



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**



**ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

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

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΗPLC ΓΙΑ ΤΟΝ
ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΑΔΡΕΝΑΛΙΝΗΣ –
ΛΙΔΟΚΑΪΝΗΣ ΣΕ ΕΝΕΣΙΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ
ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ**

**ΔΡΑΚΟΣ Η. ΓΕΩΡΓΙΟΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ 2020

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΗPLC ΓΙΑ ΤΟΝ
ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΑΔΡΕΝΑΛΙΝΗΣ –
ΛΙΔΟΚΑΪΝΗΣ ΣΕ ΕΝΕΣΙΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ
ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ

ΔΡΑΚΟΣ Η. ΓΕΩΡΓΙΟΣ

A.M.: 141309

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΜΙΧΑΗΛ ΚΟΥΠΠΑΡΗΣ, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Οικονόμου Αναστάσιος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Θωμαΐδης Νικόλαος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Κόκκινος Χρήστος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ : 04/02/2020

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μια μέθοδος ταυτόχρονου ποσοτικού προσδιορισμού δυο δραστικών ουσιών - αδρεναλίνης και λιδοκαΐνης – σε ενέσιμα φαρμακευτικά προϊόντα. Έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι τόσο για τον προσδιορισμό της αδρεναλίνης, όσο και της λιδοκαΐνης σε διαφορετικά φαρμακευτικά προϊόντα. Η εξέλιξη στην φαρμακευτική και η διαρκώς αυξανόμενη ανάγκη για ανάπτυξη νέων σκευασμάτων που περιέχουν συνδυασμό δραστικών ουσιών για να επιτευχθεί συνδυασμός των ιδιοτήτων τους δημιουργεί νέες αναλυτικές προκλήσεις.

Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε είναι η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με ανιχνευτή UV – Vis και ανιχνευτή PDA. Το μήκος κύματος επιλέχθηκε με βάση τη μέγιστη απορρόφηση των προσδιοριζόμενων ενώσεων, η οποία ήταν στα 205 nm.

Αρχικά παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν πρότυπα διαλύματα των δραστικών ουσιών, ενώ στη συνέχεια η μέθοδος εφαρμόστηκε και σε ενέσιμο φαρμακευτικό προϊόν. Για την επικύρωση της μεθόδου αξιολογήθηκαν η εκλεκτικότητα, η γραμμικότητα, η ευαισθησία, η πιστότητα και η σταθερότητα των διαλυμάτων.

Κύριος στόχος της εργασίας ήταν η εύρεση μιας απλής, γρήγορης, επαναλήψιμης και οικονομικής μεθόδου για τον διαχωρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των συγκεκριμένων δραστικών.

ABSTRACT

In this Master Thesis, a method of simultaneous quantification of two active substances - adrenaline and lidocaine - has been developed, in medicinal products. Many methods have been developed for the determination of adrenaline and lidocaine in different medicinal products. The evolution in pharmaceutical technology and the ever-increasing need for new formulations containing a combination of active substances to achieve the combination of their properties creates new analytical challenges.

The technique used is the high performance liquid chromatography (HPLC) with a UV-Vis detector and a PDA detector. The wavelength was selected based on the maximum absorption of the two compounds, which was at 205 nm.

Initially standard solutions of the active substances were prepared and analyzed, and then the method was applied to a medicinal product. For the validation of the method selectivity, linearity, sensitivity, precision and stability of solutions were evaluated.

The main objective of the work was to develop a simple, fast, repeatable and economical method for the separation and quantification of two active substances.

Στην οικογένειά μου,

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Έρευνας και Ανάπτυξης της φαρμακευτικής εταιρίας DEMO S.A., κατόπιν σχετικής έγκρισης της Διοίκησης της εταιρίας και της διεύθυνσης του εργαστηρίου.

Το θέμα ανατέθηκε από τον Καθηγητή Αναλυτικής Χημείας – Φαρμακευτικής Ανάλυσης του ΕΚΠΑ, κ. Μιχαήλ Κουππάρη, σε συνεργασία με τον διευθυντή της εταιρίας DEMO S.A., κ. Μιχάλη Τσιαγκάνη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους κ. Κουππάρη και κ. Τσιαγκάνη για την εμπιστοσύνη τους, τις πολύτιμες συμβουλές τους και τη σημαντική βοήθειά τους κατά την πραγματοποίηση της εργασίας μου.

Ακόμα, ευχαριστώ ιδιαίτερα την Υπεύθυνη του Τμήματος Έλεγχου Ποιότητας, κα Σπέντζα, και την Υπεύθυνη του Τμήματος Έρευνας και Ανάπτυξης, κα Ξένου για την υποστήριξή τους στο έργο μου και όλους τους εργαζόμενους στα εργαστήρια Ελέγχου Ποιότητας και Έρευνας και Ανάπτυξης της Φαρμακευτικής Εταιρίας DEMO S.A., για τη συμπαράσταση, το ενδιαφέρον τους και την άριστη συνεργασία καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας μου.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, τους γονείς μου, Ηλία και Κατερίνα, και την αδερφή μου Ανδριάνα για την διαρκή στήριξη τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

1.1	Εισαγωγή.....	1
1.2	Χημικός Έλεγχος	3
1.2.1	Ταυτοποίηση χημικής ουσίας.....	3
1.2.2	Έλεγχος καθαρότητας.....	4
1.2.3.	Έλεγχος τελικού προϊόντος.....	5
1.2.4	Έλεγχος περιεκτικότητας πρώτων υλών	6
1.3	Φαρμακευτικά Σκευάσματα.....	7
1.3.1	Ενέσιμα διαλύματα.....	7
1.3.2	Βοηθητικές ουσίες	9
1.3.3	Έλεγχος ποιότητας ενέσιμων προϊόντων	9
1.4	Ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών σκευασμάτων	11

2. ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

2.1	Αρχή της τεχνικής HPLC.....	12
2.2	Οργανολογία.....	14
2.2.1	Φιάλες διαλυτών	15
2.2.2	Συστήματα άντλησης	16
2.2.3	Συστήματα έγχυσης δείγματος.....	16
2.2.4	Αναλυτικές στήλες	16
2.2.5	Ανιχνευτές	17
2.2.6	Καταγραφείς - Επεξεργαστές δεδομένων	19
2.3	Βασικές Χρωματογραφικές Αρχές	20
2.3.1	Χρωματογραφική ταχύτητα	21

2.3.2	Σχέσεις ανάσχεσης	21
2.3.3	Μορφή χρωματογραφικής κορυφής	23
2.3.4	Διεύρυνση χρωματογραφικής ζώνης.....	24
2.3.5	Παράγοντες διεύρυνσης χρωματογραφικής ζώνης	26
2.4	Παράμετροι Αξιολόγησης Μεθόδων	28
2.4.1	Ειδικότητα (Specificity) / Εκλεκτικότητα (Selectivity)	28
2.4.2	Ακρίβεια (Accuracy)	29
2.4.3	Πιστότητα (Precision).....	29
2.4.4	Εύρος (Range).....	30
2.4.5	Όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD)	30
2.4.6	Όριο ποσοτικοποίησης (Limit of Quantitation, LOQ).....	30
2.4.7	Γραμμικότητα (Linearity)	30
2.4.8	Ανθεκτικότητα (Robustness)	31
2.4.9	Σταθερότητα διαλυμάτων (Stability of solutions)	31
2.5	Διαδικασία Επανεπικύρωσης (Revalidation)	31
2.6	Διαδικασία Επαλήθευσης (Verification)	32
2.7	Πρωτόκολλο και Έκθεση Αξιολόγησης	32
3. ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ		
3.1	Περί αδρεναλίνης.....	34
3.1.1	Γενικά στοιχεία	35
3.1.2	Ιστορική αναδρομή.....	35
3.1.3	Θεραπευτική δράση	36
3.1.4	Αδρεναλίνη τρυγική (Adrenaline Tartrate).....	38
3.2	Περί υδροχλωρικής λιδοκαΐνης	39
3.2.1	Γενικά στοιχεία	40
3.2.2	Ιστορική αναδρομή.....	41

