24 ώρες αποθήκευσής τους στους 25 °C. Επίσης παρασκευάστηκε ένα πρότυπο διάλυμα νατριούχου δικλοφαινάκης.

Για να αποδειχτεί η σταθερότητα των διαλυμάτων, θα πρέπει οι τιμές της % ανάκτησης έναντι της αρχικής περιεκτικότητας στο φρέσκο διάλυμα να βρίσκονται μεταξύ 98-102% και η %RSD των τιμών ανάκτησης να είναι $\leq 2,0$.

Πίνακας 5.7 Αποτελέσματα της μελέτης σταθερότητας της μεθόδου προσδιορισμού της νατριούχου δικλοφαινάκης για τη σύσταση 1,5% w/w

	Εμβαδόν κορυφής δικλοφαινάκης σε πρότυπο διάλυμα ($C_{std} = 506,0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Εμβαδόν κορυφής δικλοφαινάκης σε διάλυμα ελέγχου	Συγκέντρωση διαλύματος ελέγχου ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	% περιεκτικότητα
Φρέσκο διάλυμα	10689034	10443100	499,38	99,39
	10602980	10649114	499,71	101,29
	Μέσος όρος	10646007	10679285	503,37
Μετά από 24 ώρες	10726433	10558585	499,38	99,81
	10710710	10858978	499,71	102,59
	Μέσος όρος	10718572	10744202	503,37

	% Ανάκτηση έναντι φρέσκου δ/ματος
1	100,42
2	101,28
3	99,93
Μέσος όρος (\pm SD), RSD, %	100,54 (\pm0,68), 0,68

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι τα διαλύματα ελέγχου νατριούχου δικλοφαινάκης 1,5% w/w παραμένουν σταθερά για τουλάχιστον 24 ώρες.

Πίνακας 5.8 Αποτελέσματα της μελέτης σταθερότητας της μεθόδου προσδιορισμού της νατριούχου δικλοφαινάκης για τη σύσταση 4,0% w/v

	Εμβαδόν κορυφής δικλοφαινάκης σε πρότυπο διάλυμα ($C_{std} = 506,0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Εμβαδόν κορυφής δικλοφαινάκης σε διάλυμα ελέγχου	Συγκέντρωση διαλύματος ελέγχου ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	% περιεκτικότητα
Φρέσκο διάλυμα	10689034	10958369	523,14	99,56
	10602980	10894494	516,11	100,33
	Μέσος όρος	10646007	10540306	502,96
Μετά από 24ώρες	10726433	11025467	523,14	99,49
	10710710	10871119	516,11	99,44
	Μέσος όρος	10718572	10607632	502,96

	% Ανάκτηση έναντι φρέσκου δ/ματος
1	99,93
2	99,11
3	99,96
Μέσος όρος (\pm SD), RSD, %	99,67 (\pm0,48), 0,48

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι τα διαλύματα ελέγχου νατριούχου δικλοφαινάκης 4,0% w/v παραμένουν σταθερά για τουλάχιστον 24 ώρες.

Έπειτα από τις παραπάνω μελέτες, η μέθοδος κρίνεται ως ανθεκτική.

5.8 Συμπέρασμα

Από την αξιολόγηση των παραπάνω χαρακτηριστικών ποιότητας της μεθόδου, κρίθηκε ότι η μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού νατριούχου δικλοφαινάκης 1,5% w/w και 4,0 w/v σε δερματικό διάλυμα ικανοποιεί όλες τις απαιτήσεις και επομένως, είναι κατάλληλη για τον σκοπό για τον οποίο αναπτύχθηκε.

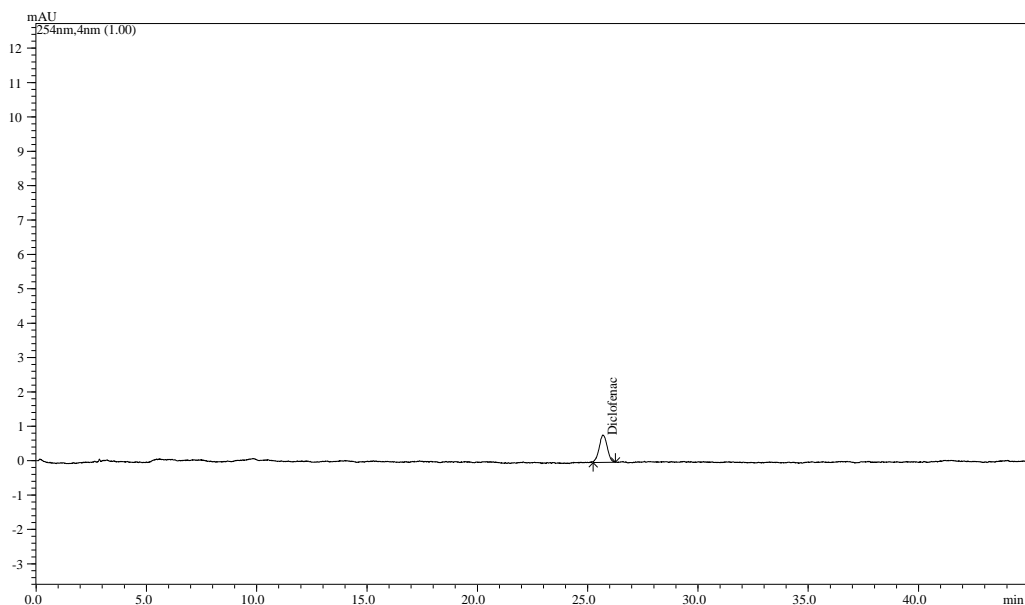
6. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ ΤΗΣ ΝΑΤΡΙΟΥΧΟΥ ΔΙΚΛΟΦΑΙΝΑΚΗΣ ΣΕ ΔΕΡΜΑΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ

6.1 Ανάπτυξη μεθόδου

Η ανάπτυξη της μεθόδου προσδιορισμού της νατριούχου δικλοφαινάκης, έγινε με βάση τη μέθοδο που προτείνει η Ε.Φ. για τον προσδιορισμό των προσμίξεων της σε πρώτη ύλη, αλλάζοντας την προτεινόμενη συγκέντρωση εργασίας. Έτσι, κατά τη μελέτη ανάπτυξης της μεθόδου προσδιορισμού των προσμίξεων της νατριούχου δικλοφαινάκης, οι χρωματογραφικές παράμετροι και η συγκέντρωση εργασίας, παρέμειναν ίδιες με αυτές που εφαρμόστηκαν για τον προσδιορισμό της δραστικής ουσίας στα σκευάσματα. Αυτό που έπρεπε να αποδειχτεί, πριν την επικύρωση της μεθόδου, ήταν ότι με αυτές τις πειραματικές συνθήκες και σε συγκέντρωση εργασίας 500 ppm, η μορφή των κορυφών των προσμίξεων, στα όρια που τίθενται από την Ε.Φ., ήταν αποδεκτή και ότι δεν υπήρχε παρεμπόδιση των κορυφών αυτών από τις κορυφές του διαλύματος placebo. Σύμφωνα με την Ε.Φ. τίθενται τα εξής όρια:

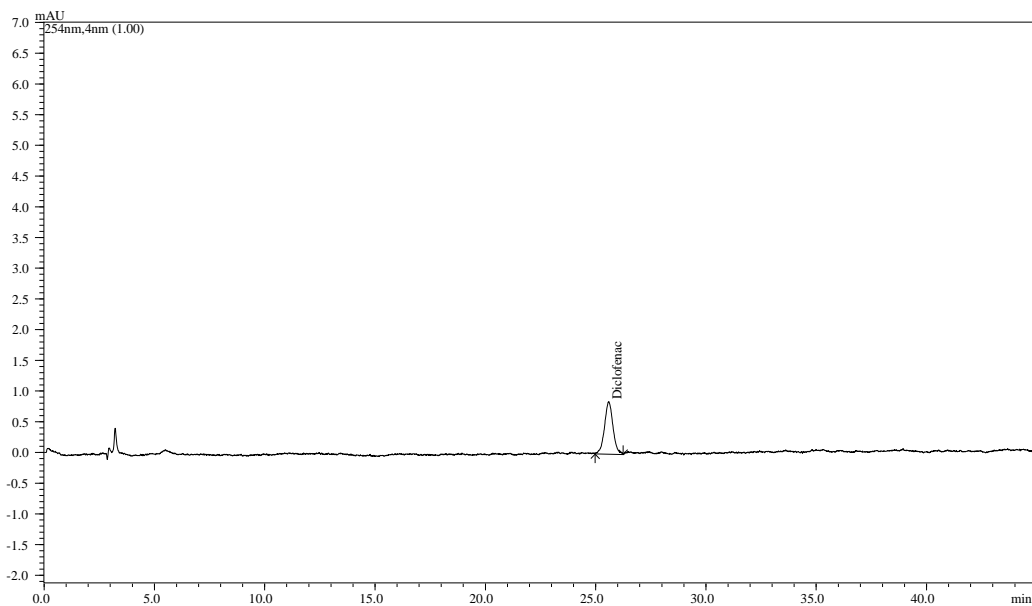
- Πρόσμιξη Α: το μέγιστο αποδεκτό όριο είναι 0,2% της συγκέντρωσης εργασίας
- Πρόσμιξη F: το μέγιστο αποδεκτό όριο είναι 0,15% της συγκέντρωσης εργασίας
- Υπόλοιπες προσμίξεις: για κάθε πρόσμιξη το μέγιστο αποδεκτό όριο είναι 0,10% της συγκέντρωσης εργασίας
- Σύνολο προσμίξεων: 0,4% της συγκέντρωσης εργασίας
- Κατώτατο όριο αναφοράς: 0,05% της συγκέντρωσης εργασίας

Από τα διαλύματα ελέγχου για τις δύο περιεκτικότητες νατριούχου δικλοφαινάκης (1,5% w/w και 4,0% w/v), η παρασκευή των οποίων περιγράφηκε στο εδάφιο 5.3.2, παρασκευάστηκαν ένα διάλυμα αναφοράς σε συγκέντρωση 0,2% και ένα διάλυμα στο 0,05% της συγκέντρωσης εργασίας. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων αυτών αντιστοιχούν στο μέγιστο αποδεκτό όριο για την πρόσμιξη Α και στο κατώτατο όριο αναφοράς, αντίστοιχα. Από τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν, και τα οποία παρατίθενται στη συνέχεια, φαίνεται ότι υπήρξε ικανοποιητική απόκριση της ουσίας στα όρια αυτά.



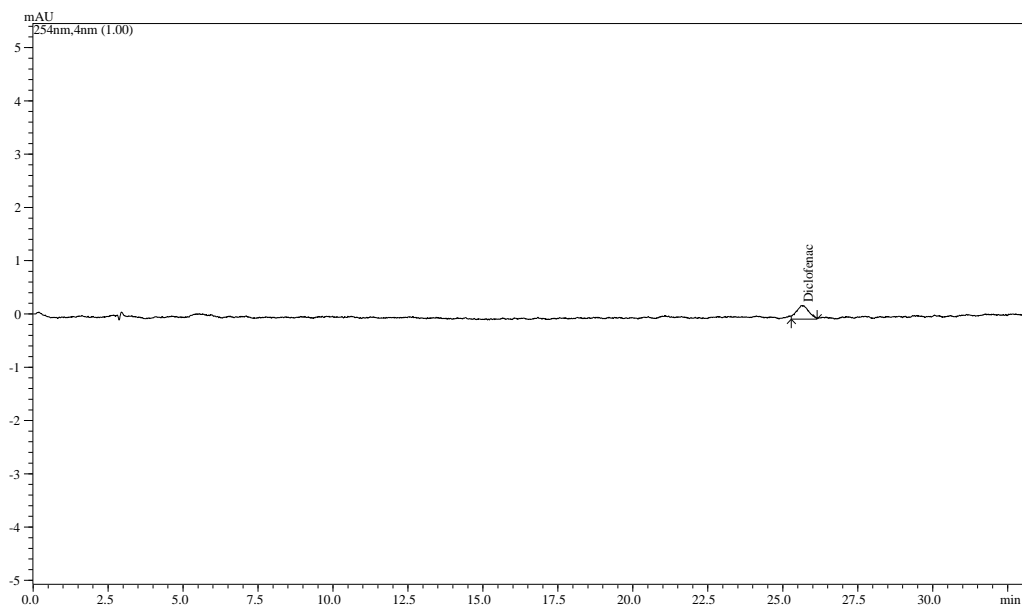
Ουσία	t _R (min)	Εμβαδόν κορυφής	Tailing Factor	Θεωρητικές πλάκες
Δικλοφαινάκη	25,690	20179	1,04	22897

Εικόνα 6.1 Χρωματογράφημα και πίνακας δεδομένων διαλύματος αναφοράς 0,2% για τη σύσταση νατριούχου δικλοφαινάκης 1,5% w/w



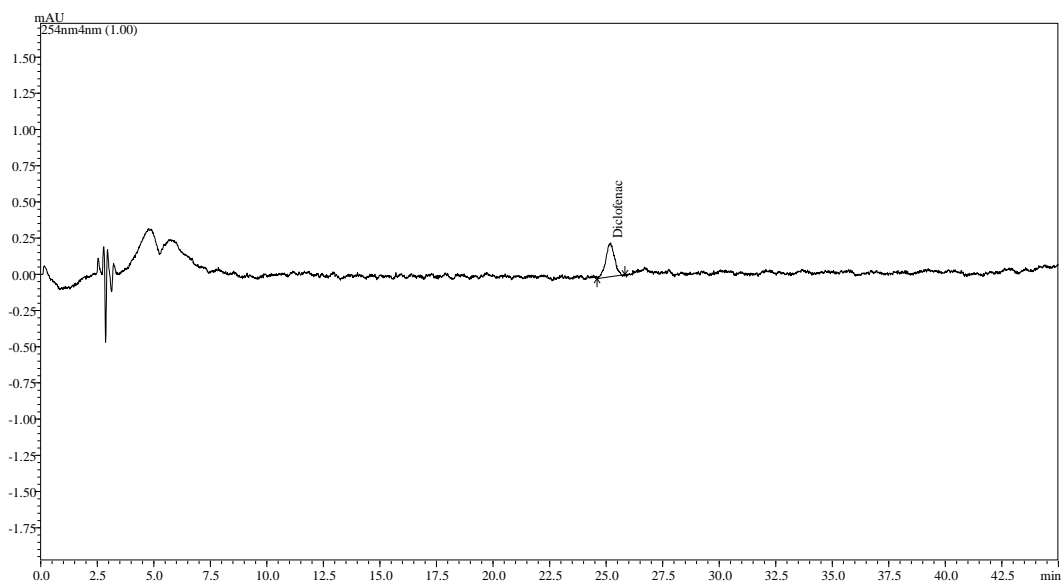
Ουσία	t _R (min)	Εμβαδόν κορυφής	Tailing Factor	Θεωρητικές πλάκες
Δικλοφαινάκη	25,596	22970	1,00	22142

Εικόνα 6.2 Χρωματογράφημα και πίνακας δεδομένων διαλύματος αναφοράς 0,2% για τη σύσταση νατριούχου δικλοφαινάκης 4,0% w/v



Ουσία	t _R (min)	Εμβαδόν κορυφής	Tailing Factor	Θεωρητικές πλάκες
Δικλοφαινάκη	25,643	7298	--	17465

Εικόνα 6.3 Χρωματογράφημα και πίνακας δεδομένων για το διάλυμα 0,05% για τη σύσταση νατριούχου δικλοφαινάκης 1,5% w/w



Ουσία	t _R (min)	Εμβαδόν κορυφής	Tailing Factor	Θεωρητικές πλάκες
Δικλοφαινάκη	25,199	6123	0,96	20104

Εικόνα 6.4 Χρωματογράφημα και πίνακας δεδομένων για το διάλυμα 0,05% για τη σύσταση νατριούχου δικλοφαινάκης 4,0% w/v

Επίσης, μελετήθηκε η πιθανή παρεμπόδιση της κορυφής της πρόσμιξης A από τις κορυφές του διαλύματος placebo, οι οποίες προέρχονται από τα έκδοχα των

διαλυμάτων, τα οποία αναφέρονται στο υποκεφάλαιο 5.1. Στο δερματικό διάλυμα περιεκτικότητας νατριούχου δικλοφαινάκης 1,5% w/w υπάρχει η πρόσμιξη Α, οπότε ο έλεγχος για την εκλεκτικότητα της μεθόδου έγινε από τη σύγκριση των χρωματογραφημάτων του διαλύματος ελέγχου και του διαλύματος placebo. Για το δερματικό διάλυμα περιεκτικότητας νατριούχου δικλοφαινάκης 4,0% w/v, παρασκευάστηκε διάλυμα ελέγχου εμβολιασμένο με ποσότητα πρόσμιξης Α και το χρωματογράφημα συγκρίθηκε με αυτό του διαλύματος placebo. Και στις δύο περιπτώσεις παρατηρήθηκε ότι υπάρχει καλός διαχωρισμός μεταξύ των κορυφών και δεν υπάρχει παρεμπόδιση από τις κορυφές του διαλύματος placebo.

Επομένως, για τον ποσοτικό προσδιορισμό των προσμίξεων, μπορεί να εφαρμοστεί η ίδια μέθοδος που αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό της νατριούχου δικλοφαινάκης. Το διάλυμα αναφοράς 0,2% θα χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση των προσμίξεων.

6.2 Παρασκευή διαλυμάτων

6.2.1 Παρασκευή διαλυμάτων ελέγχου (test solutions)

Όπως περιγράφεται στο εδάφιο 5.3.2.

6.2.2 Παρασκευή διαλύματος αναφοράς 0,2% (reference solution)

Ποσότητα 2,0 mL διαλύματος ελέγχου μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100,0 mL και αραιώθηκε με κινητή φάση μέχρι τη χαραγή. Το διάλυμα αναδεύτηκε καλά. Στη συνέχεια, 1,0 mL από το διάλυμα αυτό μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 10,0 mL. Έγινε αραιώση με κινητή φάση μέχρι τη χαραγή και ακολούθησε καλή ανάδευση.

6.3 Ποσοτικοποίηση

Η % περιεκτικότητα της κάθε πρόσμιξης της νατριούχου δικλοφαινάκης υπολογίζεται με βάση την παρακάτω εξίσωση:

$$\% \text{ περιεκτικότητα} = \frac{A_{\text{προσμ.}}}{A_{\text{αναφ.}}} \times \Pi\Delta \times 0,2\%$$

$A_{\text{προσμ.}}$ = Το εμβαδόν της κορυφής κάθε πρόσμιξης της νατριούχου δικλοφαινάκης στο χρωματογράφημα του διαλύματος ελέγχου

$A_{\text{αναφ}}$ = Το εμβαδόν της κορυφής της νατριούχου δικλοφαινάκης στο χρωματογράφημα του διαλύματος αναφοράς 0,2%

ΠΔ = Ο παράγοντας διόρθωσης (CF= Correction Factor) σύμφωνα με την Ε.Φ. για τις προσμίξεις της νατριούχου δικλοφαινάκης (Πίνακας 6.1)

Πίνακας 6.1 Πίνακας με τους παράγοντες διόρθωσης για τις προσμίξεις της νατριούχου δικλοφαινάκης

	ΠΔ
Πρόσμιξη Α	0,7
Πρόσμιξη F	0,3
Οποιαδήποτε άλλη πρόσμιξη	1,0

6.4 Χρωματογραφικές παράμετροι

Οι χρωματογραφικές παράμετροι είναι ίδιες με αυτές της μεθόδου προσδιορισμού της νατριούχου δικλοφαινάκης και περιγράφονται στο υποκεφάλαιο 5.5.

6.5 Ταυτοποίηση

Η ταυτοποίηση των προσμίξεων Α και F έγινε με σύγκριση του χρωματογραφήματος που προέκυψε από το διάλυμα ελέγχου για τον έλεγχο καταλληλότητας του συστήματος και του χρωματογραφήματος που παρέχεται με το υλικό αναφοράς (CRS) νατριούχου δικλοφαινάκης για τον έλεγχο καταλληλότητας του συστήματος.

6.6 Έλεγχος καταλληλότητας του συστήματος (System Suitability)

Για τον έλεγχο καταλληλότητας του συστήματος χρησιμοποιήθηκε το ίδιο διάλυμα με αυτό που χρησιμοποιήθηκε για τη δραστική ουσία. Το κριτήριο αποδοχής είναι η διαχωριστικότητα μεταξύ των κορυφών της πρόσμιξης F και της δικλοφαινάκης να είναι $\geq 4,0$. Από το χρωματογράφημα, το οποίο παρουσιάζεται στο υποκεφάλαιο 5.2 (εικόνα 5.1), φαίνεται ότι η διαχωριστικότητα μεταξύ των δύο αυτών κορυφών είναι 9,0, οπότε ικανοποιείται το κριτήριο για την καταλληλότητα του συστήματος.

6.7 Επικύρωση της μεθόδου

6.7.1 Ειδικότητα

Για τον έλεγχο της ειδικότητας της μεθόδου για τον προσδιορισμό των προσμίξεων παρασκευάστηκαν διαλύματα placebo, για τις δύο περιεκτικότητες που εξετάζονται, με διαδικασία η οποία περιγράφεται στο εδάφιο 5.7.1.

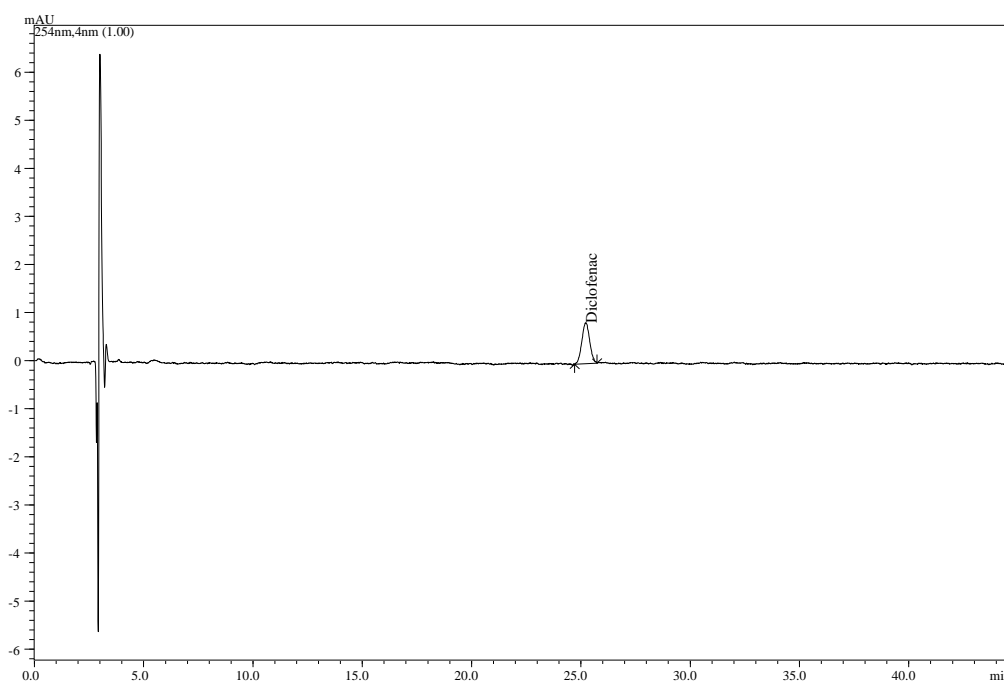
Επίσης παρασκευάστηκε εμβολιασμένο διάλυμα Β και για τις δύο συστάσεις, με διαδικασία η οποία περιγράφεται αναλυτικά στο εδάφιο 6.7.4.

Τα κριτήρια αποδοχής για την ειδικότητα της μεθόδου είναι τα εξής:

1. Στα χρωματογραφήματα των διαλυμάτων placebo να μην εμφανίζονται κορυφές στους ίδιους χρόνους που εμφανίζονται οι κορυφές των προσμίξεων της δικλοφαινάκης
2. Η καθαρότητα της κορυφής της δικλοφαινάκης στο χρωματογράφημα του εμβολιασμένου διαλύματος B στο φάσμα UV να είναι $\geq 0,98$
3. Στο χρωματογράφημα του διαλύματος που παρασκευάστηκε για τον έλεγχο καταλληλότητας του συστήματος, η διαχωριστικότητα μεταξύ των κορυφών της πρόσμιξης F και της δικλοφαινάκης να είναι τουλάχιστον 4,0.

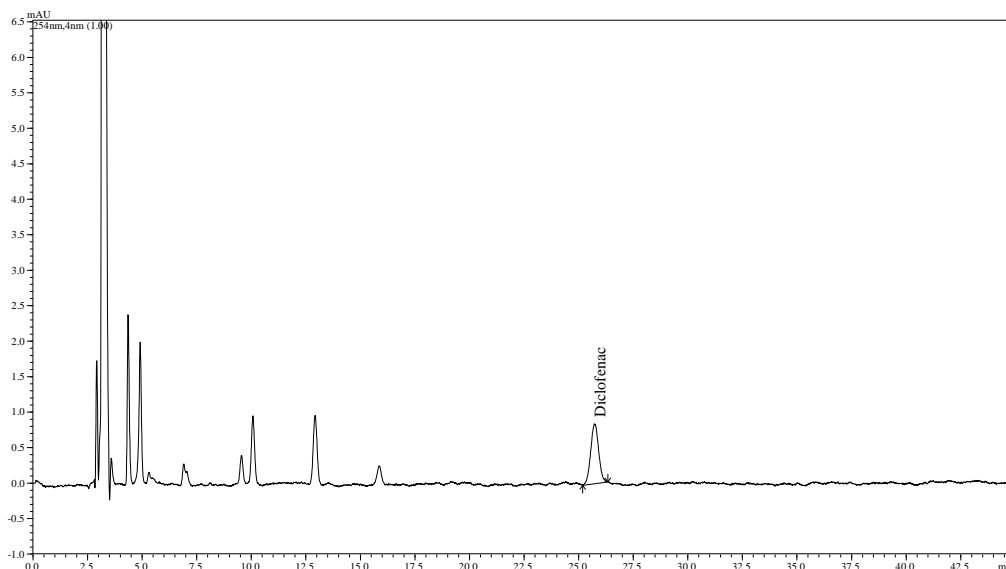
Το τρίτο κριτήριο ικανοποιείται, όπως ήδη αναφέρθηκε στο υποκεφάλαιο 6.6.