3.2.3	Θεραπευτική δράση	41
3.3	Τοπικά αναισθητικά	45
3.4	Συνδυαστική δράση αδρεναλίνης – λιδοκαΐνης.....	45
3.5	Τοπικά Αναισθητικά και Συνδυασμοί τους με άλλα Φάρμακα	46
3.5.1	Η Μοριακή δομή των Τοπικών Αναισθητικών	46
3.5.2	Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των τοπικών αναισθητικών	47
4. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ - ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ		
4.1	Οργανολογία HPLC	48
4.1.1	Σύστημα Υγροχρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης – HPLC.....	48
4.1.2	Ανιχνευτές	49
4.1.3	Αντλία.....	49
4.1.4	Χρωματογραφικές Στήλες	50
4.1.5	Ηλεκτρονικός υπολογιστής – εκτυπωτής	50
4.2	Αναλυτικός ζυγός.....	50
4.3	Πεχάμετρο	51
4.4	Συσκευή παραγωγής νερού καθαρότητας HPLC.....	51
4.5	Σύστημα διήθησης – σύστημα απαέρωσης	51
4.6	Λουτρό υπερήχων	52
4.7	Κλίβανοι ξήρανσης	52
4.8	Διαλύτες.....	52
4.9	Αντιδραστήρια - Πρότυπα.....	52
5. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ		
5.1	Εισαγωγή.....	53
5.2	Επιλογή κινητής φάσης	53
5.3	Επιλογή στήλης	59
5.4	Επιλογή άλλων παραμέτρων.....	59

6. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

6.1	Χρωματογραφικές συνθήκες.....	60
6.2	Διαλύματα εργασίας.....	61
6.3	Υπολογισμοί	62
6.4	Κριτήρια αποδοχής.....	63
6.5	Αποτελέσματα	64
6.5.1	Καταλληλότητα συστήματος.....	64
6.5.2	Ειδικότητα	68
6.5.3	Ορθότητα	70
6.5.4	Γραμμικότητα - Εύρος.....	72
6.5.5	Ανθεκτικότητα.....	75
6.5.6	Πιστότητα.....	88
6.6	Συνθήκες αποικοδόμησης	92
	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	96
	ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	98
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	99

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 2.1. Χρωματογραφικός διαχωρισμός 3 ουσιών α, β, γ.....	13
Σχήμα 2.2. Λήψη χρωματογραφήματος των ουσιών α, β, γ.....	13
Σχήμα 2.3. Βασικά τμήματα χρωματογράφου HPLC.....	14
Σχήμα 2.4. Χρωματογράφημα δείγματος 2 συστατικών.....	20
Σχήμα 2.5. Γραφική παράσταση κατανομής κατά Gauss.....	23
Σχήμα 2.6α. Μορφές χρωματογραφικών κορυφών.....	24
Σχήμα 2.6β. Σχηματική απεικόνιση και τύπος υπολογισμού του tailing factor.....	24
Σχήμα 2.7. Γραφική παράσταση της εξίσωσης Van Deemter.....	27
Σχήμα 3.1. Απεικόνιση μορίου αδρεναλίνης σε δυο διαστάσεις (2D).....	34
Σχήμα 3.2. Απεικόνιση μορίου αδρεναλίνης σε τρεις διαστάσεις (3D).....	34
Σχήμα 3.3. Βιοσύνθεση της αδρεναλίνης.....	37
Σχήμα 3.4 Χημική σύνθεση της αδρεναλίνης.....	37
Σχήμα 3.5. Απεικόνιση μορίου Adrenaline Tartrate (2D).....	38
Σχήμα 3.6 – 3.9. Απεικόνιση δομών προσμίξεων τρυγικής αδρεναλίνης.....	38
Σχήμα 3.10. Απεικόνιση μορίου λιδοκαΐνης υδροχλωρικής σε δυο διαστάσεις (2D).....	40
Σχήμα 3.11. Απεικόνιση μορίου λιδοκαΐνης υδροχλωρικής σε τρεις διαστάσεις (3D).....	40
Σχήμα 3.12. Χημική σύνθεση της λιδοκαΐνης.....	42
Σχήμα 3.13 – 3.22. Απεικόνιση δομών προσμίξεων υδροχλωρικής λιδοκαΐνης.....	42
Σχήμα 4.1. Σχηματική απεικόνιση λειτουργίας των ανιχνευτών UV-Vis και PDA.....	49
Σχήμα 5.1. Χρωματογράφημα αρχικής προσπάθειας.....	55
Σχήμα 5.2. Χρωματογράφημα μετά την τροποποίηση του προγράμματος έκλουσης.....	56
Σχήμα 5.3. Χρωματογράφημα που λήφθηκε από τον PDA ανιχνευτή.....	57
Σχήμα 5.4. Χρωματογράφημα που λήφθηκε από τον PDA ανιχνευτή.....	59

Σχήμα 6.1. Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος εργασίας.....	65
Σχήμα 6.2. Επαναληψιμότητα μετρήσεων της αδρεναλίνης στο διάλυμα εργασίας.....	66
Σχήμα 6.3. Επαναληψιμότητα μετρήσεων της λιδοκαΐνης στο διάλυμα εργασίας.....	66
Σχήμα 6.4. Επαναληψιμότητα μετρήσεων της αδρεναλίνης στο πρότυπο διάλυμα.....	67
Σχήμα 6.5. Επαναληψιμότητα μετρήσεων της λιδοκαΐνης στο πρότυπο διάλυμα.....	67
Σχήμα 6.6α. Χρωματογράφημα λευκού διαλύματος	68
Σχήμα 6.6β. – 6.6δ. Χρωματογραφήματα placebo διαλυμάτων	69
Σχήμα 6.7: Διάγραμμα % ανάκτησης λιδοκαΐνης.....	71
Σχήμα 6.8: Διάγραμμα % ανάκτησης αδρεναλίνης.....	71
Σχήμα 6.9. Γραμμικότητα μεθόδου – Διάγραμμα εμβαδού κορυφής της Αδρεναλίνης σε συνάρτηση της θεωρητικής συγκέντρωσης.....	73
Σχήμα 6.10. Γραμμικότητα μεθόδου – Διάγραμμα πειραματικής συγκέντρωσης της Λιδοκαΐνης σε συνάρτηση της θεωρητικής συγκέντρωσης.....	74

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Διάταξη ελέγχου διαρροής περιεκτών φαρμάκων.....	10
Εικόνα 2. Φιάλες διαλυτών διαφόρων μεγεθών.....	15
Εικόνα 3. Γραφική απεικόνιση συστήματος έγχυσης δείγματος σε θέση φόρτωσης (α) και σε θέση εισαγωγής (β).....	16
Εικόνα 4. Χρωματογραφικές στήλες διαφόρων μεγεθών.....	17
Εικόνα 5. Σύστημα Υγροχρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης – HPLC.....	48
Εικόνα 6. pHμετρο τύπου Consort Multi-parameters analyzer C3050.....	51

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Αρχική προσπάθεια επιλογής προγράμματος βαθμιδωτής έκλουσης.....	54
Πίνακας 2Α. Βελτίωση προγράμματος βαθμιδωτής έκλουσης.....	55
Πίνακας 2Β. Βελτίωση προγράμματος βαθμιδωτής έκλουσης.....	57
Πίνακας 2Γ. Βελτίωση προγράμματος βαθμιδωτής έκλουσης.....	58
Πίνακας 3. Τελικό βέλτιστο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης.....	52
Πίνακας 4. Έλεγχος ορθότητας της μεθόδου (αδρεναλίνη).....	70
Πίνακας 5. Έλεγχος ορθότητας της μεθόδου (λιδοκαΐνη).....	70
Πίνακας 6. Αποτελέσματα γραμμικότητας και εύρους μεθόδου (αδρεναλίνη).....	72
Πίνακας 7. Αποτελέσματα γραμμικότητας και εύρους μεθόδου (λιδοκαΐνη).....	73
Πίνακας 8. Συνθήκη 1 - Επίδραση θερμοκρασίας στήλης (αδρεναλίνη).....	76
Πίνακας 9. Συνθήκη 1 - Επίδραση θερμοκρασίας στήλης (λιδοκαΐνης).....	76
Πίνακας 10. Συνθήκη 2 - Επίδραση όγκου έγχυσης (αδρεναλίνη)	77
Πίνακας 11. Συνθήκη 2 - Επίδραση όγκου έγχυσης (λιδοκαΐνη).....	77
Πίνακας 12. Συνθήκη 3 - Επίδραση μήκους κύματος ανιχνευτή (αδρεναλίνη).....	78
Πίνακας 13. Συνθήκη 3 - Επίδραση μήκους κύματος ανιχνευτή (λιδοκαΐνη).....	78
Πίνακας 14. Συνθήκη 4 - Επίδραση μάρκας στήλης (αδρεναλίνη).....	79
Πίνακας 15. Συνθήκη 4 - Επίδραση μάρκας στήλης (λιδοκαΐνη).....	79
Πίνακας 16. Συγκεντρωτικός πίνακα ελέγχου αδρεναλίνης για τις συνθήκες 1-4.....	80
Πίνακας 17. Συγκεντρωτικός πίνακα ελέγχου λιδοκαΐνης για τις συνθήκες 1-4.....	81
Πίνακας 18. Αποτελέσματα μελέτης σταθερότητας της κινητής φάσης (αδρεναλίνη)...	83
Πίνακας 19. Αποτελέσματα μελέτης σταθερότητας της κινητής φάσης (λιδοκαΐνη).....	83
Πίνακας 20. Έλεγχος σταθερότητας πρότυπων διαλυμάτων (Συνθήκη S1).....	85
Πίνακας 21. Έλεγχος σταθερότητας πρότυπων διαλυμάτων (Συνθήκη S2).....	85
Πίνακας 22. Αρχικές συγκεντρώσεις αδρεναλίνης και λιδοκαΐνης.....	85

Πίνακας 23. Μελέτη σταθερότητας διαλυμάτων ελέγχου (Συνθήκη S3.1 και S4.1).....	86
Πίνακας 24. Μελέτη σταθερότητας διαλυμάτων ελέγχου (Συνθήκη S3.2 και S4.2).....	86
Πίνακας 25. Μελέτη σταθερότητας διαλυμάτων ελέγχου (Συνθήκη S3.1 και S4.1).....	87
Πίνακας 26. Μελέτη σταθερότητας διαλυμάτων ελέγχου (Συνθήκη S3.2 και S4.2).....	87
Πίνακας 27. Έλεγχος πιστότητας για την αδρεναλίνη (τρεις αναλυτές)	88
Πίνακας 28. Έλεγχος πιστότητας για την λιδοκαΐνη (τρεις αναλυτές)	88
Πίνακας 29. Έλεγχος πιστότητας - 3 διαφορετικές ημέρες ελέγχου (αδρεναλίνη).....	89
Πίνακας 30. Έλεγχος πιστότητας - 3 διαφορετικές ημέρες ελέγχου (λιδοκαΐνη)	89
Πίνακας 31. Αποτελέσματα ενδιάμεσης πιστότητας για την αδρεναλίνη.....	90
Πίνακας 32. Αποτελέσματα ενδιάμεσης πιστότητας για την λιδοκαΐνη.....	90
Πίνακας 33. Μελέτη επίδρασης διαλυμάτων HCl 1M, NaOH 0.01M και H ₂ O ₂ 10%.....	94
Πίνακας 34. Μελέτη επίδρασης UV ακτινοβολίας και θέρμανσης.....	94

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ^{1,14}

Η Διασφάλιση Ποιότητας είναι μια γενική αρχή που καλύπτει όλο το φάσμα των ζητημάτων που μπορεί να επηρεάζουν την ποιότητα ενός προϊόντος. Αποτελεί το σύνολο των οργανωμένων ρυθμίσεων που πραγματοποιούνται με σκοπό την εξασφάλιση ότι ένα φαρμακευτικό προϊόν, είναι της απαιτούμενης ποιότητας για τον σκοπό για τον οποίο προορίζεται. Η Διασφάλιση Ποιότητας ενσωματώνει τους κανόνες ορθής παρασκευής με διάφορους άλλους παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή.

Οι Κανόνες Ορθής Παρασκευής (GMP) των φαρμακευτικών προϊόντων είναι το συστατικό εκείνο της Διασφάλισης Ποιότητας το οποίο εξασφαλίζει ότι τα προϊόντα παράγονται και ελέγχονται σύμφωνα με τα συγκεκριμένα πρότυπα που αρμόζουν στη χρήση για την οποία προορίζονται και όπως επιτάσσει η άδεια κυκλοφορίας.

Οι Κανόνες Ορθής Παρασκευής αφορούν τόσο την ποιότητα όσο και τον έλεγχο της ποιότητας.

Ο Έλεγχος Ποιότητας αντιπροσωπεύει το μέρος εκείνο των Κανόνων Ορθής Παρασκευής που ασχολείται με τη δειγματοληψία, τις προδιαγραφές, τις δοκιμασίες, καθώς και την οργάνωση, την τεκμηρίωση και τις καθορισμένες διαδικασίες αποδέσμευσης που εξασφαλίζουν ότι λαμβάνουν χώρα πράγματι όλες οι αναγκαίες και σχετικές δοκιμασίες και ότι αποτρέπεται η αποδέσμευση όλων των υλικών προς χρήση, πώληση ή προμήθεια αν προηγουμένως δεν έχει κριθεί η ποιότητά τους ικανοποιητική.

Βασικές απαιτήσεις Ελέγχου Ποιότητας

A. Για τη δειγματοληψία και τις δοκιμασίες των πρώτων υλών, των ενδιάμεσων προϊόντων, των τελικών προϊόντων και των υλικών συσκευασίας

είναι απαραίτητο να διατίθεται μια σειρά επαρκών μέσων, εγκεκριμένων διαδικασιών, καθώς και άρτια εκπαιδευμένο προσωπικό.