Από τα χρωματογραφήματα των διαλυμάτων placebo, τα οποία έχουν παρουσιαστεί στο εδάφιο 5.7.1, φαίνεται ότι δεν εμφανίστηκε κορυφή στους χρόνους κατακράτησης των προσμίξεων, δηλαδή στα 11,4 min (χρόνος κατακράτησης για την πρόσμιξη A) και στα 20,3 min (χρόνος κατακράτησης για την πρόσμιξη F), ενώ η καθαρότητα της κορυφής της δικλοφαινάκης στο εμβολιασμένο διάλυμα B στο φάσμα UV ήταν $> 0,98$, όπως φαίνεται από τα παρακάτω χρωματογραφήματα.



Ουσία	tr (min)	Εμβαδόν κορυφής	Tailing Factor	Καθαρότητα κορυφής
Δικλοφαινάκη	25,223	21363	1,02	0,99

Εικόνα 6.5 Χρωματογράφημα και πίνακας δεδομένων κορυφής για το εμβολιασμένο διάλυμα Β για τη σύσταση νατριούχου δικλοφαινάκης 1,5% w/w



Ουσία	tr (min)	Εμβαδόν κορυφής	Tailing Factor	Καθαρότητα κορυφής
Δικλοφαινάκη	25,735	21352	1,02	0,99

Εικόνα 6.6 Χρωματογράφημα και πίνακας δεδομένων κορυφής για το εμβολιασμένο διάλυμα Β για τη σύσταση νατριούχου δικλοφαινάκης 4,0% w/v

Επομένως πληρούνται όλα τα κριτήρια και η μέθοδος χαρακτηρίζεται ως ειδική.

6.7.2 Γραμμικότητα

Λόγω ελλείψεως καθαρών προτύπων ουσιών προσμίξεων σε ικανοποιητική ποσότητα, χρησιμοποιήθηκε πρότυπο νατριούχου δικλοφαινάκης για την επικύρωση της μεθόδου προσδιορισμού των προσμίξεων, πρακτική που χρησιμοποιείται ευρέως στις μεθόδους της Φαρμακοποιίας. Για τον έλεγχο της γραμμικότητας παρασκευάστηκαν πέντε πρότυπα διαλύματα νατριούχου δικλοφαινάκης, σε συγκεντρώσεις που καλύπτουν ομοιόμορφα την περιοχή 0,05-1,0% της συγκέντρωσης εργασίας. Ο έλεγχος γραμμικότητας είναι κοινός και για τα δύο δερματικά διαλύματα που μελετώνται. Αρχικά παρασκευάστηκε ένα πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης 100 μg/mL νατριούχου δικλοφαινάκης σε κινητή φάση.

Από το διάλυμα παρακαταθήκης παρασκευάστηκαν τα παρακάτω πρότυπα διαλύματα:

- A. 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (το οποίο αντιστοιχεί στο 0,05% της συγκέντρωσης εργασίας): 0,050 mL προτύπου διαλύματος παρακαταθήκης μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 20,0 mL και αραιώθηκαν μέχρι τη χαραγή με κινητή φάση
- B. 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (το οποίο αντιστοιχεί στο 0,1% της συγκέντρωσης εργασίας): όπως το διάλυμα A, χρησιμοποιώντας 0,10 mL προτύπου διαλύματος
- Γ. 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (το οποίο αντιστοιχεί στο 0,2% της συγκέντρωσης εργασίας): 0,10 mL προτύπου διαλύματος παρακαταθήκης μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 10,0 mL και αραιώθηκαν μέχρι τη χαραγή με κινητή φάση
- Δ. 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (το οποίο αντιστοιχεί στο 0,5% της συγκέντρωσης εργασίας): όπως το διάλυμα Γ, χρησιμοποιώντας 0,25 mL προτύπου διαλύματος
- E. 5,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (το οποίο αντιστοιχεί στο 1,0% της συγκέντρωσης εργασίας): όπως το διάλυμα Γ, χρησιμοποιώντας 0,50 mL προτύπου διαλύματος

Για καθένα από τα παραπάνω πρότυπα διαλύματα έγιναν τρεις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των εμβαδών των κορυφών, η τυπική απόκλιση και η σχετική τυπική απόκλιση.

Ο μέσος όρος των εμβαδών των κορυφών χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης. Επίσης, κατασκευάστηκε το διάγραμμα των υπολοίπων (residuals plot) για τον έλεγχο της εμφάνισης έκτροπων τιμών. Στη συνέχεια παρατίθενται ο πίνακας με τα αποτελέσματα των μετρήσεων, η γραφική παράσταση της καμπύλης βαθμονόμησης και το διάγραμμα των υπολοίπων.

Πίνακας 6.2 Αποτελέσματα της μελέτης γραμμικότητας της μεθόδου προσδιορισμού των προσμίξεων της νατριούχου δικλοφαινάκης

% συγκέντρωση εργασίας προτύπου διαλύματος	Συγκέντρωση προτύπου διαλύματος δικλοφαινάκης ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Εμβαδόν κορυφής	Μέσος όρος (\pmSD)/ %RSD
0,05	0,25	5697	56,63 (\pm0,43) x 10² 0,77
		5614	
		5678	
0,1	0,50	11117	111,6 (\pm1,0) x 10² 0,91
		11088	
		11276	
0,2	1,00	18305	183,9 (\pm1,2) x 10² 0,66
		18334	
		18529	
0,5	2,50	33650	336,61 (\pm0,82) x 10² 0,24
		33585	
		33747	
1,0	5,00	66147	657,4 (\pm3,7) x 10² 0,57
		65668	
		65405	

Η ευθεία παλινδρόμησης που προκύπτει είναι η εξής:

$$y = 12,25 (\pm 0,43) \times 10^3 x + 4,3 (\pm 1,1) \times 10^3$$

Μονάδες τομής στον άξονα των y: Μονάδες εμβαδού

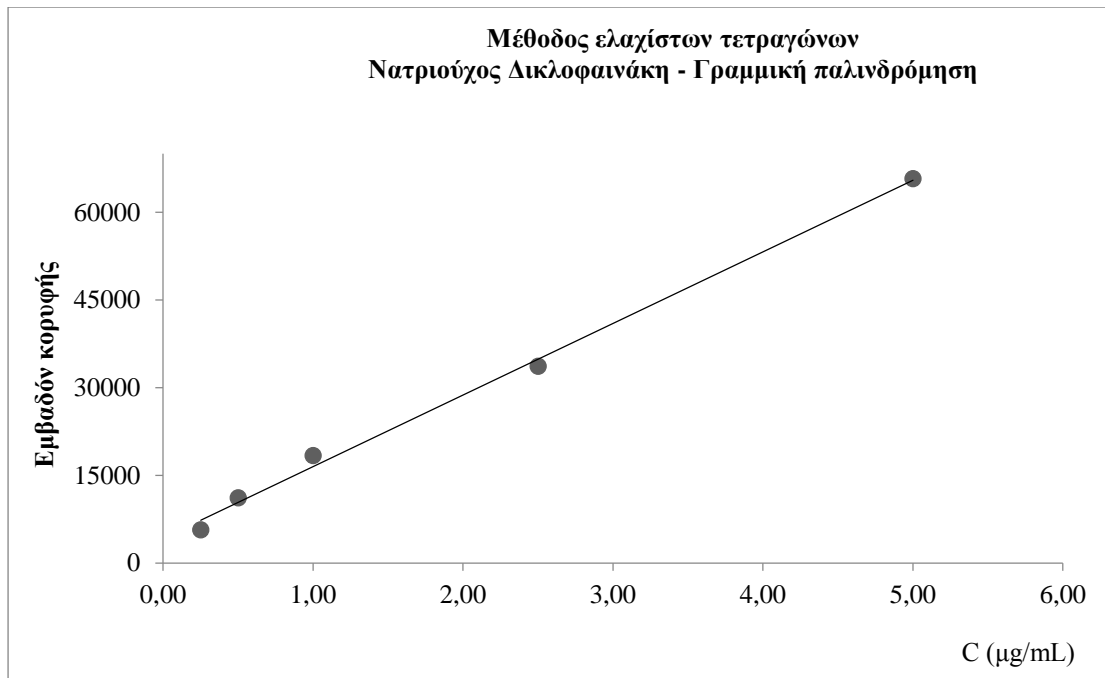
Μονάδες κλίσης: Μονάδες εμβαδού $\cdot \text{mL} \cdot \mu\text{g}^{-1}$

Συντελεστής συσχέτισης (r) : 0,998

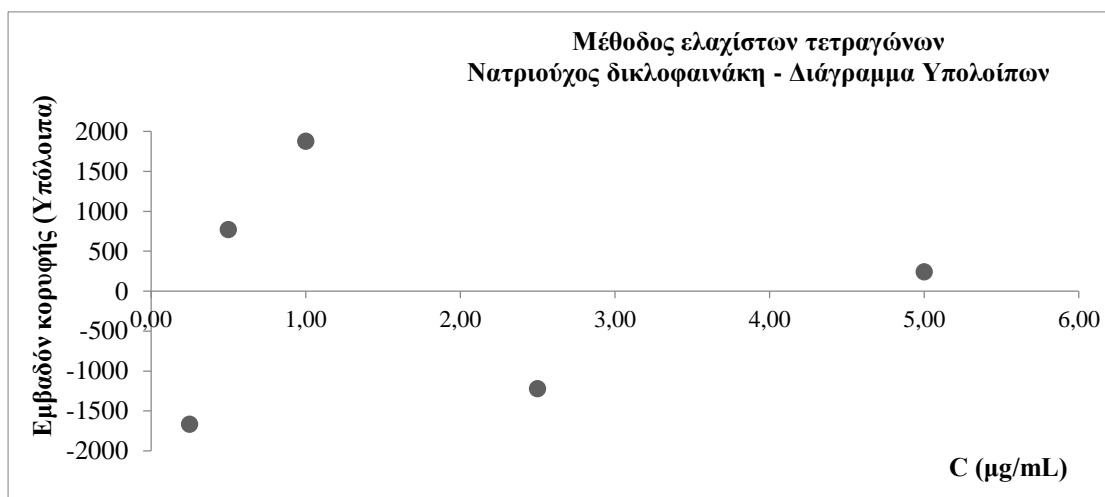
Ελέγχεται εάν η ευθεία παλινδρόμησης διέρχεται από το μηδέν:

$$t_{\text{πειρ}} = \frac{\text{τομή}}{S_a} = \frac{4,3}{1,1} = 3,9 > 3,18 = t_{\text{θεωρ}}, \text{ για } n = 3 \text{ βαθμούς ελευθερίας και σε στάθμη}$$

εμπιστοσύνης 95%. Η ευθεία οριακά δε διέρχεται από το μηδέν, αλλά το σφάλμα που προκαλείται με χρήση της μεθόδου ενός προτύπου δεν είναι σημαντικό, εάν χρησιμοποιηθεί πρότυπο σε συγκέντρωση παρόμοια των προσμίξεων.



Εικόνα 6.7 Γραφική παράσταση της καμπύλης βαθμονόμησης της μεθόδου προσδιορισμού των προσμίξεων της νατριούχου δικλοφαινάκης



Εικόνα 6.8 Διάγραμμα υπολοίπων της μεθόδου προσδιορισμού των προσμίξεων της νατριούχου δικλοφαινάκης

Η προϋπόθεση για τη γραμμικότητα της μεθόδου είναι ο συντελεστής συσχέτισης να είναι $\geq 0,99$. Βρέθηκε ίσος με 0,998, επομένως η μέθοδος χαρακτηρίζεται από γραμμικότητα.

6.7.3 Πιστότητα

Πιστότητα Συστήματος

Όπως περιγράφεται στο εδάφιο 5.7.3. Το %RSD θα πρέπει να είναι $\leq 2,0$.

Από τον πίνακα 6.2 προκύπτει ότι $\%RSD \leq 0,91$, οπότε βρίσκεται εντός του αποδεκτού ορίου.

Επαναληψιμότητα

Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας παρασκευάστηκαν έξι εμβολιασμένα διαλύματα Β στο 0,2% της συγκεντρώσεως εργασίας, με διαδικασία η οποία περιγράφεται στο εδάφιο 6.7.4, για κάθε μία από τις δύο συστάσεις ξεχωριστά. Επίσης, παρασκευάστηκε ένα διάλυμα αναφοράς 0,2%. Στη συνέχεια, έγιναν οι μετρήσεις των παραπάνω διαλυμάτων και υπολογίστηκαν η % ανάκτηση και η % σχετική τυπική απόκλιση.

Η % ανάκτηση υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\% \text{ ανάκτηση} = \frac{\% \text{περιεκτικότητα πρόσμιξης}}{\% \text{επίπεδο εμβολιασμού}} \times 100$$

Για να θεωρηθεί επαναλήψιμη η μέθοδος θα πρέπει για κάθε εμβολιασμένο διάλυμα η % ανάκτηση να βρίσκεται μεταξύ 95,0-105,0% και η $\%RSD \leq 5,0$.

Ενδιάμεση πιστότητα (Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα)

Για να ελεγχθεί η ενδιάμεση πιστότητα γίνονται δύο επιπλέον μελέτες επαναληψιμότητας, με μετρήσεις οι οποίες έγιναν: α) σε διαφορετική ημέρα και β) από διαφορετικό αναλυτή και σε διαφορετικό όργανο, με τις ίδιες συνθήκες ανάλυσης. Για την πραγματοποίηση αυτών των μελετών παρασκευάστηκαν ένα διάλυμα αναφοράς 0,2% και τρία ανεξάρτητα εμβολιασμένα διαλύματα Β, με την ίδια διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας της μεθόδου, για τις δύο συστάσεις. Στη συνέχεια υπολογίστηκαν η % περιεκτικότητα και η % σχετική τυπική απόκλιση.

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας τη μονόδρομη ANOVA (One Way Anova) και υπολογίστηκαν οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις $\%RSD_f$ και $\%RSD_R$ από τους τύπους που αναφέρονται στο εδάφιο 5.7.3.

Τα κριτήρια αποδοχής για τη μελέτη της πιστότητας είναι να ισχύουν $\%RSD_f \leq 5,0$ και $\%RSD_R \leq 5,0$ και επίσης η % ανάκτηση για κάθε μέτρηση να βρίσκεται μεταξύ 95,0-105,0%.

Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη μελέτη της πιστότητας για τα δύο δερματικά διαλύματα που μελετώνται.

Πίνακας 6.3 Αποτελέσματα της μελέτης πιστότητας της μεθόδου προσδιορισμού των προσμίξεων της νατριούχου δικλοφαινάκης για τη σύσταση 1,5% w/w

	Εμβαδόν δικλοφαινάκης σε δ/μα αναφοράς 0,2%	Εμβαδόν δικλοφαινάκης σε εμβολ.δ/μα	% Επίπεδο Εμβολιασμού	% Ανάκτηση	Μέσος όρος(±SD)/ RSD, %	
Αναλυτής 1 Ημέρα 1 Όργανο 1		21625		100,78		
	21500	21101		98,34		
	21415	21546	0,20	100,41	99,69 (±0,91)	
	Μέσος όρος	21435			99,90	0,92
		21458	21409		99,77	
		21227		98,93		
Αναλυτής 2 Όργανο 2	21521	21425		98,68	98,94 (±0,88)	
	21901	21693	0,20	99,92	0,89	
	Μέσος όρος	21711	21323		98,21	
Ημέρα 2	21935	21358		98,26	98,86 (±0,54)	
	21536	21586	0,20	99,31	0,55	
	Μέσος όρος	21736	21519		99,00	

Επαναληψιμότητα %RSD = 0,92

%RSD_f = 0,84

Ενδιάμεση πιστότητα %RSD_R = 0,88

Με βάση τα παραπάνω αποδεικνύεται ότι πληρούνται τα κριτήρια αποδοχής για την πιστότητα της μεθόδου προσδιορισμού των προσμίξεων της νατριούχου δικλοφαινάκης για το δερματικό διάλυμα περιεκτικότητας 1,5% w/w.

Πίνακας 6.4 Αποτελέσματα της μελέτης πιστότητας της μεθόδου προσδιορισμού των προσμίξεων της νατριούχου δικλοφαινάκης για τη σύσταση 4,0% w/v

	Εμβαδόν δικλοφαινάκης σε δ/μα αναφοράς 0,2%	Εμβαδόν δικλοφαινάκης σε εμβολ.δ/μα	% Επίπεδο Εμβολιασμού	% Ανάκτηση	Μέσος όρος(±SD)/ RSD, %	
Αναλυτής 1 Ημέρα 1 Όργανο 1		21161		98,62		
	21500	21063		98,16		
	21415	20875	0,20	97,29	98,50 (±0,84)	
	Μέσος όρος	21088			98,28	0,85
		21458	21419		99,82	
		21202		98,81		
Αναλυτής 2 Όργανο 2	21521	21576		99,38	99,01 (±0,95)	
	21901	21263	0,20	97,94	0,96	
	Μέσος όρος	21711	21652		99,73	
		21935	21404		98,47	98,40 (±0,70)
Ημέρα 2	21536	21228	0,20	97,67	0,72	
	Μέσος όρος	21736	21533		99,07	

Επαναληψιμότητα %RSD = 0,85

%RSD_f = 0,85

Ενδιάμεση πιστότητα %RSD_R = 0,90

Με βάση τα παραπάνω αποδεικνύεται ότι πληρούνται τα κριτήρια αποδοχής για την πιστότητα της μεθόδου προσδιορισμού των προσμίξεων της νατριούχου δικλοφαινάκης για το δερματικό διάλυμα περιεκτικότητας 4,0% w/v.

6.7.4 Ακρίβεια

Για τον προσδιορισμό της ακρίβειας για κάθε μία από τις δύο συστάσεις παρασκευάστηκαν τρία ανεξάρτητα εμβολιασμένα διαλύματα, τα οποία περιείχαν, τόσο την προσδιοριζόμενη δραστική ουσία, όσο και τα έκδοχα (υποκεφάλαιο 5.1), σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων, τα οποία καλύπτουν το εύρος της γραμμικότητας. Επίσης, παρασκευάστηκε ένα πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης 100 μg/mL νατριούχου δικλοφαινάκης σε κινητή φάση. Η ποσότητα του διαλύματος placebo που

ζυγίστηκε για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης αντιστοιχεί στο 100% της συγκέντρωσης εργασίας (500 ppm).

Τα εμβολιασμένα διαλύματα για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης, για τον προσδιορισμό της ακρίβειας των προσμίξεων της νατριούχου δικλοφαινάκης για τη σύσταση 1,5% w/w, παρασκευάστηκαν ως εξής:

- **Εμβολιασμένο διάλυμα Α (επίπεδο συγκέντρωσης δικλοφαινάκης 0,25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, που αντιστοιχεί στο 0,05% της συγκέντρωσης εργασίας):** Ζυγίστηκαν με ακρίβεια, απευθείας σε ογκομετρική φιάλη των 50,0 mL, 1,667 g διαλύματος placebo. Στη συνέχεια προστέθηκαν σε αυτήν 0,125 mL από το διάλυμα παρακαταθήκης και αραιώθηκαν με κινητή φάση μέχρι τη χαραγή. Ακολούθησε καλή ανάδευση.
- **Εμβολιασμένο διάλυμα Β (επίπεδο συγκέντρωσης δικλοφαινάκης 1,0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, που αντιστοιχεί στο 0,2% της συγκέντρωσης εργασίας):** όπως το διάλυμα Α, χρησιμοποιώντας 0,50 mL διαλύματος παρακαταθήκης.
- **Εμβολιασμένο διάλυμα Γ (επίπεδο συγκέντρωσης δικλοφαινάκης 5,0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, που αντιστοιχεί στο 1,0% της συγκέντρωσης εργασίας):** όπως το διάλυμα Α, χρησιμοποιώντας 2,50 mL διαλύματος παρακαταθήκης.

Τα εμβολιασμένα διαλύματα για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης, για τον προσδιορισμό της ακρίβειας των προσμίξεων της νατριούχου δικλοφαινάκης για τη σύσταση 4,0% w/v, παρασκευάστηκαν ως εξής:

- **Εμβολιασμένο διάλυμα Α (επίπεδο συγκέντρωσης δικλοφαινάκης 0,25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, που αντιστοιχεί στο 0,05% της συγκέντρωσης εργασίας):** Ζυγίστηκαν με ακρίβεια, απευθείας σε ογκομετρική φιάλη των 50,0 mL, 0,606 g διαλύματος placebo. Στη συνέχεια προστέθηκαν σε αυτήν 0,125 mL από το διάλυμα παρακαταθήκης και αραιώθηκαν με κινητή φάση μέχρι τη χαραγή. Ακολούθησε καλή ανάδευση.
- **Εμβολιασμένο διάλυμα Β (επίπεδο συγκέντρωσης δικλοφαινάκης 1,0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, που αντιστοιχεί στο 0,2% της συγκέντρωσης εργασίας):** όπως το διάλυμα Α, χρησιμοποιώντας 0,50 mL διαλύματος παρακαταθήκης.
- **Εμβολιασμένο διάλυμα Γ (επίπεδο συγκέντρωσης δικλοφαινάκης 5,0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, που αντιστοιχεί στο 1,0% της συγκέντρωσης εργασίας):** όπως το διάλυμα Α, χρησιμοποιώντας 2,50 mL διαλύματος παρακαταθήκης.

Ακόμη, παρασκευάστηκε ένα διάλυμα αναφοράς 0,2%, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της μεθόδου. Υπολογίστηκε η % ανάκτηση κάθε εμβολιασμένου διαλύματος στα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων, για κάθε μία από τις δύο συστάσεις, σε σχέση με το πρότυπο διάλυμα, καθώς και η %RSD των ανακτήσεων σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης.

Η % ανάκτηση υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\% \text{ Ανάκτηση} = \frac{\% \text{ περιεκτικότητα πρόσμιξης}}{\% \text{ ενίσχυση}} \times 100$$

Για να κριθεί η μέθοδος ως ακριβής, θα πρέπει οι τιμές της % ανάκτησης να βρίσκονται μεταξύ 95-105% και η %RSD των ανακτήσεων σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης να είναι $\leq 5,0$. Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων από τη μελέτη της ακρίβειας της μεθόδου προσδιορισμού των προσμίξεων της νατριούχου δικλοφαινάκης.

Πίνακας 6.5 Αποτελέσματα της μελέτης ακρίβειας της μεθόδου προσδιορισμού των προσμίξεων της νατριούχου δικλοφαινάκης για τη σύσταση 1,5% w/w

Εμβολ. δ/μα	Εμβαδόν δικλοφαινάκης σε διάλυμα αναφοράς 0,2%	Εμβαδόν δικλοφαινάκης σε εμβολιασμένο διάλυμα	% Ενίσχυση	% Ανάκτηση	Μέσος όρος (\pm SD)/ RSD, %
A		5333	0,05	98,88	98,90 (\pm0,07) 0,068
		5331		98,84	
		5338		98,97	
B	21535	21363	0,20	99,02	99,38 (\pm0,31) 0,31
	21587	21474		99,54	
	21599	21480		99,57	
Γ	Μέσος όρος	21574	1,00	100,50	100,39 (\pm0,16) 0,16
		108410		100,20	
		108089		100,47	
		108379			

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι η % ανάκτηση βρίσκεται μεταξύ 98,84-100,50% και η %RSD είναι $\leq 0,31$. Επομένως, η μέθοδος είναι ακριβής για τον ποσοτικό προσδιορισμό των προσμίξεων της δικλοφαινάκης στο δερματικό διάλυμα περιεκτικότητας 1,5% w/w.

Πίνακας 6.6 Αποτελέσματα της μελέτης ακρίβειας της μεθόδου προσδιορισμού των προσμίξεων της νατριούχου δικλοφαινάκης για τη σύσταση 4,0% w/v

Εμβολ. δ/μα	Εμβαδόν δικλοφαινάκης σε διάλυμα αναφοράς 0,2%	Εμβαδόν δικλοφαινάκης σε εμβολιασμένο διάλυμα	% Ενίσχυση	% Ανάκτηση	Μέσος όρος (±SD)/ RSD, %
A		5379	0,05	99,62	99,36 (±0,79) 0,79
		5392		99,97	
		5311		98,47	
B	21535	21352	0,20	98,97	98,92 (±0,47) 0,47
	21587	21233		98,42	
	21599	21434		99,35	
	Μέσος όρος 21574	108926		100,98	
Γ		108446	1,00	100,54	100,73 (±0,23) 0,23
		108583		100,66	

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι η % ανάκτηση βρίσκεται μεταξύ 98,42-100,98% και η %RSD είναι $\leq 0,79$. Επομένως, η μέθοδος είναι ακριβής για τον ποσοτικό προσδιορισμό των προσμίξεων της νατριούχου δικλοφαινάκης στο δερματικό διάλυμα περιεκτικότητας 4,0% w/v.