Β. Όλα τα δείγματα πρώτων υλών, ενδιάμεσων προϊόντων, τελικών προϊόντων και υλικών συσκευασίας λαμβάνονται από το εκπαιδευμένο προσωπικό σύμφωνα με εγκεκριμένες μεθόδους τις οποίες ορίζει ο Έλεγχος Ποιότητας. Οι μέθοδοι ελέγχου υπόκεινται πάντα σε ελέγχους αξιοπιστίας.

Γ. Σε όλη τη διάρκεια των ελέγχων καταγράφονται τα στοιχεία χειρόγραφα ή/και με τη βοήθεια καταγραφικών οργάνων σε μια προσπάθεια να καταδεικνύεται ότι εκτελέστηκαν πράγματι όλες οι διαδικασίες που απαιτούνται από τη δειγματοληψία μέχρι τον τελικό έλεγχο. Οποιαδήποτε απόκλιση παρουσιαστεί καταγράφεται και στη συνέχεια υπόκειται σε λεπτομερή διερεύνηση.

Δ. Τα τελικά προϊόντα θα πρέπει να περιέχουν δραστικά συστατικά με τα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά όπως περιγράφονται από την άδεια κυκλοφορίας, να είναι της απαιτούμενης και συγκεκριμένης καθαρότητας και να τοποθετούνται σε κατάλληλο περιέκτη με ορθή επισήμανση.

Ε. Όλα τα στοιχεία που συγκεντρώνονται από τα αποτελέσματα των επιθεωρήσεων καταγράφονται για τη διενέργεια επίσημης εκτίμησης των δοκιμών που έλαβαν χώρα, τόσο στα ενδιάμεσα, όσο και στα τελικά προϊόντα ως προς τις προδιαγραφές τους

ΣΤ. Δεν πραγματοποιείται απελευθέρωση προς πώληση ή προμήθεια καμίας παρτίδας προϊόντος εάν προηγουμένως δεν έχει πιστοποιηθεί από το ειδικευμένο προσωπικό ότι είναι απολύτως σύμφωνο με τις απαιτήσεις της άδειας κυκλοφορίας.

Ζ. Τηρείται επαρκής αριθμός δειγμάτων από κάθε παρτίδα που απελευθερώνεται ώστε να είναι δυνατός ο μελλοντικός έλεγχος του προϊόντος εφόσον χρειαστεί. Η ίδια διαδικασία εκτελείται και για τις πρώτες ύλες.

Οδηγούμαστε λοιπόν στο συμπέρασμα ότι ο Έλεγχος Ποιότητας βασίζεται σε τρεις πυλώνες, τη δειγματοληψία, τον προσδιορισμό των προδιαγραφών και

την εκτέλεση συγκεκριμένων έργων, καθώς και στην οργάνωση και την τεκμηρίωση που καταλήγει στη διαδικασία της τελικής αποδέσμευσης του προϊόντος. Όλα τα παραπάνω, εξασφαλίζουν ότι πραγματοποιήθηκαν όλοι εκείνοι οι αναγκαίοι και απαραίτητοι έλεγχοι και ότι κανένα υλικό συσκευασίας δεν αποδεσμεύεται για χρήση ή/και κανένα προϊόν δεν αποδεσμεύεται προς πώληση μέχρι να κριθεί η ποιότητά του ικανοποιητική. Ο έλεγχος ποιότητας σε καμία περίπτωση δεν περιορίζεται μόνο σε εργαστηριακές δοκιμές και εργασίες, αλλά συντελεί σε κάθε διεργασία που αφορά την ποιότητα των προϊόντων.

1.2 ΧΗΜΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

1.2.1 Ταυτοποίηση χημικής ουσίας^{1,15}

Η ταυτοποίηση κάθε χημικής ουσίας, πραγματοποιείται με μια σειρά ελέγχων / δοκιμασιών, με τους οποίους επιδιώκεται η απόδειξη της ταυτότητας της εξεταζόμενης χημικής ουσίας που χρησιμοποιείται σε ένα φαρμακευτικό σκεύασμα. Ο έλεγχος της ταυτότητας γίνεται με την επιβεβαίωση :

- Φυσικών ιδιοτήτων (σημείο τήξης, δείκτης διάθλασης, σημείο ζέσεως, ειδική στροφική ικανότητα, διαλυτότητα, κα)
- Χημικών ιδιοτήτων (μέσω χαρακτηριστικών αντιδράσεων διάφορων χημικών ομάδων)
- Φυσικοχημικών ιδιοτήτων (μελέτη ποιοτικών χαρακτηριστικών, όπως χρόνοι κατακράτησης στα λαμβανόμενα χρωματογραφήματα, φάσματα υπεριώδους και υπερύθρου, κα)

Ενδεικτικά αναφέρονται ορισμένες από τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται στους ελέγχους ταυτοποίησης :

- Σχετική πυκνότητα
- Ειδική στροφή
- Σημείο τήξεως

- Απορρόφηση στο UV
- Φάσμα IR
- Αντιδράσεις ανιόντων (Cl⁻)
- Αντιδράσεις κατιόντων (Na⁺)
- Χρωστικές αντιδράσεις μορίου
- Χρωματογραφία TLC
- Χρωματογραφία χάρτη
- HPLC

1.2.2 Έλεγχος καθαρότητας¹

Η διενέργεια ελέγχων καθαρότητας έχει ως στόχο να διαπιστωθεί η καθαρότητα της φαρμακευτικής ουσίας με διάφορες δοκιμασίες για την ύπαρξη προσμίξεων. Προσμίξεις ονομάζονται εκείνες οι ουσίες που συνυπάρχουν με την πρώτη ύλη ως υπολείμματα αντιδραστηρίων παρασκευής ή παραπροϊόντα. Όπως είναι προφανές αυξημένη προσοχή δίνεται στις προσμίξεις που δύναται να έχουν επιβλαβή δράση. Οι προσμίξεις διακρίνονται σε :

- Προσμίξεις που επιτρέπονται σε ανεκτά όρια
- Προσμίξεις που η παρουσία τους κρίνεται ανεπίτρεπτη

Οι έλεγχοι καθαρότητας περιλαμβάνουν μελέτη διαφόρων παραγόντων όπως:

- pH (Το pH πρέπει να βρίσκεται εντός ορισμένων ορίων που καθορίζονται από τη μονογραφία και με αυτόν τον τρόπο ελέγχεται η ύπαρξη αλκαλικών ή όξινων προσμίξεων)
- Απορρόφηση (Υπολογισμός ειδικής απορρόφησης σε ορισμένο μήκος κύματος)
- Εμφάνιση διαλύματος (Έλεγχος διαύγειας και βαθμού οπαλισμού)
- Ειδική στροφή

- Οξύτητα
- Συγγενείς ουσίες (Ύπαρξη παραπροϊόντων κατά τη σύνθεση)
- Τέφρα (Μη πτητικά συστατικά που παραμένουν μετά από την πλήρη καύση μιας οργανικής ουσίας ή δρόγης). Ο προσδιορισμός της τέφρας αποσκοπεί στον έλεγχο απουσίας κάθε ανόργανης ύλης σε ένα οργανικό φάρμακο ή δρόγη. Υπάρχουν 4 τιμές τέφρας για την κάλυψη όλων των περιπτώσεων ελέγχου καθαρότητας: Ολική τέφρα, θειική τέφρα, τέφρα υδροδιαλυτή και τέφρα αδιάλυτη στο υδροχλωρικό οξύ.
- Προσδιορισμός νερού (Μέθοδος Karl-Fischer)
- Απώλεια κατά την ξήρανση (Η % ελάττωση της μάζας, όταν η ουσία ξηρανθεί)
- Βαρέα μέταλλα
- Αριθμός οξέων
- Αριθμός εστέρων
- Αριθμός σαπωνοποίησης
- Αριθμός υπεροξειδίων
- Αριθμός ιωδίου
- Ασαπωνοποίητα
- Έλεγχος ορίων υπολειμμάτων διαλυτών (Residual Solvents)
- Έλεγχος ορίων ανόργανων ιόντων

1.2.3. Έλεγχος τελικού προϊόντος^{1,16}

1.2.3.1 Προσδιορισμός ταυτότητας και ποσοτικός προσδιορισμός δραστικών συστατικών.

Οι μέγιστες ανεκτές αποκλίσεις της περιεκτικότητας σε δραστικά συστατικά σε ένα τελικό προϊόν δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν το $\pm 5\%$ κατά την παραγωγή, εκτός και αν υπάρχει κάποια άλλη κατάλληλη αιτιολόγηση. Βασιζόμενος σε

δοκιμασίες σταθερότητας ο παραγωγός πρέπει να είναι σε θέση να δικαιολογεί και να προτείνει τα μέγιστα όρια ανοχής για την περιεκτικότητα σε δραστικά συστατικά στο τελικό προϊόν που θα ισχύουν μέχρι το πέρας της προτεινόμενης περιόδου ισχύος του προϊόντος.

1.2.3.2 Προσδιορισμός ταυτότητας και ποσοτικός προσδιορισμός εκδόχων συστατικών.

Πραγματοποιούνται έλεγχοι για τον προσδιορισμό του ανώτερου και του κατώτερου ορίου των συντηρητικών και των εκδόχων, ώστε να αποφεύγονται δυσμενείς επιδράσεις στις οργανικές λειτουργίες.

1.2.4 Έλεγχος περιεκτικότητας πρώτων υλών^{1,16}

Με τον έλεγχο περιεκτικότητας των πρώτων υλών διαπιστώνεται αν η υπό εξέταση πρώτη ύλη περιέχει το δραστικό συστατικό σύμφωνα με τις προδιαγραφές της μονογραφίας. Σε περίπτωση που η περιεκτικότητα της πρώτης ύλης σε φάρμακο βρεθεί εκτός των ορίων, σημαίνει ότι η καθαρότητα της πρώτης ύλης δεν είναι αποδεκτή ή ότι έχουμε διάσπαση του φαρμάκου για κάποιο λόγο.

Για την επιλογή της κατάλληλης μεθόδου για τον έλεγχο της περιεκτικότητας λαμβάνονται υπόψη :

- Η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα της μεθόδου
- Απατήσεις για χρήση ουσιών αναφοράς (ΧΟΑ)
- Η διαλυτότητα της ουσίας σε διαλύτες που απαιτούνται
- Η ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου

Για τον λόγο αυτό, οι πλέον χρησιμοποιούμενες τεχνικές είναι :

- Μη υδατικές ογκομετρήσεις (Βάσεις – Οργανικά οξέα)
- Υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης
- Φασματοφωτομετρία υπεριώδους

- Φασματοφωτομετρία ορατού
- Ατομική απορρόφηση
- Φθορισμομετρία
- Υδατικές ογκομετρήσεις

1.3 ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ^{1,17}

Φάρμακο γενικά ονομάζεται κάθε χημική ουσία ικανή να επηρεάσει την λειτουργία του οργανισμού κάθε έμβιου όντος ή μικροοργανισμού όταν εισέλθει σε αυτόν. Πιο απλά χαρακτηρίζεται κάθε ουσία ή παρασκεύασμα που ανακουφίζει ή θεραπεύει από ασθένειες και γενικότερα αποκαθιστά την ανθρώπινη υγεία. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) φάρμακο χαρακτηρίζεται κάθε ουσία ή μίγμα ουσιών, που παράγεται και προσφέρεται προς πώληση για τη διάγνωση, τη θεραπεία, τον μετριασμό ή την πρόληψη νόσου ή των συμπτωμάτων τους στον άνθρωπο ή στα ζώα, καθώς και για την αποκατάσταση, τη διόρθωση, ή τη μεταβολή οργανικών λειτουργιών στον άνθρωπο ή τα ζώα.

Ένα φάρμακο χαρακτηρίζεται απλό όταν διαθέτει μια μόνο δραστική ουσία, και σύνθετο εάν περιέχει περισσότερες από μια δραστικές ουσίες. Ανάλογα με τον τρόπο χορήγησης, τα φάρμακα διακρίνονται σε εσωτερικής χρήσης (χορηγούμενα από το γαστρεντερικό σύστημα ή παρεντερικώς με ένεση) και εξωτερικής χρήσης (αλοιφές, κολλύρια, έμπλαστρα, κα)

1.3.1 Ενέσιμα διαλύματα

Τα ενέσιμα είναι στείρα διαλύματα, γαλακτώματα ή εναιωρήματα που παρασκευάζονται με διάλυση, γαλακτωματοποίηση ή εναιώρηση ενός ή περισσότερων δραστικών συστατικών και των προστιθέμενων ουσιών σε νερό για ενέσιμα, σε κατάλληλο στείρο μη υδατικό υγρό ή σε μίγμα αυτών των διαλυτών. Αν και συχνά χρησιμοποιείται ο όρος «ενέσιμα», δεν θα πρέπει να ξεχνάμε και τον όρο «παρεντερικά» ο οποίος είναι σύνθετος, αποτελούμενος

από 2 λέξεις «παρά + έντερον» που σημαίνει «παράκαμψη εντέρου» και περιγράφει ακριβώς τον τρόπο δράσης των διαλυμάτων αυτών.

Σύμφωνα με την Αμερικανική Φαρμακοποιία (USP) ως παρεντερικά καλούνται σκευάσματα που ενίονται απευθείας στα αιμοφόρα αγγεία, ιστούς ή όργανα. Παρασκευάζονται με τέτοιες διαδικασίες ώστε να εξασφαλίζεται η τήρηση των προδιαγραφών, όσον αφορά στην στείρωση, τα πυρετογόνα και τα σωματίδια, ενώ αρκετές φορές κρίνεται απαραίτητη η προσθήκη αναστολέων ανάπτυξης μικροοργανισμών.

Τα σκευάσματα για παρεντερική χορήγηση διακρίνονται σε 5 κατηγορίες:

- Ενέσιμα διαλύματα
- Ξηρές κόνεις που με την προσθήκη κατάλληλου στείρου υγρού σχηματίζουν ενέσιμα διαλύματα
- Ξηρές κόνεις που με την προσθήκη κατάλληλου στείρου υγρού σχηματίζουν ενέσιμα εναιωρήματα
- Ενέσιμα Εναιωρήματα
- Ενέσιμα γαλακτώματα

Τα πλεονεκτήματα της παρεντερικής οδού χορήγησης των φαρμάκων είναι:

- ✓ Εξασφάλιση ικανοποιητικών απαιτούμενων συγκεντρώσεων φαρμάκου σε συγκεκριμένους ιστούς ή όργανα του σώματος και ιδιαίτερα όταν αυτό δεν εξασφαλίζεται από τη χρησιμοποίηση μέσω άλλων οδών.
- ✓ Απευθείας έλεγχος συγκεκριμένων παραμέτρων και αντιμετώπιση επειγόντων περιστατικών.
- ✓ Εξασφάλιση του θεραπευτικού αποτελέσματος για φάρμακα που δεν απορροφούνται ή αποσυντίθενται στο γαστρεντερικό.
- ✓ Χορήγηση φαρμάκων σε περιπτώσεις που άλλοι οδοί δεν είναι διαθέσιμες.