6.7.5 Εύρος

Από τις μελέτες γραμμικότητας και ακρίβειας προκύπτει ότι το εύρος συγκεντρώσεων είναι $0,25 - 5,0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, το οποίο αντιστοιχεί στο 0,05 – 1,0% της συγκέντρωσης εργασίας.

6.7.6 Ανθεκτικότητα

I. Για τη μελέτη της ανθεκτικότητας παρασκευάστηκε διάλυμα, όπως ακριβώς για τον έλεγχο καταλληλότητας του συστήματος και έγινε ο πειραματικός σχεδιασμός όπως περιγράφεται στο εδάφιο 5.7.6.

Πίνακας 6.7 Πειραματικός σχεδιασμός μελέτης της ανθεκτικότητας

A	Παράγοντες		Πείραμα	Διαχωριστικότητα μεταξύ των κορυφών της πρόσμιξης F και της δικλοφαινάκης
	B	Γ		
+	+	+	Y1	9,0
-	-	+	Y2	9,0
+	-	-	Y3	8,1
-	+	-	Y4	7,0

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι και για τις τρεις μεταβολές που έγιναν, ισχύει $R_s > 4$, επομένως δεν επηρεάζουν σημαντικά τη μέθοδο.

II. Σταθερότητα διαλυμάτων

Για τον έλεγχο της σταθερότητας, παρασκευάστηκαν εμβολιασμένα διαλύματα Β για τις δύο συστάσεις, τα οποία αναλύθηκαν αμέσως μετά την παρασκευή τους και στη συνέχεια μετά από 24 ώρες αποθήκευσής τους στους 25 °C. Επίσης παρασκευάστηκε ένα διάλυμα αναφοράς 0,2%.

Η % ανάκτηση υπολογίστηκε από τη σχέση:

$$\% \text{ανάκτηση} = \frac{\% \text{περιεκτικότητα μετά από 24 ώρες}}{\% \text{περιεκτικότητα φρέσκου δ/ματος}} \times 100$$

Για να αποδειχτεί η σταθερότητα των διαλυμάτων, θα πρέπει οι τιμές της % ανάκτησης έναντι της αρχικής περιεκτικότητας στο φρέσκο διάλυμα να βρίσκονται μεταξύ 98-102% και η %RSD των τιμών ανάκτησης να είναι $\leq 2,0$.

Πίνακας 6.8 Αποτελέσματα της μελέτης σταθερότητας της μεθόδου προσδιορισμού των προσμίξεων της νατριούχου δικλοφαινάκης για τη σύσταση 1,5% w/w

	Εμβαδόν κορυφής δικλοφαινάκης σε δ/μα αναφοράς 0,2%	Εμβαδόν κορυφής δικλοφαινάκης σε εμβολ. δ/μα	% επίπεδο εμβολιασμού	% ανάκτηση
Φρέσκο διάλυμα	21500	21625	0,20	100,78
	21415	21101		98,34
	Μέσος όρος	21458		21546
Μετά από 24 ώρες	21729	21564	0,20	99,17
	21758	21089		96,99
	Μέσος όρος	21744		21539

	% Ανάκτηση έναντι φρέσκου δ/ματος
1	98,41
2	98,63
3	98,65
Μέσος όρος (±SD), RSD, %	98,56 (±0,14), 0,14

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι τα διαλύματα ελέγχου περιεκτικότητας 1,5% w/w παραμένουν σταθερά για τουλάχιστον 24 ώρες.

Πίνακας 6.9 Αποτελέσματα της μελέτης σταθερότητας της μεθόδου προσδιορισμού των προσμίξεων της νατριούχου δικλοφαινάκης για τη σύσταση 4,0% w/v

	Εμβαδόν κορυφής δικλοφαινάκης σε δ/μα αναφοράς 0,2%	Εμβαδόν κορυφής δικλοφαινάκης σε εμβολ. δ/μα	% επίπεδο εμβολιασμού	% ανάκτηση
Φρέσκο διάλυμα	21500	21161	0,20	98,62
	21415	21063		98,16
	Μέσος όρος	20875		97,26
Μετά από 24 ώρες	21729	21432	0,20	98,57
	21758	21411		98,47
	Μέσος όρος	21347		98,18

	% Ανάκτηση έναντι φρέσκου δ/ματος
1	99,95
2	100,32
3	100,92
Μέσος όρος (±SD), RSD, %	100,39 (±0,49), 0,49

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι τα διαλύματα ελέγχου περιεκτικότητας 4,0% w/v παραμένουν σταθερά για τουλάχιστον 24 ώρες.

Έπειτα από τις παραπάνω μελέτες, η μέθοδος κρίνεται ως ανθεκτική.

6.7.7 Όριο ανίχνευσης (LOD)/ Όριο ποσοτικοποίησης (LOQ)

$$\text{LOD} = 3,3 \times \frac{\sigma}{S} = 0,012 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1},$$

όπου S η κλίση της καμπύλης αναφοράς και σ η τυπική απόκλιση του πιο αραιού προτύπου διαλύματος από τη μελέτη της γραμμικότητας.

Το LOD αντιστοιχεί σε 0,0023% περιεκτικότητα πρόσμιξης.

$$\text{LOQ} = 10 \times \frac{\sigma}{S} = 0,036 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

Το LOQ αντιστοιχεί σε 0,0071% περιεκτικότητα πρόσμιξης.

6.8 Συμπέρασμα

Από την αξιολόγηση των παραπάνω χαρακτηριστικών ποιότητας της μεθόδου, κρίθηκε ότι η μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού για τις προσμίξεις της νατριούχου δικλοφαινάκης, σε συστάσεις δερματικού διαλύματος 1,5% w/w και 4,0% w/v, ικανοποιεί όλες τις απαιτήσεις και επομένως, είναι κατάλληλη για τον σκοπό για τον οποίο αναπτύχθηκε.

7. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΘΕΙΟΚΟΛΧΙΚΟΣΙΔΗ ΣΕ ΔΕΡΜΑΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ

7.1 Ανάπτυξη της μεθόδου

Με στόχο την ανάπτυξη μίας εκλεκτικής μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό του θειοκολχικοσίδη, σε δερματικό διάλυμα περιεκτικότητας 0,25% w/v, έγιναν αρκετές δοκιμές, τόσο με αντίστροφης, όσο και με κανονικής φάσης χρωματογραφία. Οι δοκιμές αυτές, βασίστηκαν σε ήδη υπάρχουσες μεθόδους HPLC για τον ποσοτικό προσδιορισμό του θειοκολχικοσίδη σε φαρμακευτικά σκευάσματα.

A) Δοκιμές με Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης

Οι πρώτες δοκιμές βασίστηκαν σε μία μέθοδο RP-HPLC, η οποία έχει εφαρμοστεί για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό θειοκολχικοσίδη και καλιούχου δικλοφαινάκης σε δισκία [54]. Ως συγκέντρωση εργασίας ορίστηκαν τα 80 ppm. Η κινητή φάση αποτελούταν από το διαλύτη A, ο οποίος ήταν ρυθμιστικό διάλυμα 5 mM δισόξινου φωσφορικού νατρίου ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) με pH 2,5 και από το διαλύτη B, ο οποίος ήταν μεθανόλη και εφαρμόστηκε βαθμιδωτή έκλυση. Χρησιμοποιήθηκε η στήλη CPS Hypersil 250×4 mm, 5 μm (CN), ως μήκος κύματος ορίστηκαν τα 258 nm και ως ταχύτητα ροής 1,0 mL/min. Για την παρασκευή των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης μείγμα MeOH:H₂O σε αναλογία 50:50 v/v. Το πρόγραμμα της βαθμιδωτής έκλυσης ήταν το εξής:

Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης 7.1

Χρόνος (min)	% Διαλύτης A	% Διαλύτης B
0	60	40
1	60	40
10	20	80
11	60	40
15	60	40

Παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα θειοκολχικοσίδη στη συγκέντρωση εργασίας και από την ανάλυσή του προέκυψε ως χρόνος συγκράτησης τα 3,2 min. Η δραστική ουσία εκλύεται πολύ νωρίς, κοντά στο νεκρό χρόνο, και πιθανώς να υπάρχουν παρεμποδίσεις από τις ουσίες των εκδόχων (placebo) στον χρόνο αυτό. Τα έκδοχα

αναφέρονται στο υποκεφάλαιο 5.1. Επομένως, έπρεπε να αυξηθεί ο χρόνος συγκράτησης.

Διατηρήθηκαν οι ίδιες παράμετροι, αλλά εφαρμόστηκε ισοκρατική έκλυση με τους διαλύτες Α και Β σε αναλογία 60:40 v/v. Το αποτέλεσμα ήταν η κορυφή του θειοκολχικοσίδη να εμφανιστεί ακόμη πιο νωρίς, στα 2,5 min. Ακολούθησαν δοκιμές με τους δύο διαλύτες σε διαφορετικές αναλογίες (Α:Β 40:60 v/v και 20:80 v/v), χωρίς όμως τελικά να αυξηθεί ο χρόνος συγκράτησης του θειοκολχικοσίδη. Το συμπέρασμα που προέκυψε έπειτα από τις παραπάνω δοκιμές είναι ότι ο θειοκολχικοσίδης δε μπορεί να συγκρατηθεί στη στήλη που χρησιμοποιήθηκε, άρα έπρεπε να γίνει αλλαγή της στήλης.

Οι νέες χρωματογραφικές παράμετροι που εφαρμόστηκαν, βασίστηκαν σε μία RP-HPLC μέθοδο προσδιορισμού ορισμένων αντιφλεγμονωδών φαρμάκων και του συνδυασμού τους με άλλα φάρμακα [57]. Έτσι, η νέα στήλη που χρησιμοποιήθηκε για τις επόμενες δοκιμές ήταν η YMC-Pack Pro C₁₈, 250×4,6 mm, 5 μm, με θερμοκρασία στήλης τους 35 °C. Η κινητή φάση αποτελούνταν από το διαλύτη Α, ρυθμιστικό διάλυμα 15 mM NaH₂PO₄ H₂O με pH 3,25, και από το διαλύτη Β, ακετονιτρίλιο. Ως μήκος κύματος ορίστηκαν τα 230 nm και ως ταχύτητα ροής 1,1 mL/min. Η συγκέντρωση εργασίας παρέμεινε 80 ppm και ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του προτύπου και του διαλύματος ελέγχου ήταν και πάλι το μείγμα MeOH:H₂O σε αναλογία 50:50 v/v.

Αρχικά δοκιμάστηκε ισοκρατικό σύστημα έκλυσης με αναλογία κινητής φάσης Α:Β 60:40 v/v ($t_R=2,9$ min) και Α:Β 40:60 v/v ($t_R=2,5$ min, κακός διαχωρισμός). Στη συνέχεια, δοκιμάστηκε το παρακάτω πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης:

Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης 7.2

Χρόνος (min)	% Διαλύτης Α	% Διαλύτης Β
0	80	20
3	80	20
16	45	55
17	35	65
26	10	90
27	80	20
30	80	20

Ο χρόνος συγκράτησης του θειοκολχικοσίδη, που προέκυψε από την ανάλυση του προτύπου διαλύματος και του διαλύματος ελέγχου, έγινε 6,9 min. Ο χρόνος αυτός ήταν ικανοποιητικός και οι κορυφές είχαν αποδεκτό σχήμα, επομένως συνεχίστηκαν οι δοκιμές, με τις ίδιες παραμέτρους, ώστε να διαπιστωθεί αν υπάρχει καλός διαχωρισμός των προσμίξεων. Το σύστημα χρειαζόταν πάνω από 3 min για να εξισορροπηθεί η πίεση μεταξύ των ενέσεων. Υπάρχουν τρεις προσμίξεις του θειοκολχικοσίδη, οι οποίες θα προσδιοριστούν στο δερματικό διάλυμα που μελετάται: η κολχικίνη, ο κολχικοσίδης και ο N-φορμυλο-θειοκολχικοσίδης (εδάφιο 2.2.2). Μικρή ποσότητα από την κάθε πρόσμιξη διαλύθηκε σε 1,0 mL ACN. Η κορυφή της κολχικίνης εμφανίστηκε στα 16,0 min, του κολχικοσίδη στα 2,9 min, γεγονός το οποίο μπορεί να δημιουργήσει πρόβλημα αλληλεπικάλυψης με τις κορυφές του placebo, και του N-φορμυλο-θειοκολχικοσίδη επίσης στα 2,9 min, αλλά το χρωματογράφημα δεν ήταν ικανοποιητικό. Όσον αφορά τη δικλοφαινάκη, από το διάλυμα ελέγχου παρατηρήθηκε ότι η κορυφή της εμφανίζεται στα 26,0 min, επομένως η μέθοδος είναι εκλεκτική ως προς τον θειοκολχικοσίδη.

Με σκοπό την αύξηση των χρόνων συγκράτησης του κολχικοσίδη και του N-φορμυλο-θειοκολχικοσίδη και την έκλουσή τους σε διαφορετικό χρόνο, ώστε να μπορούν να διαχωριστούν, έγινε δοκιμή με ισοκρατική έκλυση με αναλογία των διαλυτών A:B 90:10 v/v. Ως διαλύτης, για την παρασκευή όλων των διαλυμάτων, χρησιμοποιήθηκε μείγμα των διαλυτών A:B σε αναλογία 90:10 v/v. Η κορυφή του κολχικοσίδη εμφανίστηκε στα 15,2 min, όμως του N-φορμυλο-θειοκολχικοσίδη σε περισσότερο από 35 min, χρόνος ο οποίος θεωρείται πολύ υψηλός. Έγινε αλλαγή στην αναλογία διαλυτών στην ισοκρατική έκλυση, σε A:B 80:20 v/v, για να μειωθεί ο χρόνος συγκράτησης του N-φορμυλο-θειοκολχικοσίδη, η κορυφή του οποίου, όμως, εμφανίστηκε στα 7,0 min, δηλαδή στον ίδιο χρόνο με τη δραστική ουσία.

Διατηρώντας ίδιες τις υπόλοιπες παραμέτρους, δοκιμάστηκε το ακόλουθο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης:

Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης 7.3

Χρόνος (min)	% Διαλύτης A	% Διαλύτης B
0	85	15
6	85	15
10	60	40

Ο χρόνος συγκράτησης του Ν-φορμυλο-θειοκολχικοσίδη ήταν 16,5 min. Παρασκευάστηκε ένα πρότυπο διάλυμα 80 ppm, από την ανάλυση του οποίου προέκυψε ότι η κορυφή του θειοκολχικοσίδη εμφανίστηκε στα 16,4 min, στον ίδιο δηλαδή χρόνο με την πρόσμιξη. Επομένως, απαιτούνταν αλλαγές στο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης.

Εκτός από το πρότυπο διάλυμα θειοκολχικοσίδη, παρασκευάστηκε και ένα διάλυμα, με ανάμειξη ποσότητας προτύπου διαλύματος και μικρής ποσότητας κολχικοσίδη και Ν-φορμυλο-θειοκολχικοσίδη, ώστε να μελετηθεί ο βαθμός διαχωρισμού τους. Με το νέο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης αναλύθηκαν αρχικά το πρότυπο διάλυμα των 80 ppm, τα διαλύματα κάθε πρόσμιξης ξεχωριστά και στη συνέχεια το μείγμα που παρασκευάστηκε.

Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης 7.4

Χρόνος (min)	% Διαλύτης Α	% Διαλύτης Β
0-6	85	15
6-12	80	20

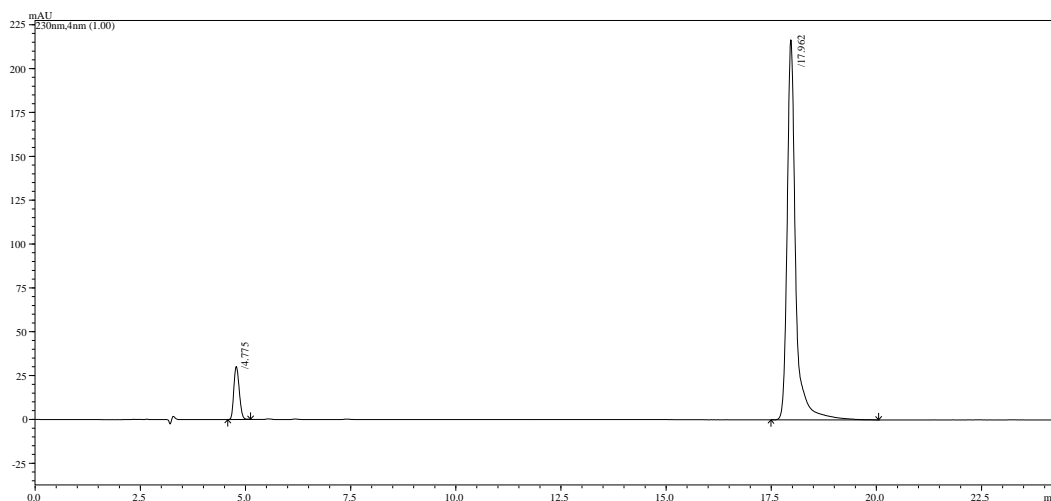
Οι χρόνοι συγκράτησης που προκύπτουν από την ανάλυση του προτύπου διαλύματος και του διαλύματος κάθε πρόσμιξης είναι οι εξής:

t_R colchicoside = 4,8 min

t_R N-formyl-thiocolchicoside= 18,3 min

t_R thiocolchicoside = 17,2 min

Η δραστική ουσία και ο Ν-φορμυλο-θειοκολχικοσίδης εκλούνται σε πολύ κοντινούς χρόνους. Στην περίπτωση της ανάλυσης του μείγματος, όπως φαίνεται στο παρακάτω χρωματογράφημα, εμφανίστηκε η κορυφή του κολχικοσίδη στα 4,0 min και άλλη μία κορυφή μεγάλου εμβαδού, στα 17,9 min, η οποία όπως συμπεραίνεται ανήκει στον Ν-φορμυλο-θειοκολχικοσίδη και στον θειοκολχικοσίδη, οι οποίοι δε διαχωρίστηκαν.



t_R (min)	Εμβαδόν κορυφής	Θεωρητικές πλάκες	Tailing Factor	Καθαρότητα κορυφής	Rs
4,775	269603	5804	1,24	0,99	--
17,962	3033440	45997	1,47	0,99	45,03

Εφόσον δε μπορεί να γίνει διαχωρισμός του θειοκολχικισίδη και του Ν-φορμυλοθειοκολχικισίδη, οι δοκιμές συνεχίστηκαν με διαφορετική στήλη.

Η νέα στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι η Phenomenex-Kinetex C₈ 150×4,6 mm, 2,6 μm, που είναι πιο πολική σε σχέση με τη C₁₈ που χρησιμοποιήθηκε για τις προηγούμενες δοκιμές. Αναλύθηκαν τα ίδια διαλύματα με πριν, με το παρακάτω πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης:

Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης 7.5

Χρόνος (min)	% Διαλύτης Α	% Διαλύτης Β
0-6	85	15
6-15	80	20

Οι χρόνοι συγκράτησης που προέκυψαν είναι οι εξής:

t_R colchicoside = 2,3 min

t_R N-formyl-thiocolchicoside = 6,4 min

t_R thiocolchicoside = 6,1 min

Στην περίπτωση της ανάλυσης του μείγματος εμφανίστηκε και πάλι μία κορυφή με μεγάλο εμβαδόν, σε μικρότερο χρόνο (στα 5,6 min), που σημαίνει ότι και πάλι δεν

υπήρξε καλός διαχωρισμός. Τα ίδια αποτελέσματα προέκυψαν και με την επανάληψη του προγράμματος βαθμιδωτής έκλουσης 7.2.

Με βάση το γεγονός ότι η δραστική ουσία θειοκολχικοσίδης και η πρόσμιξη N-φορμυλο-θειοκολχικοσίδης ανήκουν σε διαφορετική κατηγορία οργανικών ενώσεων, έγινε προσπάθεια για το διαχωρισμό τους μεταβάλλοντας το pH του ρυθμιστικού διαλύματος. Έτσι, το pH αυξήθηκε από 3,25 σε 6,0 και χρησιμοποιήθηκε ξανά η προηγούμενη στήλη C₁₈ σε συνδυασμό με το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης 7.4.

Από την ανάλυση του μείγματος προέκυψαν και πάλι τα ίδια αποτελέσματα, με το πρόβλημα του μη διαχωρισμού των κορυφών του θειοκολχικοσίδης και του N-φορμυλο-θειοκολχικοσίδης να παραμένει.

Έτσι αποφασίστηκε να γίνει αλλαγή της μεθόδου και να χρησιμοποιηθεί χρωματογραφία κανονικής φάσης.

B) Δοκιμές με Χρωματογραφία κανονικής φάσης

Έγινε προσπάθεια για διαχωρισμό των συστατικών και ποσοτικό προσδιορισμό της δραστικής ουσίας με ισοκρατική χρωματογραφία, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μείγμα CHCl₃:MeOH:HCOOH:H₂O σε αναλογία 87:10:2:1 v/v/v/v. Το μήκος κύματος ορίστηκε στα 254 nm, η ταχύτητα ροής στο 1,0 mL/min, ο όγκος της ένεσης 20 μL και η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Hypersil Silica 250 × 4,6 mm, 5μm. Ως συγκέντρωση εργασίας ορίστηκαν τα 100 ppm.

Αρχικά παρασκευάστηκε ένα πρότυπο διάλυμα θειοκολχικοσίδης συγκέντρωσης 100 ppm. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε η κινητή φάση. Από το χρωματογράφημα που πάρθηκε, προέκυψε ότι ο χρόνος συγκράτησης της δραστικής ουσίας ήταν 14,8 min. Έπειτα, παρασκευάστηκε διάλυμα ελέγχου, επίσης συγκέντρωσης 100 ppm, κατά την παρασκευή του οποίου, όμως, παρατηρήθηκε ότι σχηματίστηκαν δύο φάσεις έπειτα από την προσθήκη της κινητής φάσης. Έτσι, μετά την αραίωση ακολούθησε φυγοκέντρηση και έγινε παραλαβή του προς ανάλυση δείγματος από την οργανική φάση. Η κορυφή εμφανίστηκε πάλι στα 14,8 min, όμως το εμβαδόν της ήταν μικρότερο σε σχέση με το εμβαδόν της κορυφής από το πρότυπο διάλυμα, γεγονός το οποίο οφειλόταν στη μη ποσοτική εκχύλιση κατά τη φυγοκέντρηση.

Προτού γίνουν κάποιες αλλαγές στις χρωματογραφικές παραμέτρους, έγινε έλεγχος ως προς τους χρόνους συγκράτησης των προσμίξεων. Μικρή ποσότητα από κάθε

πρόσμιξη διαλύθηκε σε κινητή φάση. Ο χρόνος συγκράτησης της κολχικίνης ήταν 3,2 min, του N-φορμυλο-θειοκολχικοσίδη 17,7 min και του κολχικοσίδη 21,1 min. Όμως, εκτός του ότι η κορυφή της κολχικίνης εμφανίζεται σε μικρό χρόνο, αλληλεπικαλύπτεται και με κάποια άλλη κορυφή και αυτό παρεμποδίζει τον προσδιορισμό της. Ακολούθησε δοκιμή με ταχύτητα ροής της κινητής φάσης 0,8 mL/min, όμως δεν υπήρξε βελτίωση στο πρόβλημα της αλληλεπικάλυψης των κορυφών, οπότε οι δοκιμές συνεχίστηκαν με την αρχική ταχύτητα ροής, δηλαδή 1,0 mL/min.

Η επόμενη αλλαγή έγινε στην αναλογία σύστασης της κινητής φάσης. Στην προσπάθεια να αυξηθούν οι χρόνοι συγκράτησης των ουσιών, ώστε η κορυφή της κολχικίνης να μην εμφανίζεται τόσο νωρίς, αυξήθηκε το ποσοστό της μεθανόλης (πολικός διαλύτης) στην κινητή φάση. Η σύσταση της νέας κινητής φάσης ήταν $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{HCOOH}:\text{H}_2\text{O}$ σε αναλογία 77:20:2:1 v/v/v/v. Παρασκευάστηκε ένα διάλυμα παρακαταθήκης για τις προσμίξεις, με ανάμειξη μικρής ποσότητας από κάθε μία και αραιώση με μεθανόλη. Για τον έλεγχο των χρόνων συγκράτησης, ποσότητα από το διάλυμα αυτό αραιώθηκε με το πρότυπο διάλυμα που είχε παρασκευαστεί μέχρις όγκου 1,0 mL και αναλύθηκε. Τελικά, ο χρόνος συγκράτησης της κολχικίνης παρέμεινε ο ίδιος, ενώ οι χρόνοι των υπολοίπων ουσιών μειώθηκαν. Αυξάνοντας το ποσοστό του χλωροφορμίου στην κινητή φάση, το οποίο είναι επίσης οργανικός διαλύτης και μπορεί να επηρεάσει τους χρόνους συγκράτησης, παρατηρήθηκε ότι η κινητή φάση έγινε θολή και σχηματίστηκαν δύο μη αναμειγνύμενες φάσεις. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι το χλωροφόρμιο δεν αναμειγνύεται με το νερό, επομένως παρασκευάστηκε μία κινητή φάση, η οποία περιείχε $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ σε αναλογία 95:5 v/v. Στη συνέχεια, αναλύθηκε το μείγμα με τις προσμίξεις και το πρότυπο διάλυμα που είχε παρασκευαστεί προηγουμένως. Ο χρόνος συγκράτησης της κολχικίνης αυξήθηκε στα 6,6 min, οι χρόνοι συγκράτησης, όμως, των υπολοίπων ήταν μεγαλύτεροι από 50 min. Με στόχο τη μείωσή τους, αποφασίστηκε να εφαρμοστεί πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης με τους διαλύτες χλωροφόρμιο και μεθανόλη. Το ποσοστό της μεθανόλης θα αυξάνεται σταδιακά, εφόσον, όπως διαπιστώθηκε, ο διαλύτης αυτός μειώνει τους χρόνους συγκράτησης.