- ✓ Διορθωτική παρέμβαση για την αποκατάσταση των επιπέδων των ηλεκτρολυτών και για μακροπρόθεσμη ή βραχυπρόθεσμη θρεπτική υποστήριξη.
- ✓ Επίτευξη ταχείας τοπικής δράσης όταν αυτό κριθεί απαραίτητο.

1.3.2 Βοηθητικές ουσίες

Στα παρεντερικά σκευάσματα είναι απαραίτητη η χρήση βοηθητικών ουσιών, οι οποίες καθιστούν το τελικό προϊόν ισότονο με το αίμα, είναι υπεύθυνες για την ρύθμιση του pH και την αύξηση της διαλυτότητας, ενώ ταυτόχρονα αποτρέπουν την αποσύνθεση των δραστικών συστατικών και εξασφαλίζουν κατάλληλες αντιμικροβιακές ιδιότητες. Είναι αυτονόητο ότι αυτές οι ουσίες δε θα πρέπει σε καμία περίπτωση να προκαλούν κάποια ανεπιθύμητη δράση, (πχ τοξικότητα ή αδικαιολόγητο τοπικό ερεθισμό). Οι βοηθητικές αυτές ουσίες συμβάλλουν στην αποτελεσματικότητα και στη σταθερότητα του προϊόντος και μπορούν να χωριστούν στις εξής κατηγορίες :

- Ρυθμιστικά συστήματα (Διατήρηση pH σε συγκεκριμένο εύρος τιμών)
- Αντιοξειδωτικά (Παρεμπόδιση οξειδωσης του δραστικού συστατικού)
- Συντηρητικά (Χρήση σε περιέκτες πολλαπλών δόσεων)
- Ρυθμιστές τονικότητας (Μείωση του ερεθισμού, του πόνου, και της διαταραχής της ισορροπίας των ηλεκτρολυτών)

1.3.3 Έλεγχος ποιότητας ενέσιμων προϊόντων

Εκτός από τον έλεγχο της περιεκτικότητας και καθαρότητας ενός ενέσιμου προϊόντος, θα πρέπει να αναφερθούν ακόμα 4 πολύ σημαντικοί έλεγχοι:

Έλεγχος Στειρότητας

Η στεριότητα αποτελεί τη σπουδαιότερη και πιο κρίσιμη προδιαγραφή και στοχεύει σε απουσία μικροοργανισμών. Η στεριότητα πρέπει να αποδεικνύει

ότι η διαδικασία είναι ικανή να παράγει κάθε φορά προϊόντα εντός προδιαγραφών

Έλεγχος πυρετογόνων

Χρησιμοποιούνται κυρίως δύο δοκιμασίες. Η πρώτη είναι μια ποιοτική δοκιμασία που συνίσταται στη μέτρηση της αύξησης θερμοκρασίας στο σώμα κουνελιών μετά από ενδοφλέβια έγχυση του υπό εξέταση στείρου διαλύματος. Η δεύτερη είναι μια βιοχημική δοκιμασία και είναι ευρύτερα γνωστή ως LAL (Limulus Amebocyte Lysate)

Έλεγχος σωματιδίων

Ελέγχεται η επιμόλυνση που οφείλεται στην ύπαρξη εντός του σκευάσματος ξένων, μη διαλυμένων σωματιδίων. Ο έλεγχος εκτελείται με τη χρήση ειδικής συσκευής αποκλεισμού φωτός για τον προσδιορισμό μη ορατών σωματιδίων και με οπτική παρατήρηση των περιεκτών από ειδικά εκπαιδευμένο προσωπικό για τον προσδιορισμό ορατών σωματιδίων

Έλεγχος διαρροής¹⁸

Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά που πρέπει να διαθέτει ένας περιέκτης είναι να κρατά το περιεχόμενο μέσα και τους διάφορους επιμολυντές έξω. Κατά τον έλεγχο διαρροής ο περιέκτης εμβαπτίζεται σε διάλυμα κυανού του μεθυλενίου 1% με ταυτόχρονη εφαρμογή κενού (Εικόνα 1) και σε περίπτωση ύπαρξης ρωγμών η χρωστική εισέρχεται εντός της φύσιγγας.



Εικόνα 1. Διάταξη ελέγχου διαρροής περιεκτών φαρμάκων

1.4 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ^{19,20,21}

Θα μπορούσε να αναρωτηθεί κάποιος εάν σήμερα, με την πληθώρα των φαρμάκων που διαθέτουμε, υπάρχει η ανάγκη για ανάπτυξη νέων φαρμάκων. Η απάντηση σε αυτήν την περίπτωση είναι θετική και οφείλεται κυρίως στους λόγους που ακολουθούν:

- Αντιμετώπιση νόσων φθοράς (νόσος Parkinson, νόσος Alzheimer) οι οποίες δεν μπορούν ακόμη να θεραπευθούν.
- Αντιμετώπιση νόσων οι οποίες δεν αντιμετωπίζονται πλήρως, όπως καρκίνος, αυτοάνοσοι νόσοι (ρευματοειδής αρθρίτιδα).
- Αντιμετώπιση νόσων από ακτινοβολία, απόρριψη μοσχευμάτων που δεν έχουν ακόμη πλήρως αντιμετωπιστεί φαρμακευτικά, κα.

Επιπλέον, υπάρχει ανάγκη ανάπτυξης βελτιωμένων φαρμάκων σε σχέση με τα υπάρχοντα, κυρίως για τους εξής λόγους :

- Για να αυξηθεί η εκλεκτικότητα του φαρμάκου
- Για να μειωθεί η τοξικότητα του φαρμάκου
- Για να βελτιωθούν τα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά του φαρμάκου
- Για να μειωθεί η τιμή του φαρμάκου

Στα πλαίσια της μείωσης του κόστους των φαρμάκων συντελεί σε μεγάλο βαθμό η ανάπτυξη γενοσήμων φαρμάκων με την ίδια δραστική ουσία με τα πρωτότυπα, ακολουθούμενη με μελέτη βιοϊσοδυναμίας. Στον τομέα αυτόν η Ελληνική φαρμακοβιομηχανία έχει δείξει σημαντική δραστηριότητα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

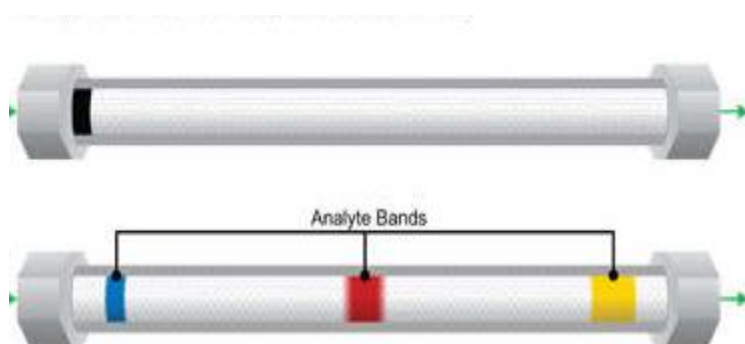
2.1 Αρχή της τεχνικής HPLC^{2,3,22}

Η τεχνική HPLC αποτελεί βελτίωση της κλασικής υγροχρωματογραφίας (Liquid Chromatography, LC). Η μετάβαση από την LC την HPLC επετεύχθη με την αύξηση της εφαρμοζόμενης πίεσης διαβίβασης της κινητής φάσης μέσα από τη διαχωριστική στήλη που χρησιμοποιείται στις αναλύσεις. Οι στήλες περιέχουν σωματίδια πλήρωση υψηλού μερισμού. Αποτέλεσμα της αύξησης της πίεσης είναι οι αποτελεσματικότεροι και ταχύτεροι διαχωρισμοί που οδηγούν στον ποσοτικό προσδιορισμό ενός μεγάλου αριθμού εξεταζόμενων ουσιών. Με την τεχνική HPLC ο διαχωρισμός των συστατικών ενός δείγματος επιτυγχάνεται λόγω του μερισμού αυτών στην κινητή και τη στατική φάση εξαιτίας του διαφορετικού βαθμού αλληλεπίδρασης με τις δυο φάσεις.

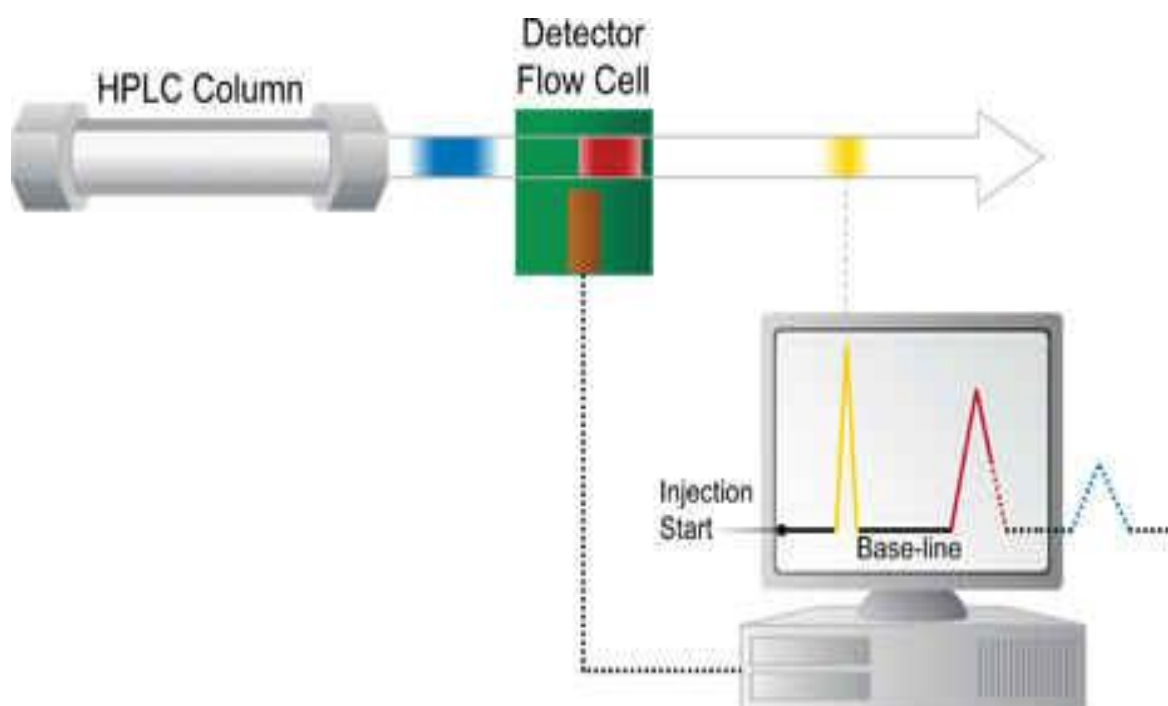
Στο σχήμα 2.1 φαίνεται με παραστατικό τρόπο ένας χρωματογραφικός διαχωρισμός τριών ουσιών α, β, γ με την τεχνική HPLC. Συγκεκριμένα στο πρώτο στάδιο, μίγμα των τριών ουσιών (μαύρο χρώμα) ενίεται στο σύστημα. Στη συνέχεια επιτελείται ο διαχωρισμός των τριών ουσιών (κίτρινο, κόκκινο και μπλε χρώμα για τις ουσίες α, β, γ αντίστοιχα). Η ουσία γ διαθέτει τη μεγαλύτερη συγγένεια με τη στατική φάση, και ακολουθούν η ουσία β και η ουσία α. Αντίστοιχα, η ουσία α έχει τη μεγαλύτερη συγγένεια με την κινητή φάση σε σχέση με τις άλλες ουσίες. Το αποτέλεσμα των παραπάνω δεδομένων, είναι η ουσία γ να συγκρατείται περισσότερο από την ουσία β και α, οι οποίες παρασύρονται από την κινητή φάση. Στο τελικό στάδιο οι τρεις ουσίες έχουν διαχωριστεί πλήρως εντός της χρωματογραφικής στήλης. Η ουσία α (κίτρινο χρώμα) εκλούεται πρώτη, ακολουθεί η ουσία β (κόκκινο χρώμα) και τέλος η ουσία γ (μπλε χρώμα).

Στο σχήμα 2.2 αναπαριστάται η πορεία των τριών ουσιών μετά των διαχωρισμό τους. Από τη στιγμή που θα εξέλθουν από τη στήλη λοιπόν θα περάσουν από έναν κατάλληλο ανιχνευτή (ανιχνευτής ορατού-υπεριώδους,

ανιχνευτής παράταξης φωτοδιόδων, αγωγιμομετρικός ανιχνευτής, ανιχνευτής δείκτη διάθλασης) και με τη χρήση ενός υπολογιστή και ενός προγράμματος λογισμικού θα ληφθεί ένα χρωματογράφημα που περιέχει 3 κορυφές, μια για κάθε εξεταζόμενη ουσία. Εφόσον η ουσία α εκλούεται πρώτη από την στήλη είναι προφανές ότι η κορυφή της θα εμφανίζεται πρώτη, ακολουθούμενη από τις άλλες 2 ουσίες.



Σχήμα 2.1. Χρωματογραφικός διαχωρισμός 3 ουσιών α, β, γ.