Το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης που εφαρμόστηκε ήταν το εξής:

Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης 7.6

Χρόνος (min)	% CHCl ₃	% MeOH
0-7	95	5
7-12	80	20
12-30	70	30

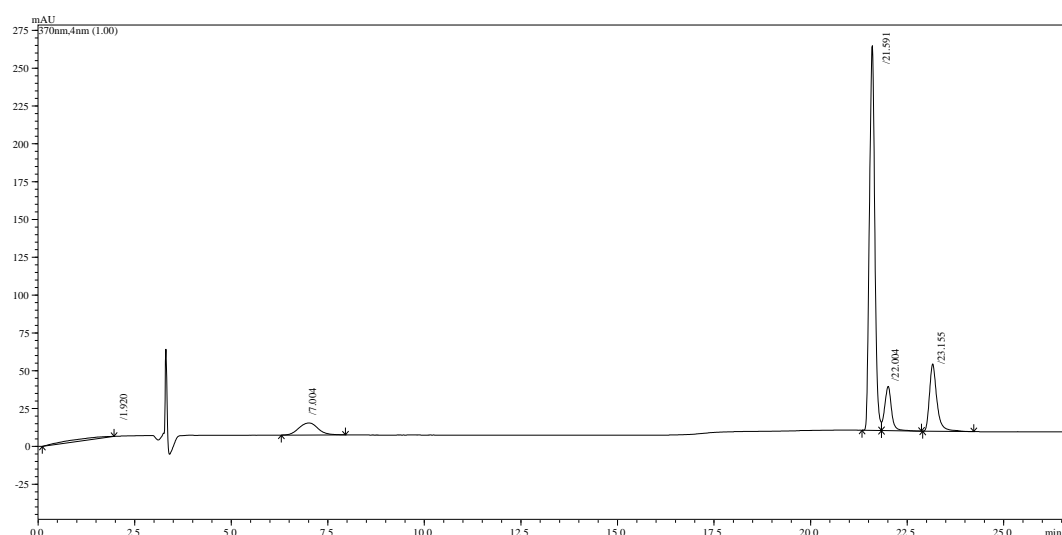
Ακολουθούν τα αποτελέσματα και το χρωματογράφημα από την ανάλυση του μείγματος:

t_R colchicine = 7,0 min

t_R thiocolchicoside = 21,6 min

t_R N-formyl-thiocolchicoside = 22,0 min

t_R colchicoside = 23,1 min



Εικόνα 7.1 Χρωματογράφημα από την ανάλυση μείγματος με πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης κατά την ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού του θειοκολχικοσίδη

Με σκοπό την αύξηση της διαχωριστικότητας μεταξύ των κορυφών δοκιμάστηκαν τα παρακάτω προγράμματα βαθμιδωτής έκλουσης:

Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης 7.7

Χρόνος (min)	% CHCl ₃	% MeOH
0-8	95	5
8-15	70	30
15-30	70	30
30,01-45	95	5

Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης 7.8

Χρόνος (min)	% CHCl ₃	% MeOH
0-7	95	5
7-30	70	30
30-50	70	30
50,01	95	5

Με το πρόγραμμα 7.7 εμφανίστηκε μία μεγάλη κορυφή, μετά την κορυφή του κολχικοσίδη, ενώ με το πρόγραμμα 7.8 η κορυφή του Ν-φορμυλο-θειοκολχικοσίδη δεν προλάβαινε να κατέβει και δεν είχε καλό σχήμα.

Οι δοκιμές συνεχίστηκαν με το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης 7.9 και με αλλαγή του μήκους κύματος από τα 254 nm στα 370 nm, όπου φαινόταν να υπάρχουν λιγότερες παρεμποδίσεις και τα χρωματογραφήματα εμφανίζονταν καλύτερα.

Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης 7.9

Χρόνος (min)	% CHCl ₃	% MeOH
0-7	95	5
7-30	50	50
30,01	95	5
45	Τέλος	

Προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα:

t_R colchicine = 8,0 min

t_R thiocolchicoside = 22,9 min

t_R N-formyl-thiocolchicoside = 23,5 min

t_R colchicoside = 25,4 min

Και σε αυτή την περίπτωση εμφανίστηκε μία κορυφή, μετά την κορυφή του κολχικοσίδη, περίπου στα 26 min. Όμως, η διαχωριστικότητα των κορυφών του θειοκολχικοσίδη και του Ν-φορμυλο-θειοκολχικοσίδη ήταν βελτιωμένη ($R_s=1,4$).

Παρασκευάστηκε ένα νέο πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης (200 ppm) με διάλυση τη πρότυπης ουσίας αναφοράς σε μεθανόλη. Από το διάλυμα αυτό, παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα στη συγκέντρωση εργασίας (100 ppm), με αραιώση με CHCl₃:MeOH 95:5 v/v. Η διαδικασία αυτή έγινε για να επιτευχθεί καλύτερη διάλυση. Χρησιμοποιήθηκε, επίσης, το διάλυμα ελέγχου που είχε παρασκευαστεί αρχικά και το

μείγμα των προσμίξεων με το πρότυπο διάλυμα. Η θερμοκρασία στήλης ρυθμίστηκε στους 30 °C και εφαρμόστηκε το παρακάτω πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης:

Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης 7.10

Χρόνος (min)	% CHCl ₃	% MeOH
0-7	90	10
7-30	50	50
30,01	90	10
50	Τέλος	

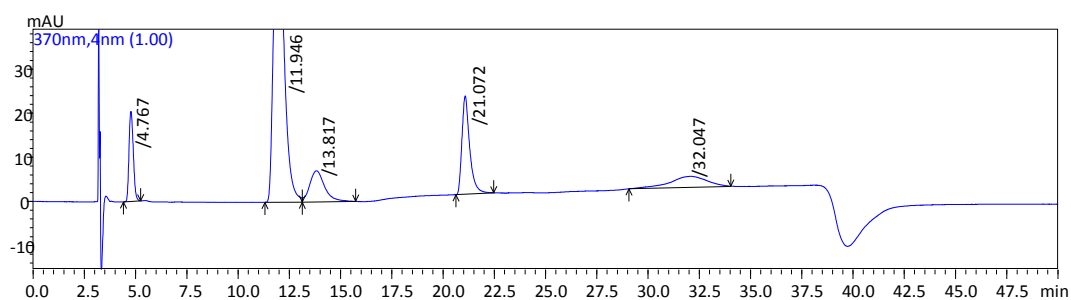
Τα αποτελέσματα που πάρθηκαν είναι:

t_R colchicine = 4,8 min

t_R thiocolchicoside = 11,9 min

t_R N-formyl-thiocolchicoside = 13,8 min

t_R colchicoside = 21,0 min



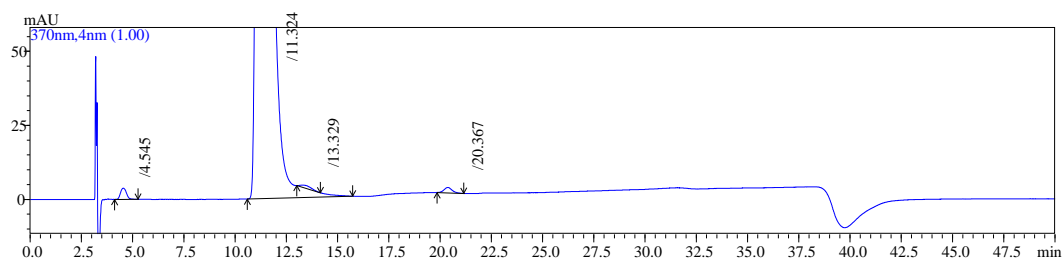
Εικόνα 7.2 Χρωματογράφημα με πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης 7.10 σε μήκος κύματος 370nm

Το πρόγραμμα 7.10 έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα, με την καλύτερη διαχωριστικότητα μεταξύ των κορυφών του θειοκολχικοσίδη και του Ν-φορμυλο-θειοκολχικοσίδη και τους καλύτερους χρόνους συγκράτησης των υπολοίπων προσμίξεων. Τόσο για το πρότυπο διάλυμα, όσο και για τα διαλύματα ελέγχου, θα πρέπει πρώτα να γίνεται διάλυση σε μεθανόλη και έπειτα από ανάδευση σε vortex, να γίνεται αραιώση με CHCl₃:MeOH σε αναλογία 95:5 v/v.

Ακολούθησαν επιπλέον δοκιμές, όσον αφορά τη συγκέντρωση διαλύματος εργασίας. Παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 200 ppm, από την ανάλυση του οποίου, προέκυψε ότι ο χρόνος συγκράτησης του θειοκολχικοσίδη ήταν 11,6 min, όμως η κορυφή εμφανίστηκε μεγάλη και πλατιά. Παρασκευάστηκαν, ακόμα, δύο διαλύματα

αναφοράς στο 0,2% (0,4 ppm) και 0,05% (0,1 ppm) της συγκέντρωσης εργασίας, τα οποία αντιστοιχούν στο μέγιστο όριο για τις άγνωστες προσμίξεις και στο όριο ποσοτικοποίησης των προσμίξεων, αντίστοιχα. Και για τα δύο διαλύματα αναφοράς, οι κορυφές εμφανίστηκαν με μικρό εμβαδόν, οπότε έπρεπε να αυξηθεί η συγκέντρωση εργασίας.

Παρασκευάστηκε ένα διάλυμα ελέγχου με συγκέντρωση 500 ppm, χρησιμοποιώντας τους ίδιους διαλύτες με πριν. Ο χρόνος συγκράτησης της δραστικής ουσίας ήταν και πάλι τα 11,6 min. Επίσης, για κάθε πρόσμιξη παρασκευάστηκε ένα διάλυμα παρακαταθήκης 1000 ppm, με αραιώση με μεθανόλη. Παρασκευάστηκε εμβολιασμένο διάλυμα Β, το οποίο περιείχε τη δραστική ουσία στο 100% της συγκέντρωσης εργασίας (500 ppm) και τις προσμίξεις στο 0,5%. Στο χρωματογράφημα που πάρθηκε και παρατίθεται στη συνέχεια, υπήρχε κακός διαχωρισμός μεταξύ των κορυφών του θειοκολχικοσίδη και του Ν-φορμυλο-θειοκολχικοσίδη, λόγω του ότι σε αυτή τη συγκέντρωση η κορυφή του θειοκολχικοσίδη διευρύνθηκε και επικάλυπτε την κορυφή της πρόσμιξης.



Εικόνα 7.3 Χρωματογράφημα εμβολιασμένου διαλύματος Β από τις δοκιμές σε συγκέντρωση εργασίας 500 ppm για την ανάπτυξη της μεθόδου προσδιορισμού του θειοκολχικοσίδη

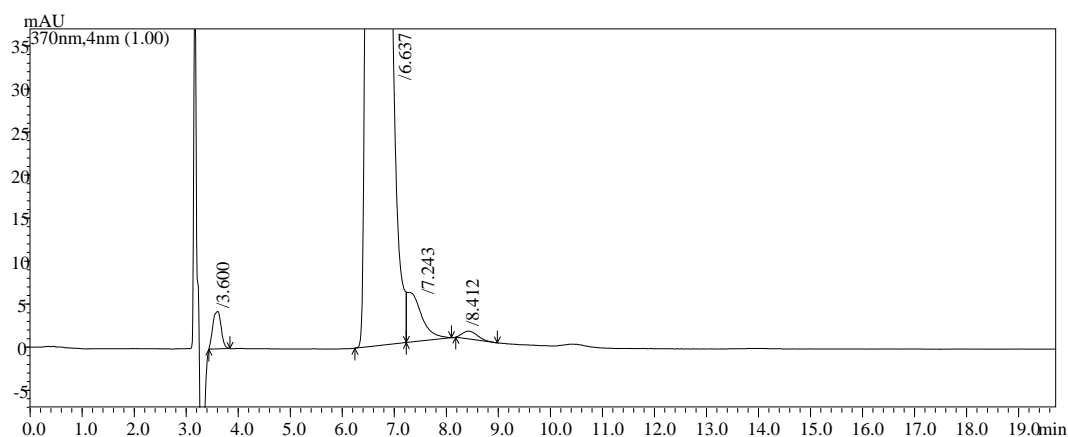
Επομένως, για τις επόμενες δοκιμές η συγκέντρωση εργασίας μειώθηκε στα 300 ppm. Ακόμα, έγιναν αλλαγές στον διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του προτύπου διαλύματος και του εμβολιασμένου διαλύματος Β, κάνοντας την αραιώση είτε με $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ σε διάφορες αναλογίες, είτε μόνο με μεθανόλη. Το αποτέλεσμα ήταν το ίδιο με πριν, με τις κορυφές να πλαταίνουν. Στην περίπτωση που δεν έγινε πρώτα προσθήκη μεθανόλης, παρατηρήθηκε ότι το εμβαδόν των κορυφών ήταν μικρότερο, που σημαίνει ότι δε λαμβανόταν όλη η ποσότητα της προς ανάλυση ουσίας. Αύξηση του ποσοστού της μεθανόλης βελτιώνει το σχήμα των κορυφών.

Εφόσον η μέθοδος προορίζεται για τον προσδιορισμό του θειοκολχικοσίδη μπορεί να εφαρμοστεί μία μέθοδος, η οποία θα δίνει τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα όσον

αφορά το σχήμα και τη διαχωριστικότητα των κορυφών. Έτσι, έγιναν κάποιες τελευταίες δοκιμές με ισοκρατική χρωματογραφία, με τους διαλύτες χλωροφόρμιο και μεθανόλη σε διάφορες αναλογίες και τα διαλύματα να παρασκευάζονται χρησιμοποιώντας πρώτα μεθανόλη και μετά $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$, όπως έχει περιγραφεί.

Στη συνέχεια περιγράφονται οι δοκιμές με την ισοκρατική χρωματογραφία:

- Πρότυπο διάλυμα 300 ppm, το οποίο παρασκευάστηκε από ποσότητα του διαλύματος παρακαταθήκης των 1000 ppm, η οποία αραιώθηκε με $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ σε αναλογία 90:10 v/v και εμβολιασμένο διάλυμα Β αναλύθηκαν με ισοκρατική χρωματογραφία με αναλογία διαλυτών $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 70:30 v/v. Ο χρόνος συγκράτησης του θειοκολχικοσίδη ήταν 3,9 min, χρόνος πολύ μικρός.
- Έγινε αλλαγή στην αναλογία των διαλυτών $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ σε 80:20 v/v, αλλά ο χρόνος συγκράτησης του θειοκολχικοσίδη παρέμεινε ο ίδιος.
- Εκτός από την αναλογία των διαλυτών, η οποία άλλαξε σε $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 60:40 v/v, μειώθηκε και η συγκέντρωση εργασίας στα 100 ppm. Δεν υπήρξε όμως κάποια μεταβολή στο χρόνο συγκράτησης της δραστικής ουσίας.
- Ομοίως με ισοκρατική χρωματογραφία με αναλογία διαλυτών $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 70:30 v/v.
- Όταν η αναλογία των διαλυτών $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ άλλαξε σε 90:10 v/v, ο χρόνος συγκράτησης αυξήθηκε στα 12,9 min.
- Τέλος, ισοκρατική χρωματογραφία με τους διαλύτες $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ σε αναλογία 85:15 v/v, έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα, με χρόνο συγκράτησης του θειοκολχικοσίδη τα 6,6 min. Στη συνέχεια παρουσιάζεται το χρωματογράφημα αυτής της δοκιμής.



Εικόνα 7.4 Χρωματογράφημα δοκιμής ισοκρατικής έκλουσης με $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ σε αναλογία 85:15

Ακολούθησε ένας τελικός έλεγχος με τις παραπάνω συνθήκες, αναλύοντας ένα διάλυμα το οποίο περιείχε και τις προσμίξεις, ώστε να διαπιστωθούν οι χρόνοι στους οποίους εμφανίζονται οι κορυφές τους.

Επομένως, για τον προσδιορισμό του θειοκολχικοσίδη, θα εφαρμοστεί ισοκρατική χρωματογραφία κανονικής φάσης με κινητή φάση $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ σε αναλογία 85:15 v/v. Η αραιώση για την παρασκευή των διαλυμάτων παρακαταθήκης θα γίνεται πρώτα με μεθανόλη και έπειτα με κινητή φάση. Ως συγκέντρωση εργασίας ορίζονται τα 50 ppm, ενώ για τις προσμίξεις θα γίνει περαιτέρω διερεύνηση (κεφάλαιο 8).

7.2 Παρασκευή διαλυμάτων

7.2.1 Παρασκευή προτύπου διαλύματος θειοκολχικοσίδη (standard solution)

Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 10,0 mg υλικού αναφοράς και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100,0 mL, όπου και διαλύθηκαν με μεθανόλη και στη συνέχεια έγινε αραιώση με τον ίδιο διαλύτη μέχρι τη χαραγή. Έπειτα, 5,0 mL από το διάλυμα αυτό, μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 10,0 mL. Αραιώθηκαν μέχρι τη χαραγή με κινητή φάση και αναδεύτηκαν καλά.

7.2.2 Παρασκευή διαλυμάτων ελέγχου (test solutions)

Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 3,88 g δερματικού διαλύματος (τα οποία αντιστοιχούν σε 10,0 mg θειοκολχικοσίδη) απευθείας σε ογκομετρική φιάλη των 100,0 mL και αραιώθηκαν με μεθανόλη μέχρι τη χαραγή. Ακολούθησε καλή ανάδευση. Στη συνέχεια, 5,0 mL από το διάλυμα αυτό, μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 10,0 mL. Αραιώθηκαν μέχρι τη χαραγή με κινητή φάση και αναδεύτηκαν καλά.

7.3 Ποσοτικοποίηση

Η % περιεκτικότητα του θειοκολχικισίδη υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ περιεκτικότητα} = \frac{A_{\text{ελεγ}}}{A_{\text{προτ}}} \times \frac{W_{\text{προτ}}}{W_{\text{ελεγ}}} \times \frac{d}{2,5} \times \% P$$

όπου

$A_{\text{ελεγ}}$: το εμβαδόν της κορυφής του θειοκολχικισίδη στο χρωματογράφημα του διαλύματος ελέγχου

$A_{\text{προτ}}$: το εμβαδόν της κορυφής του θειοκολχικισίδη στο χρωματογράφημα του προτύπου διαλύματος

$W_{\text{ελεγ}}$: το ακριβές βάρος του δερματικού διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του διαλύματος ελέγχου (g)

$W_{\text{προτ}}$: το ακριβές βάρος του υλικού αναφοράς θειοκολχικισίδη που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του προτύπου διαλύματος (mg)

$\%P$: η % καθαρότητα του υλικού αναφοράς θειοκολχικισίδη

d : η πυκνότητα του τελικού προϊόντος που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του διαλύματος ελέγχου (g/mL)

2,5 : πειραματική σταθερά που προκύπτει από την ονομαστική περιεκτικότητα σε θειοκολχικισίδη (0,25% w/v) και την αναγωγή των συντελεστών μεταβολής

7.4 Χρωματογραφικές παράμετροι

Ανιχνευτής	UV/PDA
Στήλη	Thermo, Hypersil Silica, 250 × 4,6 mm, 5 μm
Κινητή φάση	CHCl ₃ :MeOH 85:15
Ταχύτητα ροής κινητής φάσης	1,0 mL/min
Όγκος ένεσης	20 μL
Θερμοκρασία στήλης	30 °C
Θερμοκρασία δειγματολήπτη	25 °C
Μήκος κύματος	370 nm
Χρόνος ανάλυσης	15 min

7.5 Έλεγχος καταλληλότητας του συστήματος

Πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις ενός προτύπου διαλύματος θειοκολχικοσίδης. Για να κριθεί το σύστημα κατάλληλο, θα πρέπει η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των τριών μετρήσεων να είναι $\leq 2,0$.

Η %RSD βρέθηκε ίση με 0,19, επομένως το σύστημα κρίνεται κατάλληλο.

7.6 Επικύρωση της μεθόδου

7.6.1 Ειδικότητα

Παρασκευάστηκε διάλυμα, το οποίο περιείχε όλα τα έκδοχα (υποκεφάλαιο 5.1) και τη νατριούχο δικλοφαινάκη, σύμφωνα με τη σύσταση του τελικού προϊόντος, εκτός από τον θειοκολχικοσίδη. Στη συνέχεια, από το διάλυμα αυτό παρασκευάστηκε διάλυμα

ελέγχου placebo, με την ίδια ακριβώς διαδικασία που περιγράφηκε για τα διαλύματα ελέγχου στο εδάφιο 7.2.2.

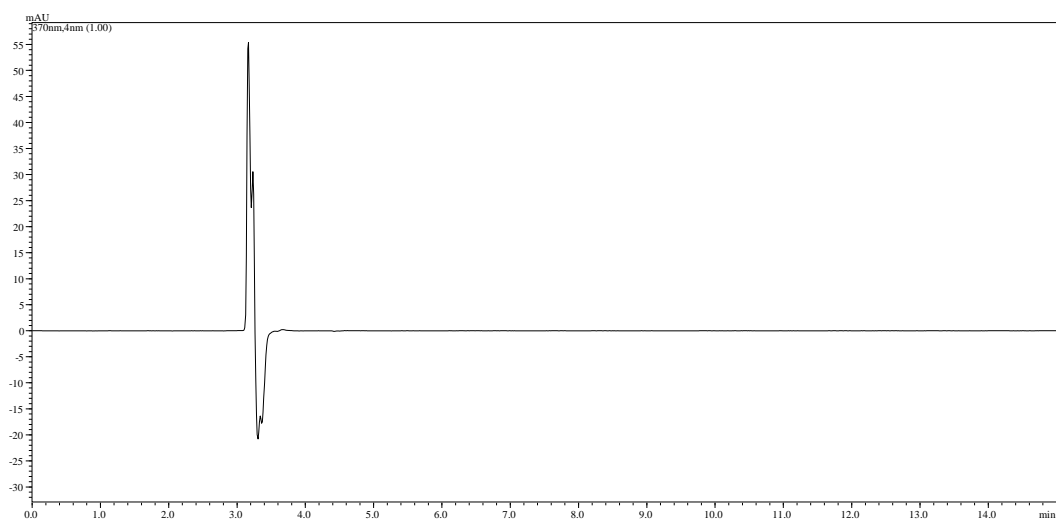
Επίσης παρασκευάστηκε εμβολιασμένο διάλυμα Β στη συγκέντρωση εργασίας, με διαδικασία η οποία περιγράφεται αναλυτικά στο εδάφιο 7.6.4.

Τα κριτήρια αποδοχής για την ειδικότητα της μεθόδου είναι τα εξής:

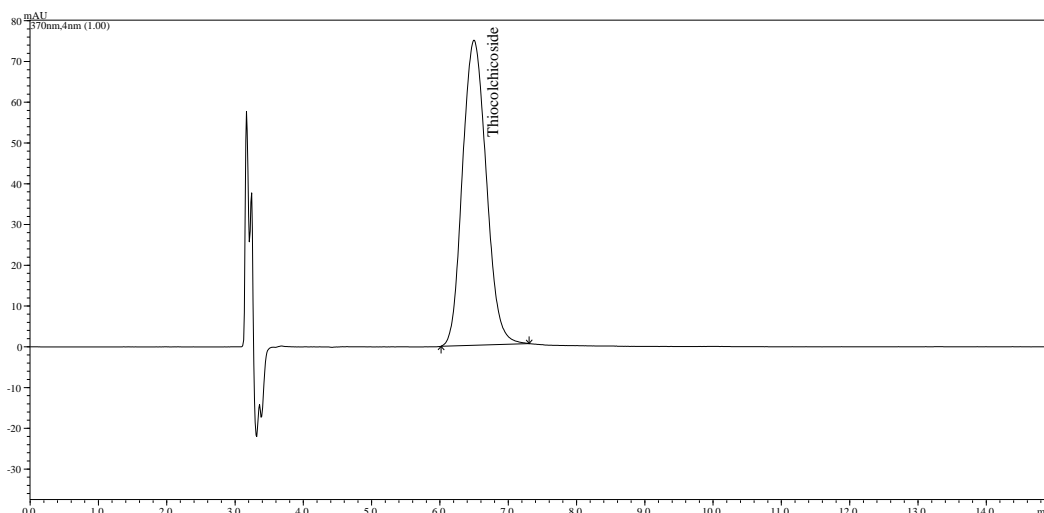
1. Στο χρωματογράφημα του διαλύματος placebo να μην εμφανίζεται κορυφή στον ίδιο χρόνο που εμφανίζεται η κορυφή του θειοκολχικοσίδη (6,6 min).
2. Η καθαρότητα της κορυφής του θειοκολχικοσίδη στο χρωματογράφημα του εμβολιασμένου διαλύματος Β στο φάσμα UV να είναι $\geq 0,98$.
3. Η %RSD των τριών μετρήσεων προτύπου διαλύματος να είναι $\leq 2,0$ (έλεγχος καταλληλότητας συστήματος).

Από τα χρωματογραφήματα που παρατίθενται στη συνέχεια, συμπεραίνεται ότι πληρούνται τα κριτήρια, εφόσον στα διαλύματα placebo δεν εμφανίστηκε κορυφή στα περίπου 6,6 min και η καθαρότητα της κορυφής του θειοκολχικοσίδη στο εμβολιασμένο διάλυμα Β ήταν ίση με 1,00.

Επομένως η μέθοδος χαρακτηρίζεται ως ειδική.



Εικόνα 7.5 Χρωματογράφημα διαλύματος placebo για τη μελέτη της ειδικότητας της μεθόδου προσδιορισμού του θειοκολχικοσίδη



Ουσία	t _R (min)	Εμβαδόν κορυφής	Tailing Factor	Rs	Καθαρότητα κορυφής	Θεωρητικές πλάκες
Θειοκολχικοσίδη	6,493	1809990	1,14	--	1,00	1615

Εικόνα 7.6 Χρωματογράφημα και πίνακας δεδομένων κορυφής για το εμβολιασμένο διάλυμα B 50 µg/mL του θειοκολχικοσίδη

7.6.2 Γραμμικότητα

Παρασκευάστηκαν πέντε πρότυπα διαλύματα θειοκολχικοσίδη, σε συγκεντρώσεις που καλύπτουν ομοιόμορφα το 80-120% της συγκέντρωσης εργασίας. Αρχικά παρασκευάστηκε ένα πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης 1000 µg/mL θειοκολχικοσίδη. Για την παρασκευή αυτού του διαλύματος ζυγίστηκαν με ακρίβεια 10,0 mg υλικού αναφοράς και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 10,0 mL, όπου διαλύθηκαν σε μεθανόλη. Στη συνέχεια έγινε αραιώση με τον ίδιο διαλύτη μέχρι τη χαραγή και έπειτα καλή ανάδευση.

Από το διάλυμα παρακαταθήκης παρασκευάστηκαν τα παρακάτω πρότυπα διαλύματα:

- A. 40 µg/mL (80% της συγκέντρωσης εργασίας): 0,200 mL προτύπου διαλύματος παρακαταθήκης μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 5,0 mL και αραιώθηκαν μέχρι τη χαραγή με κινητή φάση
- B. 45 µg/mL (90% της συγκέντρωσης εργασίας): όπως το διάλυμα A, χρησιμοποιώντας 0,225 mL προτύπου διαλύματος
- Γ. 50 µg/mL (100% της συγκέντρωσης εργασίας): όπως το διάλυμα A, χρησιμοποιώντας 0,250 mL προτύπου διαλύματος
- Δ. 55 µg/mL (110% της συγκέντρωσης εργασίας): όπως το διάλυμα A, χρησιμοποιώντας 0,275 mL προτύπου διαλύματος

E. 60 µg/mL (120% της συγκέντρωσης εργασίας): όπως το διάλυμα A, χρησιμοποιώντας 0,300 mL προτύπου διαλύματος

Ο μέσος όρος των εμβαδών των κορυφών, από τις τρεις μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση, χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης. Στη συνέχεια παρατίθενται ο πίνακας με τα αποτελέσματα των μετρήσεων, η γραφική παράσταση της καμπύλης βαθμονόμησης και το διάγραμμα των υπολοίπων.

Πίνακας 7.1 Αποτελέσματα της μελέτης γραμμικότητας της μεθόδου προσδιορισμού του θειοκολχικοσίδη

% συγκέντρωση εργασίας προτύπου διαλύματος	Συγκέντρωση προτύπου διαλύματος θειοκολχικοσίδη (µg · mL ⁻¹)	Εμβαδόν κορυφής	Μέσος όρος (±SD)/ %RSD
80	40	1424353	1425,04 (±0,81) x 10³ 0,057
		1425934	
		1424843	
90	45	1605287	1599,7 (±4,8) x 10³ 0,30
		1597400	
		1596528	
100	50	1769904	1764,8 (±4,7) x 10³ 0,26
		1760745	
		1763686	
110	55	1959208	1955,4 (±4,4) x 10³ 0,22
		1956270	
		1950644	
120	60	2122210	2119,5 (±3,1) x 10³ 0,14
		2120027	
		2116177	

Η ευθεία παλινδρόμησης που προκύπτει είναι η εξής:

$$y = 34,89 (\pm 0,43) \times 10^3 x + 2,8 (\pm 2,2) \times 10^4$$

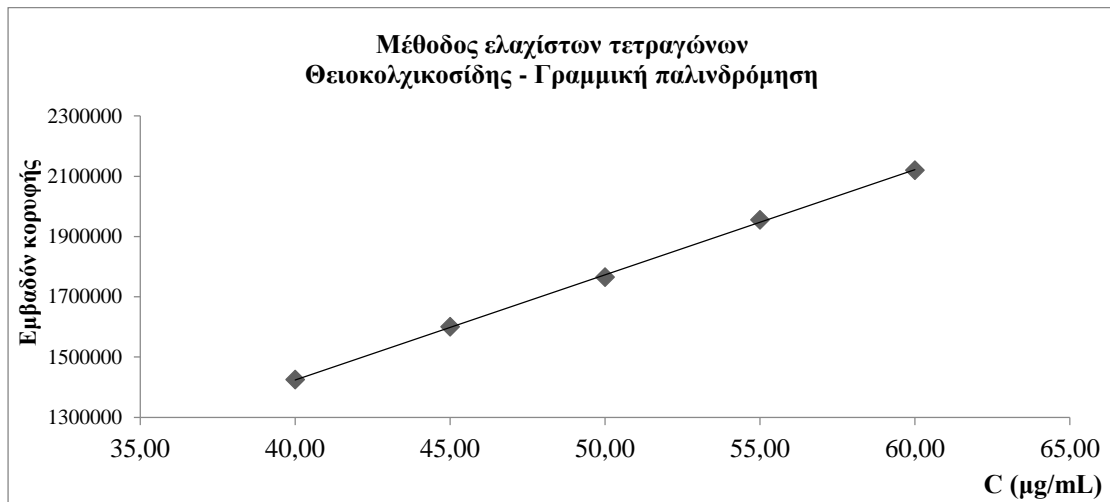
Μονάδες τομής στον άξονα των y: Μονάδες εμβαδού

Μονάδες κλίσης: Μονάδες εμβαδού · mL · µg⁻¹

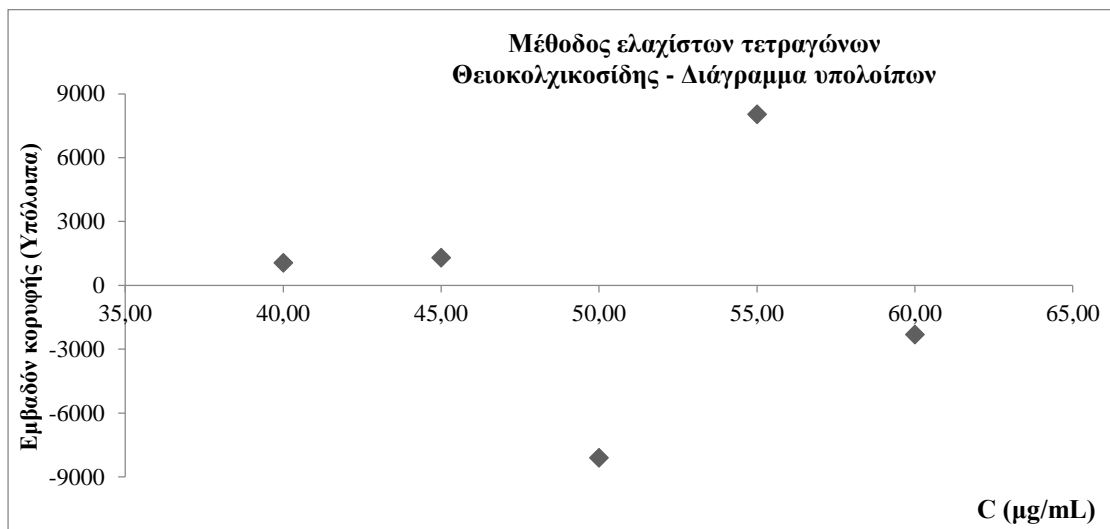
Συντελεστής συσχέτισης (r): 0,9997

Ελέγχεται εάν η ευθεία παλινδρόμησης διέρχεται από το μηδέν:

$t_{\text{πειρ}} = \frac{\text{τομή}}{S_a} = \frac{2,8}{2,2} = 1,27 < 3,18 = t_{\text{θεωρ}}$, για $n = 3$ βαθμούς ελευθερίας και σε στάθμη εμπιστοσύνης 95%, επομένως θεωρείται ότι η ευθεία διέρχεται από το μηδέν και μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος ποσοτικοποίησης ενός προτύπου.



Εικόνα 7.7 Γραφική παράσταση της καμπύλης βαθμονόμησης του θειοκολχικοσίδη



Εικόνα 7.8 Διάγραμμα υπολοίπων του θειοκολχικοσίδη

Η προϋπόθεση για τη γραμμικότητα της μεθόδου είναι ο συντελεστής συσχέτισης να είναι $\geq 0,99$. Η καμπύλη βαθμονόμησης φαίνεται οπτικά γραμμική και ο συντελεστής συσχέτισης βρέθηκε ίσος με 0,9997, επομένως η μέθοδος χαρακτηρίζεται από γραμμικότητα.

7.6.3 Πιστότητα

Πιστότητα Συστήματος

Η πιστότητα εκφράζεται από την % σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) του εμβαδού των κορυφών του θειοκολχικοσίδη, μεταξύ των τριών μετρήσεων για κάθε πρότυπο διάλυμα κατά τον έλεγχο της γραμμικότητας. Η %RSD θα πρέπει να είναι $\leq 1,5$.

Από τον πίνακα 7.1 προκύπτει ότι $\%RSD \leq 0,30$, οπότε βρίσκεται εντός του αποδεκτού ορίου.

Επαναληψιμότητα

Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας παρασκευάστηκαν έξι διαλύματα ελέγχου στο 100% της συγκέντρωσης εργασίας (50 ppm). Επίσης, παρασκευάστηκε ένα πρότυπο διάλυμα θειοκολχικοσίδη 50 ppm. Στη συνέχεια, έγιναν οι μετρήσεις των παραπάνω διαλυμάτων και υπολογίστηκαν η % περιεκτικότητα δραστικής ουσίας κάθε διαλύματος και η % σχετική τυπική απόκλιση μεταξύ αυτών των τιμών.

Η % περιεκτικότητα υπολογίζεται από τον τύπο: $\% \text{περιεκτικότητα} = \frac{A_{\text{test}}}{A_{\text{std}}} \times \frac{C_{\text{theor}}}{C_{\text{test}}} \times 100$

Για να θεωρηθεί επαναλήψιμη η μέθοδος θα πρέπει $\%RSD \leq 2,0$.

Ενδιάμεση πιστότητα (Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα)

Γίνονται δύο επιπλέον μελέτες επαναληψιμότητας, με μετρήσεις οι οποίες έγιναν: α) σε διαφορετική ημέρα και β) από διαφορετικό αναλυτή και σε διαφορετικό όργανο, με τις ίδιες συνθήκες ανάλυσης. Για την πραγματοποίηση αυτών των μελετών παρασκευάστηκαν ένα πρότυπο διάλυμα θειοκολχικοσίδη και τρία ανεξάρτητα διαλύματα ελέγχου, με την ίδια διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας της μεθόδου. Στη συνέχεια υπολογίστηκαν η % περιεκτικότητα και η % σχετική τυπική απόκλιση.

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας τη μονόδρομη ANOVA (One Way Anova) και υπολογίστηκαν οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις $\%RSD_r$ και $\%RSD_R$ από τους τύπους που αναφέρονται στο εδάφιο 5.7.3.

Θα πρέπει να ισχύει $\%RSD_r \leq 2,0$ και $\%RSD_R \leq 5,0$.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη μελέτη της πιστότητας για τον θειοκολχικοσίδη.

Πίνακας 7.2 Αποτελέσματα της μελέτης πιστότητας της μεθόδου προσδιορισμού του θειοκολχικοσίδη

	Εμβαδόν κορυφής θειοκολχικοσ. σε πρότυπο διάλυμα	Εμβαδόν κορυφής θειοκολχικοσ. σε διάλυμα ελέγχου	Συγκέντρωση διαλύματος ελέγχου ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	% περιεκτι κότητα	Μέσος όρος($\pm\text{SD}$)/ RSD, %
Αναλυτής 1	1702722	1717229	50,32	101,14	
	1698575	1693189	50,02	100,33	
Ημέρα 1	Μέσος όρος 1700649	1658006	49,72	98,82	100,06($\pm 0,92$)
		1712793	50,32	100,88	0,92
Όργανο 1	C_{std} ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 50,40	1688053	50,02	100,02	
		1663845	49,72	99,17	
	1697534				
Αναλυτής 2	1693222	1660596	49,77	98,60	98,59($\pm 0,80$)
	Μέσος όρος 1691994	1645250	49,72	97,78	0,81
Όργανο 2	C_{std} ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 50,10	1673795	49,77	99,39	
	1697392				
	1698609	1663963	49,77	98,65	98,48($\pm 0,67$)
Ημέρα 2	Μέσος όρος 1698001	1646961	49,72	97,73	0,68
	C_{std} ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 50,10	1670569	49,77	99,04	

Επαναληψιμότητα %RSD = 0,92

%RSD_r = 0,85

Ενδιάμεση πιστότητα %RSD_R = 1,2

Με βάση τα παραπάνω αποδεικνύεται ότι πληρούνται τα κριτήρια αποδοχής για την πιστότητα της μεθόδου για τον θειοκολχικοσίδη.

7.6.4 Ακρίβεια

Παρασκευάστηκαν τρία ανεξάρτητα εμβολιασμένα διαλύματα, τα οποία περιείχαν τόσο την προσδιοριζόμενη δραστική ουσία, όσο και τα έκδοχα (υποκεφάλαιο 5.1), σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων, τα οποία καλύπτουν το εύρος της γραμμικότητας. Επίσης παρασκευάστηκε ένα πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης $10,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

θειοκολχικοσίδη σε μεθανόλη, καθώς και ένα πρότυπο διάλυμα θειοκολχικοσίδη στο 100% της συγκέντρωσης εργασίας.

Τα εμβολιασμένα διαλύματα για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης, για τον προσδιορισμό της ακρίβειας παρασκευάστηκαν ως εξής:

- **Εμβολιασμένο διάλυμα Α (επίπεδο συγκέντρωσης θειοκολχικοσίδη 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, που αντιστοιχεί στο 80% της συγκέντρωσης εργασίας):** Ζυγίστηκε με ακρίβεια ποσότητα διαλύματος placebo ίση με 0,97 g, μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 25,0 mL και προστέθηκαν σε αυτήν 0,200 mL από το πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης. Προστέθηκε μεθανόλη, η ογκομετρική φιάλη μεταφέρθηκε σε λουτρό υπερήχων για 5 min και έγινε αραίωση με τον ίδιο διαλύτη μέχρι τη χαραγή. Στη συνέχεια, 5,0 mL από το διάλυμα αυτό, μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 10,0 mL. Ακολούθησε καλή ανάδευση και αραίωση με κινητή φάση μέχρι τη χαραγή.
- **Εμβολιασμένο διάλυμα Β (επίπεδο συγκέντρωσης θειοκολχικοσίδη 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, που αντιστοιχεί στο 100% της συγκέντρωσης εργασίας):** όπως το διάλυμα Α, χρησιμοποιώντας 0,250 mL από το πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης.
- **Εμβολιασμένο διάλυμα Γ (επίπεδο συγκέντρωσης θειοκολχικοσίδη 60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, που αντιστοιχεί στο 120% της συγκέντρωσης εργασίας):** όπως το διάλυμα Α, χρησιμοποιώντας 0,300 mL από το πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης.

Η % ανάκτηση υπολογίστηκε ως εξής:

$$\% \text{ Ανάκτηση} = \frac{\% \text{ περιεκτικότητα θειοκολχικοσίδη}}{\% \text{ ενίσχυση}} \times 100$$

Για να κριθεί η μέθοδος ως ακριβής, θα πρέπει οι τιμές της % ανάκτησης να βρίσκονται μεταξύ 98-102% και η %RSD των ανακτήσεων σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης να είναι $\leq 2,0$.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων από τη μελέτη της ακρίβειας της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού του θειοκολχικοσίδη.

Πίνακας 7.3 Αποτελέσματα της μελέτης ακρίβειας της μεθόδου προσδιορισμού του θειοκολχικοσίδη

Εμβολ. δ/μα	Εμβαδόν θειοκολχικοσίδη σε πρότυπο διάλυμα ($C_{std} = 50,10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Εμβαδόν θειοκολχ. σε εμβολιασμένο διάλυμα	% Ενίσχυση	% Ανάκτηση	Μέσος όρος (\pm SD)/ RSD, %
A		1364741		100,57	
		1363082	80,21	100,45	100,53 (\pm0,08)
		1365047		100,59	0,077
B	1695980	1797369		98,37	
	1695948	1809990	108,00	99,06	98,51 (\pm0,50)
	1693771	1792442		98,10	0,50
Γ	Μέσος όρος	1695233		98,28	
		1902884	114,30	98,41	98,31 (\pm0,09)
		1902946		98,23	0,090
		1899602			

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι η % ανάκτηση βρίσκεται μεταξύ 98,10-100,59% και η %RSD είναι $\leq 0,50$. Επομένως, η μέθοδος είναι ακριβής για τον ποσοτικό προσδιορισμό του θειοκολχικοσίδη.

7.6.5 Εύρος

Από τις μελέτες γραμμικότητας και ακρίβειας προκύπτει ότι το εύρος συγκεντρώσεων είναι $40 - 60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, το οποίο αντιστοιχεί στο 80 - 120% της συγκέντρωσης εργασίας.

7.6.6 Ανθεκτικότητα

I. Έγινε εκτίμηση της επίδρασης των παρακάτω παραγόντων στην ανθεκτικότητα της μεθόδου:

- Ταχύτητα ροής της κινητής φάσης
- Θερμοκρασία της στήλης
- Αναλογία σύστασης κινητής φάσης $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$

Συγκεκριμένα, έγιναν οι ακόλουθες μεταβολές:

Παράγοντας A: Ταχύτητα ροής κινητής φάσης +επίπεδο: 1,0 -επίπεδο: 1,1
(mL/min)

Παράγοντας B: θερμοκρασία στήλης +επίπεδο: 30 -επίπεδο: 28

Παράγοντας Γ: Αναλογία $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ +επίπεδο: 85/15 -επίπεδο: 86/14

Για να κριθεί η μέθοδος ως ανθεκτική, θα πρέπει η % σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) να είναι $\leq 2,0$.

Πίνακας 7.4 Πειραματικός σχεδιασμός μελέτης ανθεκτικότητας

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

Πίνακας 7.5 Αποτελέσματα της μελέτης ανθεκτικότητας της μεθόδου προσδιορισμού του θειοκολχικοσίδη

Πείραμα	Εμβαδόν κορυφής θειοκολχικοσίδη σε πρότυπο διάλυμα	Μέσος όρος (\pm SD)/RSD %
Y1	1706611	$170,38 (\pm 0,32) \times 10^4$ 0,19
	1700257	
	1704422	
Y2	1552835	$155,28 (\pm 0,12) \times 10^4$ 0,078
	1553952	
	1551522	
Y3	1695573	$169,75 (\pm 0,17) \times 10^4$ 0,10
	1698264	
	1698808	
Y4	1545846	$154,30 (\pm 0,25) \times 10^4$ 0,16
	1540919	
	1542367	

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι και για τις τρεις μεταβολές που έγιναν, η %RSD είναι $< 2,0$, επομένως δεν επηρεάζουν σημαντικά τη μέθοδο.

II. Σταθερότητα διαλυμάτων

Παρασκευάστηκαν διαλύματα ελέγχου, τα οποία αναλύονται αμέσως μετά την παρασκευή τους και στη συνέχεια, μετά από 24 ώρες αποθήκευσής τους στους 25 °C. Επίσης παρασκευάστηκε ένα πρότυπο διάλυμα θειοκολχικοσίδη.

Για να αποδειχτεί η σταθερότητα των διαλυμάτων, θα πρέπει οι τιμές της % ανάκτησης έναντι της αρχικής περιεκτικότητας στο φρέσκο διάλυμα να βρίσκονται μεταξύ 98-102% και η %RSD των τιμών ανάκτησης να είναι $\leq 2,0$.

Πίνακας 7.6 Αποτελέσματα της μελέτης σταθερότητας της μεθόδου προσδιορισμού του θειοκολχικοσίδη

	Εμβαδόν κορυφής θειοκολχικοσίδη σε πρότυπο διάλυμα ($C_{std} = 50.40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Εμβαδόν κορυφής θειοκολχικοσίδη σε διάλυμα ελέγχου	Συγκέντρωση διαλύματος ελέγχου ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	% περιεκτικότητα
Φρέσκο διάλυμα	1702722	1717229	50,32	101,14
	1698575	1693189	50,02	100,33
	Μέσος όρος	1700649	1658006	49,72
Μετά από 24 ώρες	1706936	1707260	50,32	100,56
	1701148	1685476	50,02	99,87
	Μέσος όρος	1704042	1655730	49,72

	% Ανάκτηση έναντι φρέσκου δ/ματος
1	99,42
2	99,54
3	99,86
Μέσος όρος (\pmSD), RSD, %	99,61 (\pm0,23), 0,23

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι τα διαλύματα του θειοκολχικοσίδη παραμένουν σταθερά για τουλάχιστον 24 ώρες.

7.7 Συμπέρασμα

Από την αξιολόγηση των παραπάνω χαρακτηριστικών ποιότητας της μεθόδου, κρίθηκε ότι η μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού του θειοκολχικοσίδη σε δερματικό διάλυμα ικανοποιεί όλες τις απαιτήσεις και επομένως, είναι κατάλληλη για τον σκοπό για τον οποίο αναπτύχθηκε.

8. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ ΤΟΥ ΘΕΙΟΚΟΛΧΙΚΟΣΙΔΗ ΣΕ ΔΕΡΜΑΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ

8.1 Ανάπτυξη της μεθόδου

Με τον ίδιο τρόπο που παρασκευάστηκαν τα διαλύματα για τον προσδιορισμό της δραστικής ουσίας, δηλαδή πρώτα με διάλυση σε μεθανόλη και στη συνέχεια με αραιώση σε $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 90:10 v/v, παρασκευάστηκε ένα εμβολιασμένο διάλυμα Β συγκέντρωσης 300 ppm. Στο διάλυμα αυτό, προστέθηκαν οι τρεις προσμίξεις (εδάφιο 2.2.2) στο 0,5% της συγκέντρωσης. Ακολούθησε ισοκρατική χρωματογραφία με αναλογία διαλυτών $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 90:10 v/v και τις υπόλοιπες παραμέτρους ίδιες με αυτές που εφαρμόστηκαν στη μέθοδο προσδιορισμού της δραστικής ουσίας (υποκεφάλαιο 7.4). Η κορυφή της κολχικίνης εμφανίστηκε πολύ νωρίς, στα 3,9 min, επομένως έπρεπε να δοκιμαστεί διαφορετικό πρόγραμμα έκλουσης. Παρασκευάστηκε νέο εμβολιασμένο διάλυμα Β 300 ppm, στο οποίο προστέθηκαν οι προσμίξεις στο 2,0% της συγκέντρωσης εργασίας, με τη διαφορά ότι μετά τη διάλυση με μεθανόλη, η αραιώση έγινε με $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 95:5 v/v. Εφαρμόστηκε ένα πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης, το οποίο είχε δοκιμαστεί και κατά την ανάπτυξη της μεθόδου προσδιορισμού του θειοκολχικοσίδη.

Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης 8.1

Χρόνος (min)	% CHCl_3	% MeOH
0-7	95	5
7-30	50	50
30,01	95	5
50	Τέλος	

Ο χρόνοι συγκράτησης της κολχικίνης και του θειοκολχικοσίδη ήταν 6,3 min και 21,7 min, αντίστοιχα. Ο κολχικοσίδης δε διαχωρίστηκε καλά από τον Ν-φορμυλο-θειοκολχικοσίδη. Σε αντίθεση με την προηγούμενη φορά που είχε δοκιμαστεί το ίδιο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης, αυτή τη φορά υπήρξε κακός διαχωρισμός μεταξύ των κορυφών των δύο προσμίξεων και του θειοκολχικοσίδη, καθώς οι τρεις κορυφές αλληλεπικαλύπτονται. Αυτό συνέβη διότι η συγκέντρωση εργασίας αυξήθηκε πλέον στα 300 ppm, με αποτέλεσμα οι κορυφές να πλαταίνουν και να υπάρχει αλληλεπικάλυψη.

Δοκιμάζοντας ξανά ισοκρατική χρωματογραφία με αναλογία διαλυτών στην κινητή φάση $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 95:5 v/v, οι χρόνοι συγκράτησης αυξήθηκαν πολύ, με τον θειοκολχικοσίδη και τις δύο προμίξεις να εκλούνται σε περισσότερο από 40 min.

Στη συνέχεια, αναφέρονται ορισμένα προγράμματα βαθμιδωτής έκλουσης τα οποία χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και κάποιες αλλαγές στις παραμέτρους:

- Εμβολιασμένο διάλυμα Β συγκέντρωσης 300 ppm, στο οποίο έχουν προστεθεί οι προσμίξεις σε ποσοστό 0,5%, αναλύθηκε με το πρόγραμμα:

Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης 8.2

Χρόνος (min)	% CHCl_3	% MeOH
0-7	95	5
7-30	70	30
30,01	95	5
50	95	5

Οι χρόνοι συγκράτησης της κολχικίνης και του κολχικοσίδη ήταν 6,4 min και 26,0 min, αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε ότι υπάρχει, σε ένα βαθμό, αλληλεπικάλυψη μεταξύ των κορυφών του Ν-φορμυλο-θειοκολχικοσίδη και του θειοκολχικοσίδη.

- Έγινε αλλαγή στη συγκέντρωση εργασίας από τα 300 ppm στα 150 ppm με στόχο να γίνουν πιο στενές οι κορυφές, ώστε να μην υπάρχει αλληλεπικάλυψη. Επίσης, ο όγκος της ένεσης αυξήθηκε από τα 20 μL στα 40 μL , για να εμφανίζονται καλύτερα οι κορυφές των προσμίξεων, λόγω του ότι βρίσκονται σε μικρή συγκέντρωση (0,5%). Το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης παρέμεινε ίδιο με πριν. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι δεν υπήρξε η αναμενόμενη βελτίωση.
- Επιστρέφοντας σε συγκέντρωση εργασίας 300 ppm και σε όγκο ένεσης 20 μL , χρησιμοποιήθηκε ένα πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης, στο οποίο έγινε μία πιο απότομη αλλαγή στην αναλογία των δύο διαλυτών, με σκοπό τη βελτίωση του διαχωρισμού.

Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης 8.3

Χρόνος (min)	% CHCl_3	% MeOH
0-7	95	5
7-15	70	30
15-50	95	5

Με το πρόγραμμα αυτό, επίσης δεν υπήρξε η επιθυμητή βελτίωση.

Έπειτα από τις παραπάνω δοκιμές, συμπεραίνεται ότι το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης, το οποίο έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα, είναι το πρόγραμμα 8.2.

Η συγκέντρωση εργασίας ορίζεται στα 300 ppm, έτσι ώστε οι κορυφές από το διάλυμα αναφοράς 0,2% και από τις προσμίξεις στο 0,5% της συγκέντρωσης εργασίας, να μπορούν να διακρίνονται καλά στα χρωματογραφήματα. Τα διαλύματα παρακαταθήκης θα παρασκευάζονται με διάλυση σε μεθανόλη. Για τα υπόλοιπα διαλύματα, ως διαλύτης θα χρησιμοποιείται μείγμα CHCl₃:MeOH σε αναλογία 95:5. Στο εξής, το μείγμα CHCl₃:MeOH σε αναλογία 95:5 θα αναφέρεται ως διαλύτης.

8.2 Παρασκευή διαλυμάτων

8.2.1 Παρασκευή διαλύματος ελέγχου

Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 2,3 g δερματικού διαλύματος (τα οποία αντιστοιχούν σε 6,0 mg θειοκολχικοσίδη) απευθείας σε ογκομετρική φιάλη των 10,0 mL και αραιώθηκαν με μεθανόλη μέχρι τη χαραγή. Ακολούθησε καλή ανάδευση. Στη συνέχεια, 5,0 mL από το διάλυμα αυτό, μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 10,0 mL, αραιώθηκαν με διαλύτη μέχρι τη χαραγή και αναδεύτηκαν καλά.

8.2.2 Παρασκευή διαλύματος αναφοράς 0,2% (reference solution)

Ποσότητα 1,0 mL από το διάλυμα ελέγχου μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 10,0 mL και αραιώθηκε με διαλύτη μέχρι τη χαραγή. Ακολούθησε καλή ανάδευση. Στη συνέχεια, 1,0 mL από το διάλυμα αυτό, μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 50,0 mL, αραιώθηκε με διαλύτη μέχρι τη χαραγή και αναδεύτηκε καλά.

8.3 Ποσοτικοποίηση

Ο υπολογισμός της % περιεκτικότητας της κάθε πρόσμιξης του θειοκολχικοσίδη γίνεται με βάση την παρακάτω εξίσωση:

$$\% \text{ περιεκτικότητα} = \frac{A_{\text{προσμ.}}}{A_{\text{αναφ.}}} \times \frac{1}{\Sigma A} \times 0,2\%$$

$A_{\text{προσμ.}}$ = Το εμβαδόν της κορυφής κάθε πρόσμιξης του θειοκολχικοσίδη στο χρωματογράφημα του διαλύματος ελέγχου

$A_{\text{αναφ.}}$ = Το εμβαδόν της κορυφής του θειοκολχικοσίδη στο χρωματογράφημα του διαλύματος αναφοράς 0,2%

ΣA = Ο Συντελεστής Απόκρισης κάθε πρόσμιξης (RF = Response Factor), που υπολογίστηκε στο εδάφιο 8.5.3

	Κολχικίνη	N-φορμυλο-θειοκολχικοσίδης	Κολχικοσίδης	Οποιαδήποτε άλλη πρόσμιξη
RRt	0,26	1,03	1,07	-
RF	1,18	0,84	0,5	1,0

όπου RRt = Relative Retention time (Σχετικός χρόνος συγκράτησης)

8.4 Χρωματογραφικές παράμετροι

Οι χρωματογραφικές παράμετροι είναι αυτές που περιγράφηκαν στο υποκεφάλαιο 7.4, με τη διαφορά ότι για τον προσδιορισμό των προσμίξεων ακολουθείται το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης 8.2.

8.5 Επικύρωση της μεθόδου

8.5.1 Ειδικότητα

Παρασκευάστηκε διάλυμα, το οποίο περιείχε όλα τα έκδοχα (υποκεφάλαιο 5.1) και τη νατριούχο δικλοφαινάκη, σύμφωνα με τη σύσταση του τελικού προϊόντος, εκτός από τον θειοκολχικοσίδη. Στη συνέχεια, από το διάλυμα αυτό, παρασκευάστηκε διάλυμα ελέγχου placebo, με την ίδια ακριβώς διαδικασία που περιγράφηκε για τα διαλύματα ελέγχου στο εδάφιο 8.2.1.

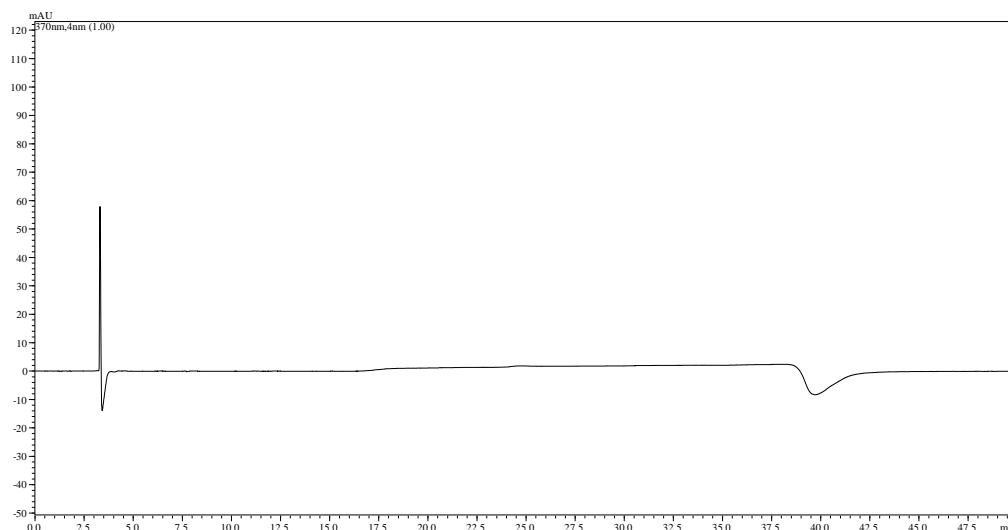
Επίσης παρασκευάστηκε εμβολιασμένο διάλυμα Β στη συγκέντρωση εργασίας, με διαδικασία η οποία περιγράφεται αναλυτικά στο εδάφιο 8.5.5.

Τα κριτήρια αποδοχής για την ειδικότητα της μεθόδου είναι τα εξής:

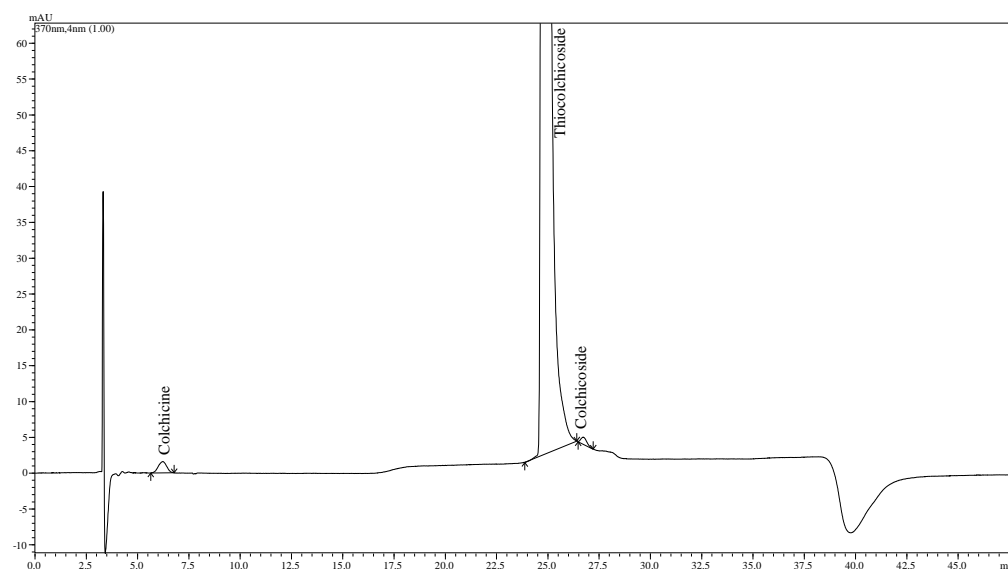
1. Στο χρωματογράφημα του διαλύματος placebo να μην εμφανίζονται κορυφές στους ίδιους χρόνους που εμφανίζονται οι κορυφές των προσμίξεων του θειοκολχικοσίδη.
2. Η καθαρότητα των κορυφών των προσμίξεων του θειοκολχικοσίδη στο εμβολιασμένο διάλυμα Β στο φάσμα UV να είναι $\geq 0,98$.

Στο χρωματογράφημα του διαλύματος placebo δεν εμφανίστηκαν κορυφές στους χρόνους συγκράτησης των προσμίξεων του θειοκολχικοσίδη (δηλαδή περίπου στα 6,4 min για την κολχικίνη, στα 25,8 min για τον N-φορμυλο-θειοκολχικοσίδη και στα 26,8 min για τον κολχικοσίδη) και η καθαρότητα των κορυφών των προσμίξεων του θειοκολχικοσίδη στο εμβολιασμένο διάλυμα Β βρέθηκε $> 0,98$.

Επομένως η μέθοδος χαρακτηρίζεται ως ειδική.



Εικόνα 8.1 Χρωματογράφημα διαλύματος placebo για τη μελέτη της ειδικότητας της μεθόδου προσδιορισμού των προσμίξεων του θειοκολχικοσίδη



Ουσία	t _R (min)	Εμβαδόν κορυφής	Tailing Factor	Rs	Καθαρότητα κορυφής
Κολχικίνη	6,215	45258	0,99	--	0,99
Θειοκολχικοσίδης	24,844	9914588	1,51	28,64	1,00
Κολχικοσίδης	26,706	19849	--	3,56	0,97

Εικόνα 8.2 Χρωματογράφημα και πίνακας δεδομένων κορυφών για το εμβολιασμένο διάλυμα Β για τις προσμίξεις του θειοκολχικοσίδη

8.5.2 Γραμμικότητα

Παρασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα:

- Πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης θειοκολχικοσίδη (1000 ppm) σε μεθανόλη
- Διάλυμα παρακαταθήκης – μείγμα των τριών προσμίξεων του θειοκολχικοσίδη (1000 ppm) σε μεθανόλη.
- Ενδιάμεσο διάλυμα παρακαταθήκης (20 ppm) που περιείχε θειοκολχικοσίδη και τις τρεις προσμίξεις

Από το ενδιάμεσο διάλυμα παρακαταθήκης, παρασκευάστηκαν τα πέντε ακόλουθα πρότυπα διαλύματα, σε συγκεντρώσεις που καλύπτουν ομοιόμορφα το 0,05-1,0% της συγκέντρωσης εργασίας:

- A. 0,15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (το οποίο αντιστοιχεί στο 0,05% της συγκέντρωσης εργασίας): 0,075 mL ενδιάμεσου διαλύματος παρακαταθήκης μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 10,0 mL και αραιώθηκαν μέχρι τη χαραγή με διαλύτη
- B. 0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (το οποίο αντιστοιχεί στο 0,1% της συγκέντρωσης εργασίας): όπως το διάλυμα A, χρησιμοποιώντας 0,150 mL ενδιάμεσου διαλύματος παρακαταθήκης
- Γ. 0,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (το οποίο αντιστοιχεί στο 0,2% της συγκέντρωσης εργασίας): όπως το διάλυμα A, χρησιμοποιώντας 0,300 mL ενδιάμεσου διαλύματος παρακαταθήκης
- Δ. 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (το οποίο αντιστοιχεί στο 0,5% της συγκέντρωσης εργασίας): όπως το διάλυμα A, χρησιμοποιώντας 0,750 mL ενδιάμεσου διαλύματος παρακαταθήκης
- E. 3,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (το οποίο αντιστοιχεί στο 1,0% της συγκέντρωσης εργασίας): όπως το διάλυμα A, χρησιμοποιώντας 1,500 mL ενδιάμεσου διαλύματος παρακαταθήκης

Ο μέσος όρος των εμβαδών των κορυφών, από τις τρεις μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση, χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης για κάθε πρόσμιξη.

Ο συντελεστής συσχέτισης (r) θα πρέπει να είναι $> 0,99$.

Στη συνέχεια παρατίθενται οι πίνακες με τα αποτελέσματα των μετρήσεων, οι γραφικές παραστάσεις της καμπύλης βαθμονόμησης και τα διαγράμματα των υπολοίπων.

Πίνακας 8.1 Αποτελέσματα της μελέτης γραμμικότητας της μεθόδου προσδιορισμού της κολχικίνης

Πρότυπο διάλυμα κολχικίνης/ % συγκέντρωσης εργασίας	Συγκέντρωση $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Εμβαδόν κορυφής	Μέσος όρος ($\pm\text{SD}$)/ %RSD
0,05	0,15	4212	42,41 ($\pm 0,36$) x 10² 0,84
		4230	
		4281	
0,1	0,30	9992	98,7 ($\pm 1,1$) x 10² 1,1
		9830	
		9777	
0,2	0,60	17550	176,6 ($\pm 2,3$) x 10² 1,3
		17915	
		17503	
0,5	1,50	51111	509,8 ($\pm 2,4$) x 10² 0,47
		50702	
		51118	
1,0	3,00	100489	1000,9 ($\pm 3,5$) x 10² 0,35
		99942	
		99833	

Η ευθεία παλινδρόμησης που προκύπτει είναι η εξής:

$$y = 33,80 (\pm 0,54) \times 10^3 x - 0,95 (\pm 0,83) \times 10^3$$

Μονάδες τομής στον άξονα των y: Μονάδες εμβαδού

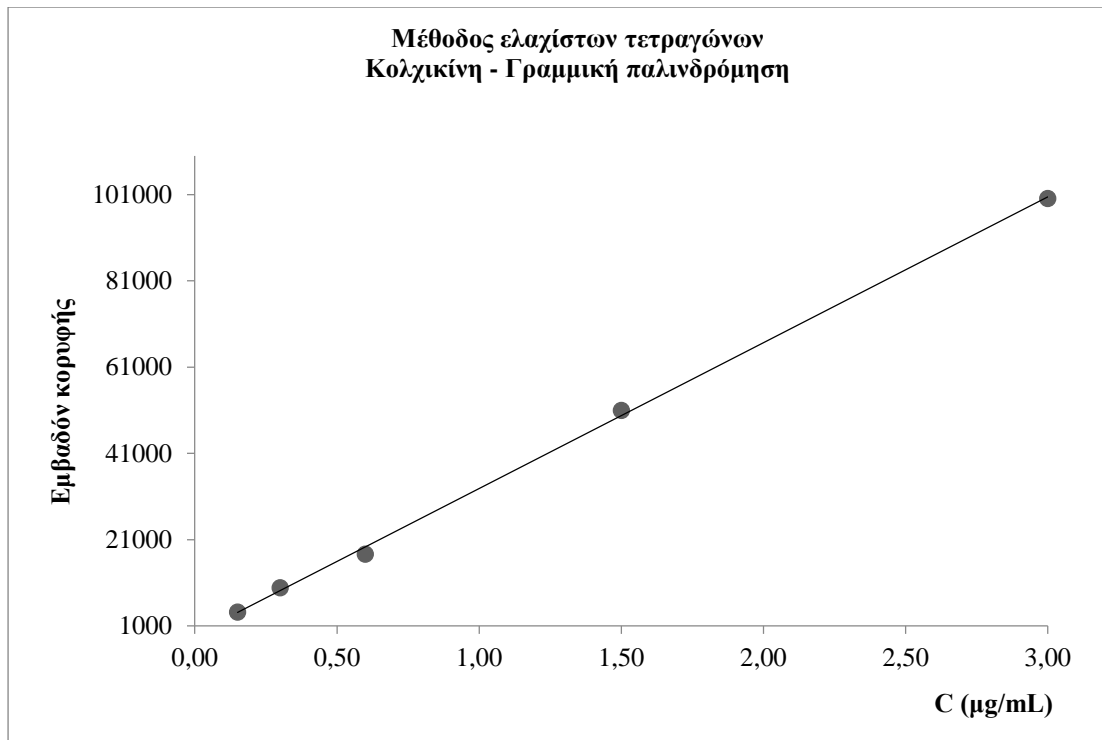
Μονάδες κλίσης: Μονάδες εμβαδού $\cdot \text{mL} \cdot \mu\text{g}^{-1}$

Συντελεστής συσχέτισεως (r): 0,9996

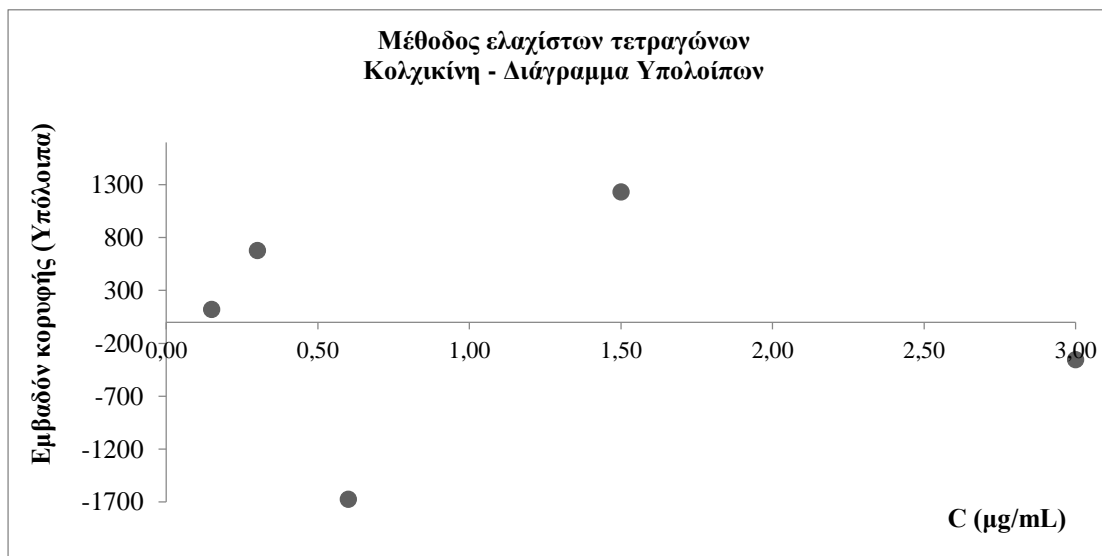
Ελέγχεται εάν η ευθεία παλινδρόμησης διέρχεται από το μηδέν:

$$t_{\text{πειρ}} = \frac{|\text{τομή}|}{S_a} = \frac{|-0,95|}{0,83} = 1,14 < 3,18 = t_{\text{θεωρ}}, \text{ για } n = 3 \text{ βαθμούς ελευθερίας και σε}$$

στάθμη εμπιστοσύνης 95%, επομένως θεωρείται ότι η ευθεία διέρχεται από το μηδέν.



Εικόνα 8.3 Γραφική παράσταση της καμπύλης βαθμονόμησης της κολχικίνης



Εικόνα 8.4 Διάγραμμα υπολοίπων της κολχικίνης

Η μέθοδος πληροί τα απαιτούμενα κριτήρια και χαρακτηρίζεται από γραμμικότητα.

Πίνακας 8.2 Αποτελέσματα της μελέτης γραμμικότητας της μεθόδου προσδιορισμού του N-φορμυλο-θειοκολχικოსίδης

Πρότυπο διάλυμα N-φορμυλο-θειοκολχικοςίδης/ % συγκέντρωσης εργασίας	Συγκέντρωση ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Εμβαδόν κορυφής	Μέσος όρος ($\pm\text{SD}$)/ %RSD
0,05	0,15	2236	22,58 ($\pm 0,25$) x 10² 1,1
		2285	
		2254	
0,1	0,30	5129	51,07 ($\pm 0,53$) x 10² 1,0
		5046	
		5145	
0,2	0,60	11285	112,84 ($\pm 0,50$) x 10² 0,44
		11234	
		11334	
0,5	1,50	33088	331,1 ($\pm 1,6$) x 10² 0,49
		32955	
		33277	
1,0	3,00	69733	702,0 ($\pm 6,2$) x 10² 0,88
		69968	
		70900	

Η ευθεία παλινδρόμησης που προκύπτει είναι η εξής:

$$y = 24,01 (\pm 0,36) \times 10^3 x - 2,26 (\pm 0,56) \times 10^3$$

Μονάδες τομής στον άξονα των y: Μονάδες εμβαδού

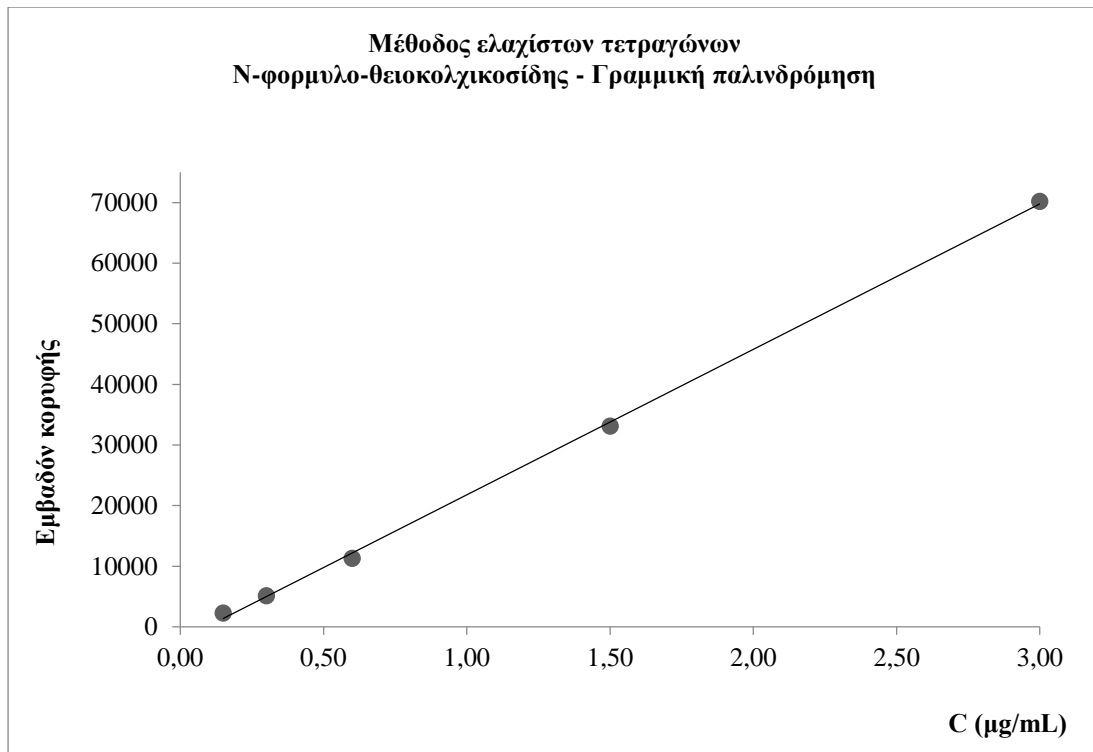
Μονάδες κλίσης: Μονάδες εμβαδού $\cdot \text{mL} \cdot \mu\text{g}^{-1}$

Συντελεστής συσχέτισεως (r): 0,9996

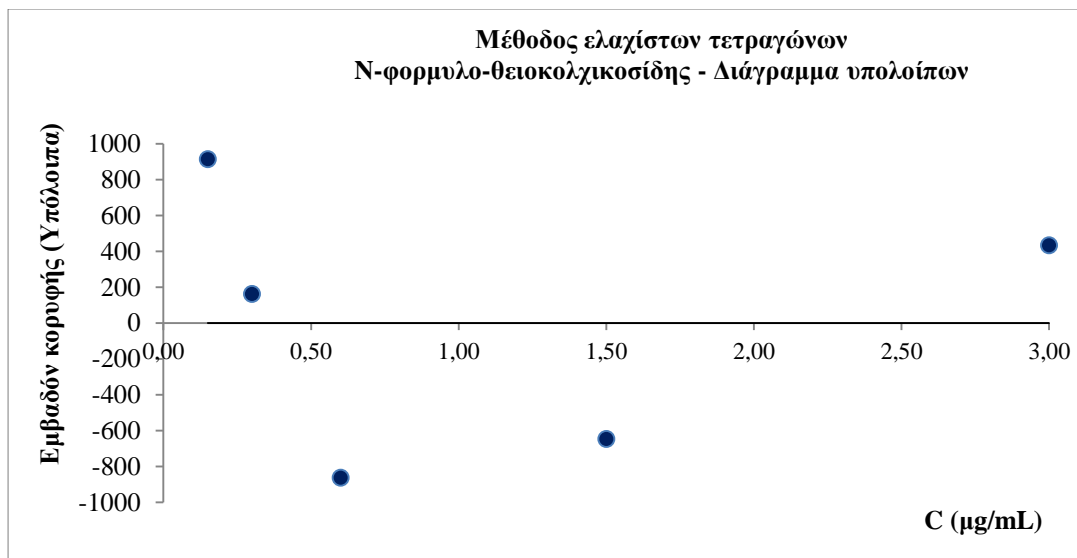
Ελέγχεται εάν η ευθεία παλινδρόμησης διέρχεται από το μηδέν:

$$t_{\text{πειρ}} = \frac{|\text{τομή}|}{S_a} = \frac{|-2,26|}{0,56} = 4,04 > 3,18 = t_{\text{θεωρ}}, \text{ για } \nu = 3 \text{ βαθμούς ελευθερίας και σε}$$

στάθμη εμπιστοσύνης 95%. Οριακά η ευθεία δε διέρχεται από το μηδέν των αξόνων.



Εικόνα 8.5 Γραφική παράσταση της καμπύλης βαθμονόμησης του N-φορμυλο-θειοκολχικισίδης



Εικόνα 8.6 Διάγραμμα υπολοίπων του N-φορμυλο-θειοκολχικισίδης

Η μέθοδος πληροί τα απαιτούμενα κριτήρια και χαρακτηρίζεται από γραμμικότητα.

Πίνακας 8.3 Αποτελέσματα της μελέτης γραμμικότητας της μεθόδου προσδιορισμού του κολχικοσίδη

Πρότυπο διάλυμα κολχικοσίδη/ % συγκέντρωσης εργασίας	Συγκέντρωση ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Εμβαδόν κορυφής	Μέσος όρος ($\pm\text{SD}$)/ %RSD
0,05	0,15	1585	15,787 ($\pm 0,085$) x 10² 0,54
		1582	
		1569	
0,1	0,30	3800	38,15 ($\pm 0,14$) x 10² 0,37
		3817	
		3828	
0,2	0,60	6585	65,50 ($\pm 0,64$) x 10² 0,98
		6476	
		6590	
0,5	1,50	20226	203,1 ($\pm 1,7$) x 10² 0,83
		20194	
		20500	
1,0	3,00	44198	440,7 ($\pm 1,4$) x 10² 0,32
		43924	
		44101	

Η ευθεία παλινδρόμησης που προκύπτει είναι η εξής:

$$y = 14,95 (\pm 0,39) \times 10^3 x - 1,31 (\pm 0,59) \times 10^3$$

Μονάδες τομής στον άξονα των y: Μονάδες εμβαδού

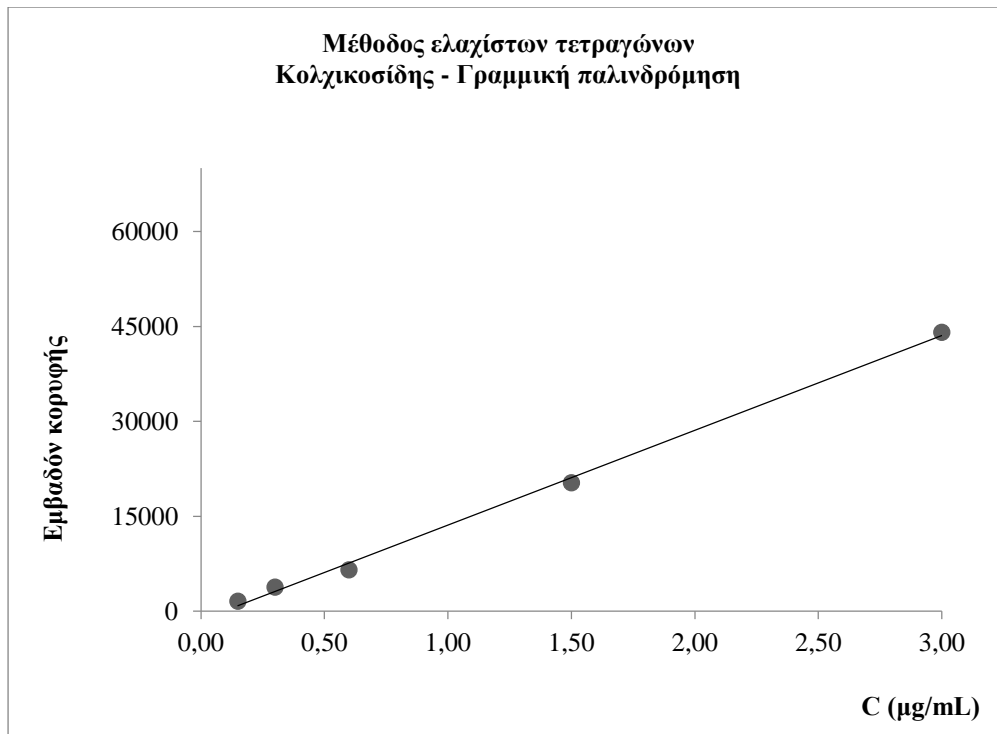
Μονάδες κλίσης: Μονάδες εμβαδού $\cdot \text{mL} \cdot \mu\text{g}^{-1}$

Συντελεστής συσχέτισεως (r): 0,999

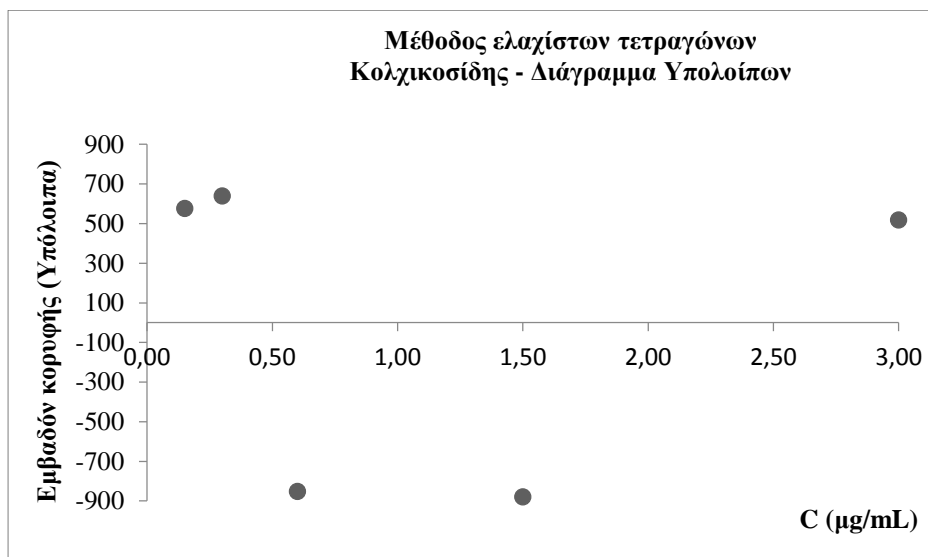
Ελέγχεται εάν η ευθεία παλινδρόμησης διέρχεται από το μηδέν:

$$t_{\text{πειρ}} = \frac{|\text{τομή}|}{S_a} = \frac{|-1,31|}{0,59} = 2,22 < 3,18 = t_{\text{θεωρ}}, \text{ για } \nu = 3 \text{ βαθμούς ελευθερίας και σε}$$

στάθμη εμπιστοσύνης 95%, επομένως θεωρείται ότι η ευθεία διέρχεται από το μηδέν.



Εικόνα 8.7 Γραφική παράσταση της καμπύλης βαθμονόμησης του κολχικοσίδη



Εικόνα 8.8 Διάγραμμα υπολοίπων του κολχικοσίδη

Η μέθοδος πληροί τα απαιτούμενα κριτήρια και χαρακτηρίζεται από γραμμικότητα.

Πίνακας 8.4 Αποτελέσματα της μελέτης γραμμικότητας της μεθόδου προσδιορισμού του θειοκολχικοσίδη

Πρότυπο διάλυμα θειοκολχικοσίδη/ % συγκέντρωσης εργασίας	Συγκέντρωση ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Εμβαδόν κορυφής	Μέσος όρος ($\pm\text{SD}$)/ %RSD
0,05	0,15	3496	35,03 ($\pm 0,14$) x 10² 0,39
		3519	
		3495	
0,1	0,30	8453	84,21 ($\pm 0,51$) x 10² 0,60
		8448	
		8363	
0,2	0,60	16691	165,2 ($\pm 1,5$) x 10² 0,93
		16439	
		16414	
0,5	1,50	41957	417,9 ($\pm 1,4$) x 10² 0,34
		41702	
		41723	
1,0	3,00	85178	852,2 ($\pm 1,3$) x 10² 0,15
		85113	
		85355	

Η ευθεία παλινδρόμησης που προκύπτει είναι η εξής:

$$y = 28,61 (\pm 0,12) \times 10^3 x - 0,76 (\pm 0,19) \times 10^3$$

Μονάδες τομής στον άξονα των y: Μονάδες εμβαδού

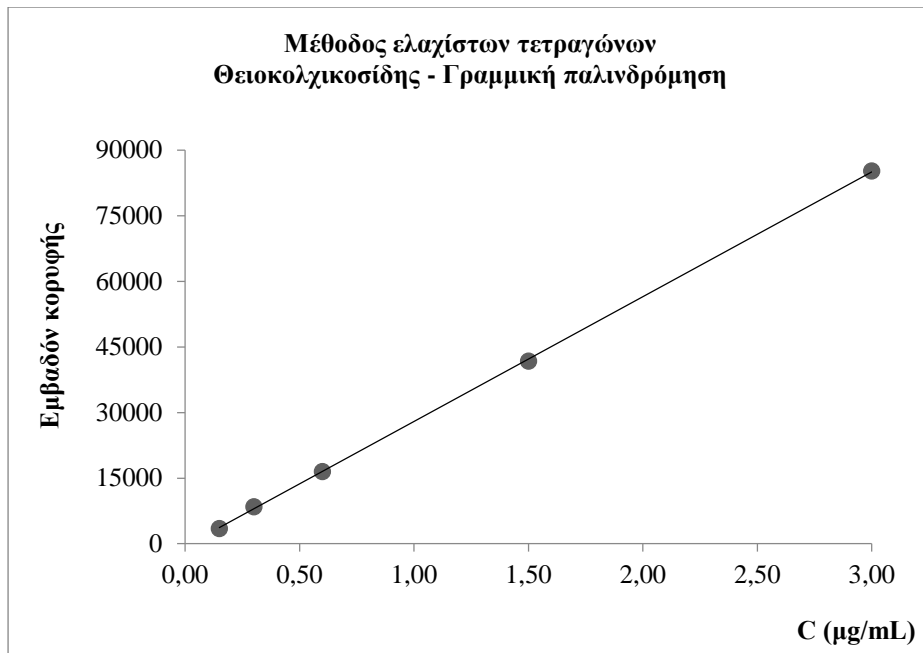
Μονάδες κλίσης: Μονάδες εμβαδού $\cdot \text{mL} \cdot \mu\text{g}^{-1}$

Συντελεστής συσχέτισεως (r): 0,9999

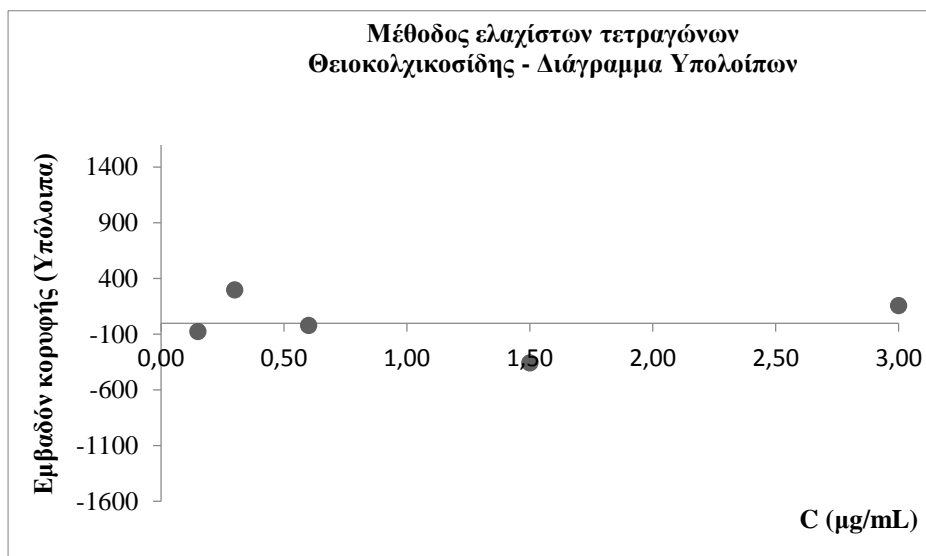
Ελέγχεται εάν η ευθεία παλινδρόμησης διέρχεται από το μηδέν:

$$t_{\text{πειρ}} = \frac{|\text{τομή}|}{S_a} = \frac{|-0,76|}{0,19} = 4,0 > 3,18 = t_{\text{θεωρ}}, \text{ για } \nu = 3 \text{ βαθμούς ελευθερίας και σε στάθμη}$$

εμπιστοσύνης 95%. Οριακά η ευθεία δε διέρχεται από το μηδέν των αξόνων.



Εικόνα 8.9 Γραφική παράσταση της καμπύλης βαθμονόμησης του θειοκολχικοσίδη



Εικόνα 8.10 Διάγραμμα υπολοίπων του θειοκολχικοσίδη

Η μέθοδος πληροί τα απαιτούμενα κριτήρια και χαρακτηρίζεται από γραμμικότητα.

8.5.3 Παράγοντας Απόκρισης (Response Factor)

Ο παράγοντας απόκρισης (RF) υπολογίζεται από την εξής σχέση:

$$RF = \frac{S_{\text{προσμ}}}{S_{\text{αναφ}}}$$

όπου $S_{\text{προσμ}}$ = η κλίση της κάθε πρόσμειξης από τη γραμμική παλινδρόμηση

και $S_{\text{αναφ}}$ = η κλίση του θειοκολχικοσίδη από τη γραμμική παλινδρόμηση

Επομένως ισχύει:

$$\text{Για την κολχικίνη: } RF = \frac{S_{\text{colchicine}}}{S_{\text{thiocolchicoside}}} = \frac{33797}{28605} = 1,18$$

$$\text{Για τον N-φορμυλο-θειοκολχικισίδη: } RF = \frac{S_{\text{N-formyl-thiocol.}}}{S_{\text{thiocolchicoside}}} = \frac{24008}{28605} = 0,84$$

$$\text{Για τον κολχικισίδη: } RF = \frac{S_{\text{colchicoside}}}{S_{\text{thiocolchicoside}}} = \frac{14954}{28605} = 0,52$$

8.5.4 Πιστότητα

Πιστότητα Συστήματος

Η πιστότητα εκφράζεται από την % σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) του εμβαδού των κορυφών των προσμίξεων του θειοκολχικισίδη μεταξύ των τριών μετρήσεων για κάθε πρότυπο διάλυμα από τον έλεγχο της γραμμικότητας. Το %RSD θα πρέπει να είναι $\leq 2,0$.

Από τους πίνακες της γραμμικότητας προκύπτει ότι $\%RSD \leq 1,3$, οπότε βρίσκεται εντός του αποδεκτού ορίου.

Επαναληψιμότητα

Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας παρασκευάστηκαν έξι ανεξάρτητα εμβολιασμένα διαλύματα B, με διαδικασία η οποία περιγράφεται στο εδάφιο 8.5.5 και ένα διάλυμα αναφοράς 0,2%. Στη συνέχεια, τα εμβολιασμένα διαλύματα B αναλύθηκαν ξεχωριστά και υπολογίστηκαν η % ανάκτηση και η % σχετική τυπική απόκλιση.

Η % ανάκτηση υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% \text{ ανάκτηση} = \frac{\% \text{περιεκτικότητα πρόσμικξης}}{\% \text{επίπεδο εμβολιασμού}} \times 100$$

Για να θεωρηθεί επαναλήψιμη η μέθοδος, θα πρέπει για κάθε εμβολιασμένο διάλυμα η % ανάκτηση να βρίσκεται μεταξύ 95,0-105,0% και η %RSD $\leq 5,0$.

Ενδιάμεση πιστότητα (Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα)

Έγινε όπως περιγράφεται στο εδάφιο 6.7.3.

Θα πρέπει να ισχύει $\%RSD_r \leq 5,0$ και $\%RSD_R \leq 5,0$ και επίσης η % ανάκτηση για κάθε μέτρηση να βρίσκεται μεταξύ 95,0-105,0%.

Πίνακας 8.5 Αποτελέσματα της μελέτης πιστότητας της μεθόδου προσδιορισμού της κολχικίνης

	Εμβαδόν κορυφής θειοκολχικοσίδη στο δ/μα αναφοράς 0,2%	Εμβαδόν κολχικίνης στο εμβολ. διάλυμα	% Ενίσχυση	% Ανάκτηση	Μέσος όρος (±SD)/%RSD
Αναλυτής 1 Ημέρα 1 Όργανο 1		46864		99,12	
	16079	46439		98,22	
	15934	46986	0,50	99,38	98,88 (±0,61)
	Μέσος όρος 16007	46371		98,08	0,62
		46776		98,93	
		47078		99,57	
Αναλυτής 2 Όργανο 2	16019	46927		98,89	99,26 (±0,37)
	16113	47103	0,50	99,26	0,38
	Μέσος όρος 16066	47281		99,63	
Ημέρα 2	16340	47629		98,76	98,80 (±0,12)
	16316	47604	0,50	98,70	0,12
	Μέσος όρος 16328	47714		98,93	

Επαναληψιμότητα %RSD = 0,62

%RSD_f = 0,50

Ενδιάμεση πιστότητα %RSD_R = 0,55

Με βάση τα παραπάνω αποδεικνύεται ότι πληρούνται τα κριτήρια αποδοχής για την πιστότητα της μεθόδου προσδιορισμού της κολχικίνης.

Πίνακας 8.6 Αποτελέσματα της μελέτης πιστότητας της μεθόδου προσδιορισμού του κολχικοσίδη

	Εμβαδόν κορυφής θειοκολχικοσίδη στο δ/μα αναφοράς 0,2%	Εμβαδόν κολχικοσίδη στο εμβολ. διάλυμα	% Ενίσχυση	% Ανάκτηση	Μέσος όρος (±SD)/%RSD	
Αναλυτής 1		20850		99,67		
		16079	20551		98,24	
	Ημέρα 1	15934	20899	0,50	99,90	
	Όργανο 1		20505		98,02	98,93 (±0,75)
		Μέσος όρος	16007	20682		0,76
		20686		98,87		
		20686		98,88		
Αναλυτής 2		16019		98,52	98,79 (±0,81)	
		16113	20934	0,50		
	Όργανο 2		20606			0,82
	Μέσος όρος	16066	20606		98,14	
Ημέρα 2		16340	21281		99,73	
		16316	20921	0,50	98,04	
			21332		99,96	
	Μέσος όρος	16328			99,24 (±1,0)	
					1,1	

Επαναληψιμότητα %RSD = 0,76

%RSD_f = 0,85

Ενδιάμεση πιστότητα %RSD_R = 0,87

Με βάση τα παραπάνω αποδεικνύεται ότι πληρούνται τα κριτήρια αποδοχής για την πιστότητα της μεθόδου προσδιορισμού του κολχικοσίδη.

8.5.5 Ακρίβεια

Για τον προσδιορισμό της ακρίβειας παρασκευάστηκαν τρία ανεξάρτητα εμβολιασμένα διαλύματα, τα οποία περιείχαν τόσο την προσδιοριζόμενη πρόσμιξη, όσο και τα έκδοχα (υποκεφάλαιο 5.1), σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων, τα οποία καλύπτουν το εύρος της γραμμικότητας. Για την παρασκευή αυτών των διαλυμάτων, παρασκευάστηκαν αρχικά ένα πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης θειοκολχικοσίδη συγκέντρωσης 3000 ppm σε μεθανόλη και ένα διάλυμα παρακαταθήκης-μείγμα των προσμίξεων κολχικίνης και κολχικοσίδη συγκέντρωσης 20 ppm. Επίσης, παρασκευάστηκε ένα διάλυμα αναφοράς 0,2%, όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο της μεθόδου (εδάφιο 8.2.2).

Διάλυμα παρακαταθήκης-μείγμα κολχικίνης και κολχικοσίδη (20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$): Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 10,0 mg πρότυπης ουσίας κολχικίνης και 10,0 mg πρότυπης ουσίας κολχικοσίδη και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 10,0 mL. Διαλύθηκαν σε μεθανόλη και έγινε αραιώση μέχρι τη χαραγή με τον ίδιο διαλύτη. Στη συνέχεια, 2,0 mL από το διάλυμα αυτό, μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100,0 mL και αραιώθηκαν με διαλύτη.

Τα εμβολιασμένα διαλύματα για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης, για τον προσδιορισμό της ακρίβειας των προσμίξεων του θειοκολχικοσίδη παρασκευάστηκαν ως εξής:

- **Εμβολιασμένο διάλυμα Α (επίπεδο συγκέντρωσης 0,15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, που αντιστοιχεί στο 0,05% της συγκέντρωσης εργασίας):** Ποσότητα διαλύματος placebo 5,8 mg, επακριβώς ζυγισμένη, μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 25,0 mL. Διαλύθηκε σε μεθανόλη και έγινε αραιώση μέχρι τη χαραγή με τον ίδιο διαλύτη. Ακολούθησε καλή ανάδευση. Στη συνέχεια, 5,0 mL από το διάλυμα αυτό, μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 10,0 mL και προστέθηκαν σε αυτή 1,0 mL από το πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης θειοκολχικοσίδη και 0,075 mL από το διάλυμα παρακαταθήκης-μείγμα κολχικίνης και κολχικοσίδη. Αραιώθηκαν με διαλύτη μέχρι τη χαραγή και έγινε καλή ανάδευση.
- **Εμβολιασμένο διάλυμα Β (επίπεδο συγκέντρωσης 1,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, που αντιστοιχεί στο 0,5% της συγκέντρωσης εργασίας):** όπως το διάλυμα Α, χρησιμοποιώντας 0,750 mL από το διάλυμα παρακαταθήκης-μείγμα κολχικίνης και κολχικοσίδη.
- **Εμβολιασμένο διάλυμα Γ (επίπεδο συγκέντρωσης 3,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, που αντιστοιχεί στο 1,0% της συγκέντρωσης εργασίας):** όπως το διάλυμα Α, χρησιμοποιώντας 1,500 mL από το διάλυμα παρακαταθήκης-μείγμα κολχικίνης και κολχικοσίδη.

Υπολογίστηκε η % ανάκτηση των προσμίξεων κάθε εμβολιασμένου διαλύματος στα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων, καθώς και η %RSD των ανακτήσεων σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης. Η % ανάκτηση υπολογίστηκε ως εξής:

$$\% \text{ Ανάκτηση} = \frac{\% \text{ περιεκτικότητα πρόσμιξης}}{\% \text{ ενίσχυση}} \times 100$$

Για να κριθεί η μέθοδος ως ακριβής, θα πρέπει οι τιμές της % ανάκτησης να βρίσκονται μεταξύ 95-105% και η %RSD των ανακτήσεων σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης να είναι $\leq 5,0$.

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων από τη μελέτη της ακρίβειας της μεθόδου προσδιορισμού των προσμίξεων του θειοκολχικοσίδη.

Πίνακας 8.7 Αποτελέσματα της μελέτης ακρίβειας της μεθόδου προσδιορισμού της κολχικίνης

Εμβολ. δ/μα	Εμβαδόν θειοκολχικοσίδη στο διάλυμα αναφοράς 0,2%	Εμβαδόν κορυφής κολχικίνης στο εμβολ. διάλυμα	% Ενίσχυση	% Ανάκτηση	Μέσος όρος (\pm SD)/ RSD, %
Α		4544	0,05	99,55	98,76 (\pm0,69) 0,70
		4494		98,45	
		4486		98,28	
Β	15431	45258	0,50	99,15	99,59 (\pm0,12) 0,12
	15374	45159		98,93	
	15555	45166		98,95	
Γ	Μέσος όρος	15453	1,00	100,61	99,59 (\pm0,99) 0,99
		91844		98,63	
		90041		99,52	
		90857			

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι η % ανάκτηση βρίσκεται μεταξύ 98,28-100,61% και η %RSD είναι $\leq 0,99$. Επομένως, η μέθοδος είναι ακριβής για τον ποσοτικό προσδιορισμό της κολχικίνης.

Πίνακας 8.8 Αποτελέσματα της μελέτης ακρίβειας της μεθόδου προσδιορισμού του κολχικοσίδη

Εμβολ. δ/μα	Εμβαδόν θειοκολχικοσίδη στο διάλυμα αναφοράς 0,2%	Εμβαδόν κορυφής κολχικοσίδη στο εμβολ.δ/μα	% Ενίσχυση	% Ανάκτηση	Μέσος όρος (±SD)/RSD, %
Α		2033	0,05	100,66	99,85 (±1,00) 1,00
		1994		98,73	
		2023		100,17	
Β	15431	19849	0,50	98,28	98,48 (±0,37) 0,37
	15374	19975		98,90	
	15555	19844		98,26	
Γ	Μέσος όρος 15453	40113	1,00	99,31	99,11 (±0,33) 0,34
		39879		98,73	
		40112		99,30	

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι η % ανάκτηση βρίσκεται μεταξύ 98,26-100,66% και η %RSD είναι $\leq 1,0$. Επομένως, η μέθοδος είναι ακριβής για τον ποσοτικό προσδιορισμό του κολχικοσίδη.

8.5.6 Εύρος

Από τις μελέτες γραμμικότητας και ακρίβειας προκύπτει ότι το εύρος συγκεντρώσεων είναι $0,15 - 3,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, το οποίο αντιστοιχεί στο 0,05 – 1,0% της συγκέντρωσης εργασίας.

8.5.7 Ανθεκτικότητα

I. Για τη μελέτη της ανθεκτικότητας παρασκευάστηκε ένα εμβολιασμένο διάλυμα Β, όπως περιγράφεται στο εδάφιο 8.5.5. Επίσης, παρασκευάστηκε ένα διάλυμα αναφοράς 0,2% σύμφωνα με το πρωτόκολλο της μεθόδου (εδάφιο 8.2.2). Στη συνέχεια, έγινε η εκτίμηση της επίδρασης των παρακάτω παραγόντων στην ανθεκτικότητα της μεθόδου:

- Ταχύτητα ροής της κινητής φάσης
- Θερμοκρασία της στήλης
- Αναλογία σύστασης κινητής φάσης

Συγκεκριμένα, έγιναν οι ακόλουθες μεταβολές:

Παράγοντας Α: Ταχύτητα ροής κινητής φάσης +επίπεδο: 1,0 -επίπεδο: 1,1
(mL/min)

Παράγοντας Β: Θερμοκρασία της στήλης +επίπεδο: 30 °C -επίπεδο: 28 °C

Παράγοντας Γ: Αρχική αναλογία κινητής
φάσης

+επίπεδο: 95/5 -επίπεδο: 93/7

Για να κριθεί η μέθοδος ως ανθεκτική, θα πρέπει η τιμή της % ανάκτησης έναντι της αρχικής περιεκτικότητας να βρίσκεται μεταξύ 95-105% και η %RSD των ανακτήσεων να είναι $\leq 5,0$.

Πίνακας 8.9 Πειραματικός σχεδιασμός της μελέτης ανθεκτικότητας

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

Πίνακας 8.10 Αποτελέσματα της μελέτης ανθεκτικότητας της μεθόδου προσδιορισμού της κολχικίνης

	Εμβαδόν κορυφής θειοκολχικισίδης στο διάλυμα αναφοράς 0,2%	Εμβαδόν κορυφής κολχικίνης στο εμβολ. διάλυμα	% Ενίσχυση	% Ανάκτηση	Μέσος όρος (\pm SD)/RSD, %
Y1	16019	46927	0,50	98,89	99,26 (\pm0,37) 0,38
	16113	47103		99,26	
	Μέσος όρος 16066	47281		99,63	
Y2	15082	44888	0,50	99,85	99,94 (\pm0,10) 0,10
	15358	44975		100,04	
	Μέσος όρος 15220	44925		99,93	
Y3	14958	43022	0,50	98,02	98,71 (\pm0,62) 0,63
	14761	43553		99,23	
	Μέσος όρος 14860	43395		98,87	
Y4	14953	44188	0,50	100,49	100,67 (\pm0,29) 0,28
	14821	44202		100,52	
	Μέσος όρος 14887	44412		101,00	

Πίνακας 8.11 Αποτελέσματα της μελέτης ανθεκτικότητας της μεθόδου προσδιορισμού του κολχικοσίδη

	Εμβαδόν κορυφής θειοκολχικοσίδη στο διάλυμα αναφοράς 0,2%	Εμβαδόν κορυφής κολχικοσίδη στο εμβολ. διάλυμα	% Ενίσχυση	% Ανάκτηση	Μέσος όρος (±SD)/RSD, %
Y1	16019	20687	0,50	98,52	98,79 (±0,81) 0,82
	16113	20934		99,70	
	Μέσος όρος 16066	20606		98,14	
Y2	15082	19637	0,50	98,72	98,74 (±0,68) 0,69
	15358	19780		99,44	
	Μέσος όρος 15220	19508		98,07	
Y3	14958	19467	0,50	100,24	99,71 (±0,94) 0,94
	14761	19153		98,62	
	Μέσος όρος 14860	19471		100,26	
Y4	14953	19246	0,50	98,92	98,87 (±0,19) 0,19
	14821	19196		98,66	
	Μέσος όρος 14887	19267		99,03	

Από τους παραπάνω πίνακες φαίνεται ότι και οι τρεις μεταβολές που έγιναν, δεν επηρεάζουν σημαντικά τη μέθοδο.

II. Σταθερότητα διαλυμάτων

Για τον έλεγχο της σταθερότητας, παρασκευάστηκαν εμβολιασμένα διαλύματα Β, τα οποία αναλύθηκαν αμέσως μετά την παρασκευή τους και στη συνέχεια μετά από 24 ώρες αποθήκευσής τους στους 25 °C. Επίσης παρασκευάστηκε ένα διάλυμα αναφοράς 0,2%.

Η % ανάκτηση υπολογίζεται από τη σχέση:

$$\% \text{ανάκτηση} = \frac{\% \text{περιεκτικότητα μετά από 24 ώρες}}{\% \text{περιεκτικότητα φρέσκου δ/ματος}} \times 100$$

Για να αποδειχτεί η σταθερότητα των διαλυμάτων, θα πρέπει οι τιμές της % ανάκτησης έναντι της αρχικής περιεκτικότητας στο φρέσκο διάλυμα να βρίσκονται μεταξύ 98-102% και η %RSD των ανακτήσεων να είναι $\leq 2,0$.

Πίνακας 8.12 Αποτελέσματα της μελέτης σταθερότητας της μεθόδου προσδιορισμού της κολχικίνης

	Εμβαδόν κορυφής θειοκολχικοσίδη στο διάλυμα αναφοράς 0,2%	Εμβαδόν κορυφής κολχικίνης στο εμβολ. διάλυμα	% Ενίσχυση	% Ανάκτηση
Φρέσκο διάλυμα	16019	46927	0,50	98,89
	16113	47103		99,26
	Μέσος όρος 16066	47281		99,63
Μετά από 24 ώρες	16134	47013	0,50	98,72
	16110	47124		98,96
	Μέσος όρος 16122	47486		99,72

	% Ανάκτηση έναντι φρέσκου διαλύματος
1	99,84
2	99,70
3	100,08
Μέσος όρος (±SD)/ RSD, %	99,87 (±0,20) 0,20

Επομένως, τα διαλύματα παραμένουν σταθερά για τουλάχιστον 24 ώρες.

Πίνακας 8.13 Αποτελέσματα της μελέτης σταθερότητας της μεθόδου προσδιορισμού του κολχικοσίδη

	Εμβαδόν κορυφής θειοκολχικοσίδη στο διάλυμα αναφοράς 0,2%	Εμβαδόν κορυφής κολχικοσίδη στο εμβολ. διάλυμα	% Ενίσχυση	% Ανάκτηση
Φρέσκο διάλυμα	16019	20687	0,50	98,52
	16113	20511		97,68
	Μέσος όρος 16066	20606		98,14
Μετά από 24 ώρες	16134	20866	0,50	99,03
	16110	20773		98,59
	Μέσος όρος 16122	20605		97,79

	% Ανάκτηση έναντι φρέσκου διαλύματος
1	100,51
2	100,93
3	99,65
Μέσος όρος(±SD)/ RSD, %	100,36 (±0,65) 0,65

Επομένως, τα διαλύματα παραμένουν σταθερά για τουλάχιστον 24 ώρες.

Έπειτα από τις παραπάνω μελέτες, η μέθοδος κρίνεται ως ανθεκτική.

8.5.8 Όριο ανίχνευσης (LOD)/ Όριο ποσοτικοποίησης (LOQ)

Το όριο ανίχνευσης υπολογίστηκε από τον τύπο: $LOD = 3,3 \times \frac{\sigma}{S}$, όπου S η κλίση της καμπύλης αναφοράς και σ η τυπική απόκλιση του πιο αραιού προτύπου διαλύματος από τη μελέτη της γραμμικότητας.

Για την κολχικίνη:

$LOD = 3,3 \times \frac{\sigma}{S} = 3,5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, το οποίο αντιστοιχεί σε 0,0012% περιεκτικότητα πρόσμιξης

Για τον N-φορμυλο-θειοκολχικοσίδη:

$LOD = 3,3 \times \frac{\sigma}{S} = 3,4 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, το οποίο αντιστοιχεί σε 0,0011% περιεκτικότητα πρόσμιξης

Για τον κολχικοσίδη:

$LOD = 3,3 \times \frac{\sigma}{S} = 1,9 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, το οποίο αντιστοιχεί σε 0,0006% περιεκτικότητα πρόσμιξης

Το όριο ποσοτικοποίησης υπολογίστηκε από τον τύπο $LOQ = 10 \times \frac{\sigma}{S}$.

Για την κολχικίνη:

$LOQ = 10 \times \frac{\sigma}{S} = 10,6 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, το οποίο αντιστοιχεί σε 0,0035% περιεκτικότητα
πρόσμιξης

Για τον N-φορμυλο-θειοκολχικινικό οξύ:

$LOQ = 10 \times \frac{\sigma}{S} = 10,3 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, το οποίο αντιστοιχεί σε 0,0034% περιεκτικότητα
πρόσμιξης

Για τον κολχικινικό οξύ:

$LOQ = 10 \times \frac{\sigma}{S} = 5,7 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, το οποίο αντιστοιχεί σε 0,0019% περιεκτικότητα
πρόσμιξης

8.5.9 Συμπέρασμα

Από την αξιολόγηση των παραπάνω χαρακτηριστικών ποιότητας της μεθόδου, κρίθηκε ότι η μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού των προσμίξεων του θειοκολχικινικού οξέος σε δερματικό διάλυμα ικανοποιεί όλες τις απαιτήσεις και επομένως, είναι κατάλληλη για τον σκοπό για τον οποίο αναπτύχθηκε.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

API	Active Pharmaceutical Ingredient
CHMP	Committee on Human Medicinal Products
CF	Correlation Factor
COX-1	Cyclooxygenase-1
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRS	Certified Reference Substance
DMSO	Dimethylsulfoxide
EMA	European Medicines Agency
GC	Gas Chromatography
GMP	Good Manufacturing Practice
ICH	International Council for Harmonisation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantitation
MS	Mass Spectrometry
PDA	Photodiode Array
RV	Reversed-Phase
RSD	Relative Standard Deviation
RRt	Relative Retention time
RT	Retention Time
SD	Standard Deviation
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UV	Ultra Violet
Ε.Φ.	Ευρωπαϊκή Φαρμακοποία
ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
ΜΣΑΦ	Μη Στεροειδή Αντιφλεγμονώδη Φάρμακα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] R. A. Harvey and P. C. Champe, *Φαρμακολογία 3η Έκδοση*, Αθήνα, Παρισιάνου Α.Ε., 2007, pp. 545-554.
- [2] J. R. Vane, "Introduction: Mechanism of action of NSAIDS," *British Journal of Rheumatology*, vol. 35, no. 1, pp. 1-3, 1996.
- [3] H. P. Rang, M. M. Dale, J. M. Ritter and P. K. Moore, *Φαρμακολογία 5η Έκδοση*, Αθήνα, Παρισιάνου Α.Ε., 2007, pp. 260-266.
- [4] O. Sangha, "Epidemiology of rheumatic diseases," *Rheumatology*, vol. 39, no. 2, pp. 3-12, 2000.
- [5] G. Man and G. Mologhianu, "Osteoarthritis pathogenesis-a complex process that involves the entire joint," *Journal of Medicine and Life*, vol. 7, no. 1, pp. 37-41, 2014.
- [6] S. H. Hassanali and G. O. Oyoo, "Osteoarthritis: A look at pathophysiology and approach to new treatments: A review," *East African Orthopaedic Journal*, vol. 5, pp. 51-57, 2011.
- [7] Α. Ανδριανάκος, "Ελληνικό Ίδρυμα Ρευματολογίας", http://www.elire.gr/info_det.php?di=19. (Ημερομηνία τελευταίας πρόσβασης 4/01/2017).
- [8] R. Altman, B. Bosch, K. Brune, P. Patrignani and C. Young, "Advances in NSAID Development: Evolution of diclofenac products using pharmaceutical technology," *Drugs*, vol. 75, no. 8, pp. 859-877, 2015.
- [9] A. R. Sallmann, "The history of diclofenac," *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, vol. 15, no. 2, pp. 57-60, 1985.
- [10] European Pharmacopoeia 8th Edition (8.2), 2014.
- [11] C. F. Goh and M. E. Lane, "Formulation of diclofenac for dermal delivery," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 473, no. 1-2, pp. 607-616, 2014.
- [12] http://www.paladin-labs.com/our_products/PM_Pennsaid_EN.pdf?ver=5.0. (Ημερομηνία τελευταίας πρόσβασης 15/01/2017).
- [13] S. Haroutiunian, D. A. Drennan and A. G. Lipman, "Topical NSAID therapy for musculoskeletal pain," *Pain Medicine*, vol. 11, no. 4, pp. 535-549, 2010.
- [14] F. Rannou, J.-P. Pelletier and J. Martel-Pelletier, "Evidence and safety of topical NSAIDs in the management of osteoarthritis: Evidence from real-life setting trials and surveys," *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, vol. 45, no. 4, pp. 518-521, 2016.

- [15] B. Nair and R. Taylor-Gjevre, "A review of topical diclofenac use in musculoskeletal disease," *Pharmaceuticals*, vol. 3, no. 6, pp. 1892-1908, 2010.
- [16] B. Yilmaz and U. Ciltas, "Determination of diclofenac in pharmaceutical preparations by voltammetry and gas chromatography methods," *Journal of Pharmaceutical Analysis*, vol. 5, no. 3, pp. 153-160, 2015.
- [17] B. K. Chethana, S. Basavanna and Y. Arthoba Naik, "Voltammetric determination of diclofenac sodium using tyrosine-modified carbon paste electrode," *Industrial and Engineering Chemistry Research*, vol. 51, no. 31, pp. 10287-10295, 2012.
- [18] E. Kaale, B. C. Nyamweru, V. Manyanga, M. Chambuso and T. Layloff, "The development and validation of a thin layer chromatography densitometry method for the analysis of diclofenac sodium tablets," *International Journal of Chemical and Analytical Science*, vol. 4, no. 2, pp. 73-79, 2013.
- [19] B. Yilmaz, "GC-MS determination of diclofenac in human plasma," *Chromatographia*, vol. 71, no. 5, pp. 549-551, 2010.
- [20] I. Shah, J. Barker, D. P. Naughton, S. J. Barton and S. S. Ashraf, "Determination of diclofenac concentrations in human plasma using a sensitive gas chromatography mass spectrometry method," *Chemistry Central Journal*, vol. 10:52, 2016.
- [21] M. Pschenitzka, E. S. Gavrilova, S. A. Tarasov, D. Knopp, R. Niessner and O. I. Epstein, "Application of an heterogeneous immunoassay for the quality control testing of release-active forms of diclofenac," *International Immunopharmacology*, vol. 21, no. 1, pp. 225-230, 2014.
- [22] Z. Malá, P. Gebauer and P. Boček, "Capillary isotachopheresis with ESI-MS detection: Methodology for highly sensitive analysis of ibuprofen and diclofenac in waters," *Analytica Chimica Acta*, vol. 907, pp. 1-6, 2016.
- [23] B. Lachmann, M. Kratzel and C. R. Noe, "Rapid determination of diclofenac in pharmaceutical formulations by capillary zone electrophoresis," *Scientia Pharmaceutica*, vol. 80, no. 2, pp. 311-316, 2012.
- [24] J. Lenik, "A new potentiometric electrode incorporating functionalized β -cyclodextrins for diclofenac determination," *Materials Science and Engineering C*, vol. 45, pp. 109-116, 2014.
- [25] M. C. Oliveira, E. H. Bindewald, L. H. Marcolino Jr. and M. F. Bergamini, "Potentiometric determination of diclofenac using an ion-selective electrode prepared from polypyrrole films," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 732, pp. 11-16, 2014.

- [26] A. A. Matin, M. A. Farajzadeh and A. Jouyban, "A simple spectrophotometric method for determination of sodium diclofenac in pharmaceutical formulations," *Il Farmaco*, vol. 60, no. 10, pp. 855-858, 2005.
- [27] R. R. Joshi and K. R. Gupta, "Simultaneous UV-spectrophotometric determination of thiocolchicoside and diclofenac in pharmaceutical formulation," *Der Pharmacia Sinica*, vol. 1, no. 2, pp. 44-51, 2010.
- [28] M. R. Sengar, S. V. Gandhi, U. P. Patil and V. S. Rajmane, "Simultaneous determination of diclofenac sodium and thiocolchicoside in fixed dose combination by spectrophotometry," *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, vol. 3, no. 2, pp. 89-91, 2010.
- [29] S. Mazurek and R. Szostak, "Quantitative determination of diclofenac sodium in solid dosage forms by FT-Raman spectroscopy," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 48, no. 3, pp. 814-821, 2008.
- [30] D. B. Patel, A. B. Chaudhary and V. P. Jodhani, "RP-HPLC method development and validation for estimation of diclofenac sodium and methyl salicylate in nano gel," *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 5, no. 6, pp. 1199-1211, 2016.
- [31] N. K. Sahoo, M. Sahu, P. S. Rao and G. Ghosh, "Solid phase extraction and quantification of diclofenac sodium in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry," *Journal of Analytical Chemistry*, vol. 70, no. 4, pp. 424-430, 2015.
- [32] N. Sivakumar, A. Chenthilnathan and A. Vairamani, "Development and validation of RP-HPLC method for the quantitative determination of diclofenac sodium in pharmaceutical dosage form," *International Journal of Pharmaceutical Research and Biomedical Analysis*, vol. 3, no. 2, pp. 20-30, 2014.
- [33] F. A. Mohammed, S. S. Alsokari, M. E. Wagih, N. M. Abdel-Hamid and S. M. Saad-Eldin, "New HPLC method for determination of diclofenac sodium in human plasma and its application to pharmacokinetic studies after oral administration of Voltaren® 50 mg tablets to twelve healthy volunteers," *International Journal of Innovations in Pharmaceutical Sciences*, vol. 3, no. 3, pp. 51-62, 2014.
- [34] E. M. Elzayat, M. F. Ibrahim, A. A. Abdel-Rahman, S. M. Ahmed, F. K. Alanazi and W. A. Habib, "A validated stability-indicating UPLC method for determination of diclofenac sodium in its pure form and matrix formulations," *Arabian Journal of Chemistry*, 2014.
- [35] R. A. Shaalan and T. S. Belal, "Validated stability-indicating HPLC-DAD method for the simultaneous determination of diclofenac sodium and diflunisal in their combined dosage form," *Scientia Pharmaceutica*, vol. 81, no. 3, pp. 713-731, 2013.

- [36] T. Korodi, K. Bukowski and B. Lachmann, "Evaluation of a short stability-indicating HPLC method for diclofenac sodium gels," *Pharmazie*, vol. 67, no. 12, pp. 980-983, 2012.
- [37] R. K. Patel, H. R. Patel, V. A. Patel, D. L. Ganure and D. J. Patel, "Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous determination of omeprazole and diclofenac sodium in capsule dosage form," *Journal of Pharmacy Research*, vol. 5, no. 3, pp. 1640-1642, 2012.
- [38] P. L. Kole, J. Millership and J. C. McElnay, "Determination of diclofenac from paediatric urine samples by stir bar sorptive extraction (SBSE)-HPLC-UV technique," *Talanta*, vol. 85, no. 4, pp. 1948-1958, 2011.
- [39] K. Jana, L. Adhikari, S. K. Moitra and A. Behera, "Analysis of multicomponent drug formulations (diclofenac and paracetamol)," *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, vol. 4, no. 2, pp. 41-43, 2011.
- [40] D. Muntean, L. Vlase, R. Cuciureanu and M. Cuciureanu, "LC-MS/MS method for the quantification of diclofenac from human plasma and its application to pharmacokinetic studies," *Revue Roumaine de Chimie*, vol. 56, no. 1, pp. 19-24, 2011.
- [41] A. A. Heda, D. D. Gadade, J. M. Kathiriya and P. K. Puranik, "HPLC method development and validation for simultaneous analysis of diclofenac sodium and rabeprazole sodium," *E-Journal of Chemistry*, vol. 7, no. S1, pp. S386-390, 2010.
- [42] R. Kasperek, "Determination of diclofenac sodium and papaverine hydrochloride in tablets by HPLC method," *Acta-Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, vol. 65, no. 4, pp. 403-408, 2008.
- [43] J. Emami, N. Ghassami and R. Talari, "A rapid and sensitive modified HPLC method for determination of diclofenac in human plasma and its application in pharmacokinetic studies," *DARU*, vol. 15, no. 3, pp. 132-138, 2007.
- [44] B. G. Katzung, S. B. Masters and A. J. Trevor, "Skeletal muscle relaxants," in *Basic and Clinical Pharmacology*, United States, McGraw-Hill, 2012, pp. 465-482.
- [45] A. Kamath, "Thiocolchicoside: A review," *Double Helix Research*, vol. 4, no. 2, pp. 39-45, 2013.
- [46] A. R. Umalkar, S. R. Bavaskar and P. N. Yenale, "Thiocolchicoside as muscle relaxant: A review," *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, vol. 1, no. 3, pp. 364-371, 2011.
- [47] "Pubchem",
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Coltramyl#section=Top>.
 (Ημερομηνία τελευταίας πρόσβασης 27/01/2017).

- [48] M. Carta, L. Murru, P. Botta, G. Talani, G. Sechi, P. De Riu, E. Sanna and G. Biggio, "The muscle relaxant thiocolchicoside is an antagonist of GABAA receptor function in the central nervous system," *Neuropharmacology*, vol. 51, no. 4, pp. 805-815, 2006.
- [49] http://www.ec.europa.eu/health/documents/community-register/2014/20140117127656/anx_127656_el.pdf.
- [50] N. A. El-Ragehy, M. M. Ellaithy and M. A. El-Ghobashy, "Determination of thiocolchicoside in its binary mixtures (thiocolchicoside-glafenine and thiocolchicoside-floctafenine) by TLC-densitometry," *Il Farmaco*, vol. 58, no. 6, pp. 463-468, 2003.
- [51] M. T. Harde, S. B. Jadhav, D. L. Dharam and P. D. Chaudhari, "Development and validation of UV-visible spectrophotometric methods for simultaneous estimation of thiocolchicoside and dexketoprofen in bulk and tablet dosage form," *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, vol. 4, no. 2, pp. 160-163, 2012.
- [52] S. W. Tekade, S. S. Havele and S. R. Dhaneshwar, "Validated HPTLC method for simultaneous estimation of etodolac and thiocolchicoside in bulk drug and formulation," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, vol. 23, no. 7, pp. 1-5, 2012.
- [53] S. Aprile, R. Canavesi, M. Bianchi, G. Grosa and E. Del Grosso, "Determination and validation of a stability-indicating HPLC-UV method for the determination of thiocolchicoside and its degradation products," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 132, pp. 66-71, 2017.
- [54] S. D. Jadhav, S. R. Butle, S. D. Patil and P. K. Jagtap, "Validated stability indicating RP-HPLC method for simultaneous determination and in vitro dissolution studies of thiocolchicoside and diclofenac potassium from tablet dosage form," *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 8, no. 1, pp. 118-128, 2015.
- [55] P. A. Karbhari, S. J. Joshi and S. I. Bhoir, "RP-LC gradient elution method for simultaneous determination of thiocolchicoside, aceclofenac and related impurities in tablet formulation," *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, vol. 6, no. 4, pp. 246-252, 2014.
- [56] M. Sabitha, M. Mahaboobsubhani, M. Sarbudeen and C. Balasekhara Reddy, "Analytical method development and validation for the simultaneous estimation of diclofenac sodium and thiocolchicoside in tablet dosage form by using RP-HPLC," *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences*, vol. 4, no. 2, pp. 7-13, 2014.
- [57] P. N. Patel, G. Samanthula, V. Shrigod, S. C. Modh and J. R. Chaudhari, "RP-HPLC method for determination of several NSAIDs and their combination drugs," *Chromatography Research International*, vol. 2013, 2013.

- [58] S. Kumar, A. Joshi, R. S. Thakur, A. K. Pathak and K. Shah, "Simultaneous estimation of etoricoxib and thiocolchicoside by RP-HPLC method in combined dosage forms," *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, vol. 68, no. 6, pp. 839-845, 2011.
- [59] Δ. Μ. Ρέκκας, *Φαρμακευτική Τεχνολογία ΙΙΙ*, Αθήνα: ΕΚΠΑ, 2002, p. 17.
- [60] Μ. Κουμπάρης, *Σημειώσεις για το μάθημα "Έλεγχος Ποιότητας Φαρμάκων"*.
- [61] ICH Harmonised Tripartite Guideline, "Impurities in new drug substances Q3A(R2)", 2006.
- [62] ICH Harmonised Tripartite Guideline, "Specifications: Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: Chemical substances Q6A", 1999.
- [63] S. Ahuja and S. Scypinski, *Handbook of modern pharmaceutical analysis*, USA: Academic Press, 2001, pp. 187-188, 333-335.
- [64] ICH Harmonised Tripartite Guideline, "Impurities in new drug products Q3B(R2)", 2006.
- [65] ICH Harmonised Tripartite Guideline, "Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2)", 2003.
- [66] Μ. Κουμπάρης, *Σημειώσεις για το μάθημα "Στατιστική-Χημειομετρία"*.
- [67] ICH Harmonised Tripartite Guideline, "Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1)", 1994.
- [68] S. Levin, "High performance liquid chromatography (HPLC) in the pharmaceutical analysis," Medtechnica, 2010.