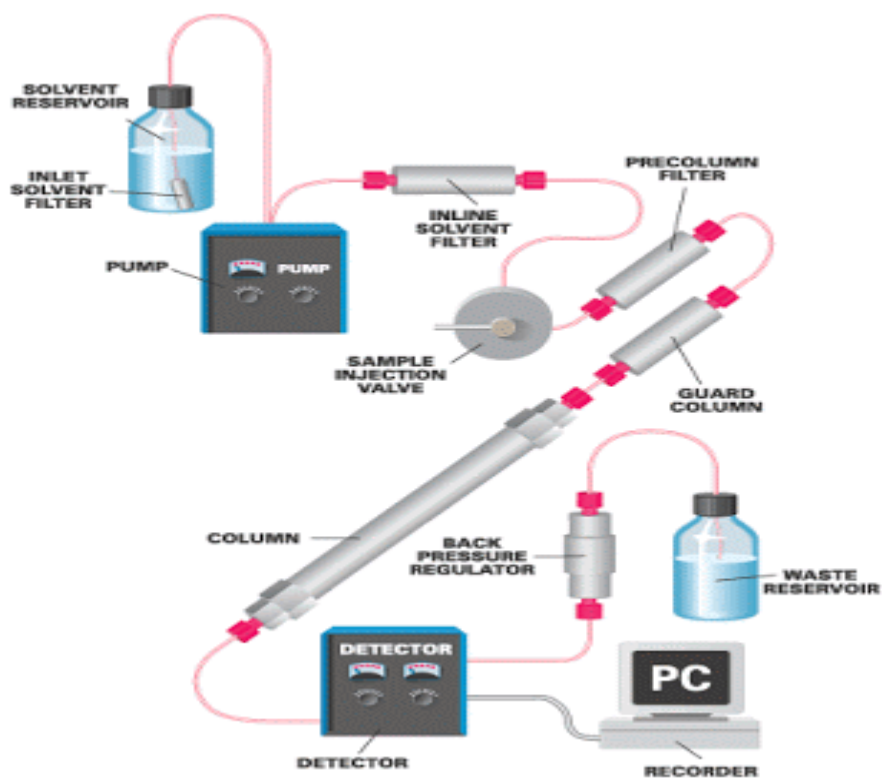
Σχήμα 2.2. Λήψη χρωματογραφήματος των ουσιών α, β, γ με τη βοήθεια ανιχνευτή.

2.2 Οργανολογία^{4,5,23}

Ένας χρωματογράφος HPLC αποτελείται από τα παρακάτω κύρια τμήματα:

- Σύστημα παροχής κινητής φάσης (δοχεία αποθήκευσης διαλυτών)
- Σύστημα εισαγωγής δείγματος
- Αναλυτική στήλη
- Ανιχνευτής
- Σύστημα επεξεργασίας και καταγραφής των αποτελεσμάτων

Στο σχήμα 2.3 παρουσιάζεται η διάταξη των κυριότερων τμημάτων ενός συστήματος HPLC. Στη συνέχεια ακολουθεί λεπτομερής περιγραφή όλων των τμημάτων.



Σχήμα 2.3. Βασικά τμήματα χρωματογράφου HPLC.

2.2.1 Φιάλες διαλυτών ⁶

Τα σύγχρονα συστήματα HPLC, είναι εφοδιασμένα με ένα ή περισσότερα γυάλινα δοχεία καθένα από τα οποία περιέχει τον διαλύτη ή το μίγμα διαλυτών που αποτελούν την κινητή φάση (Εικόνα 2). Σε ορισμένες περιπτώσεις, αν αυτό κριθεί αναγκαίο, γίνεται χρήση και ανοξειδωτων δοχείων. Στα δοχεία αυτά προσαρτώνται μέσα για την απομάκρυνση των διαλυμένων αερίων, που τυχόν περιέχονται στην κινητή φάση, αποτρέποντας την ανεπιθύμητη εμφάνιση φυσαλίδων στη στήλη και τον ανιχνευτή του συστήματος. Σημειώνεται ότι οι φυσαλίδες ευθύνονται για τη διεύρυνση των κορυφών, αλλά και τη μείωση της απόδοσης του ανιχνευτή. Η χρήση απαερωτών, όπως ενός συστήματος άντλησης κενού ή διατάξεων θέρμανσης και ανάδευσης των διαλυτών, κρίνεται αναγκαία για την προστασία του συστήματος. Στις περιπτώσεις που χρησιμοποιείται μια κινητή φάση σταθερής σύστασης η έκλουση ονομάζεται ισοκρατική (isocratic elution), ενώ σε περιπτώσεις που γίνεται χρήση 2 ή 3 συστημάτων διαλυτών, ο λόγος της σύστασης των οποίων μεταβάλλεται με προγραμματισμένο τρόπο, η έκλουση ονομάζεται βαθμιδωτή (gradient elution).



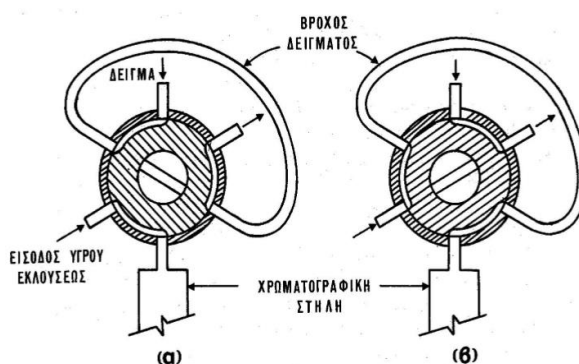
Εικόνα 2. Φιάλες διαλυτών διαφόρων μεγεθών.

2.2.2 Συστήματα άντλησης

Ένα σύστημα HPLC διαθέτει αντλίες ικανές να αναπτύξουν πιέσεις άνω των 4000 psi και αυστηρά απαλλαγμένες από παλμούς ροής. Οι αντλίες θα πρέπει να προσφέρουν ταχύτητες ροής που αγγίζουν τα 10 mL/min και παράλληλα να αποτελούνται από τμήματα ανθεκτικά στη διάβρωση. Υπάρχουν 3 βασικοί τύποι αντλιών που χρησιμοποιούνται σε συστήματα HPLC, οι παλινδρομικές αντλίες, οι αντλίες σύριγγας ή εκτόπισης και οι πνευματικές αντλίες. Οι παλινδρομικές αντλίες είναι οι πλέον διαδεδομένες καθώς χρησιμοποιούνται σήμερα στο 90% των εμπορικά διαθέσιμων συστημάτων HPLC.

2.2.3 Συστήματα έγχυσης δείγματος

Το προς ανάλυση δείγμα εισάγεται στην κορυφή της στήλης ως μια πολύ μικρή ζώνη. Η βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος (Εικόνα 3) αποτελεί το μέσο μεταφοράς της ποσότητας του δείγματος στην χρωματογραφική στήλη και επιτυγχάνει μέγιστη χρωματογραφική αποτελεσματικότητα. Τα σύγχρονα συστήματα HPLC διαθέτουν αυτόματους δειγματολήπτες για την εισαγωγή μεγάλου αριθμού δειγμάτων χωρίς την παρουσία αναλυτή.



Εικόνα 3. Γραφική απεικόνιση συστήματος έγχυσης δείγματος σε θέση φόρτωσης (α) και σε θέση εισαγωγής (β).

2.2.4 Αναλυτικές στήλες ^{7,8}

Όπως συχνά αναφέρεται, η στήλη αποτελεί αδιαμφισβήτητη την καρδιά κάθε χρωματογραφικού διαχωρισμού. Όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό η επιτυχία ή

αποτυχία μιας ανάλυσης εξαρτάται άμεσα από τη σωστή επιλογή της στήλης και για τον λόγο αυτό είναι απαραίτητη μεγάλη προσοχή.

Οι διαθέσιμες στήλες (Εικόνα 4) μπορούν εύκολα να χωριστούν σε δυο μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με τα χαρακτηριστικά τους. Συγκεκριμένα οι αναλυτικές στήλες διαθέτουν εσωτερική διάμετρο 2 - 6 mm και το μήκος τους εξαρτάται από τον τύπο του πληρωτικού υλικού. Στην αντίπερα όχθη βρίσκονται οι παρασκευαστικές στήλες με εσωτερική διάμετρο μεγαλύτερη από 6 mm και μήκος έως ένα μέτρο. Οι πλέον χρησιμοποιούμενες στην χρωματογραφία HPLC είναι οι αναλυτικές στήλες.

Στην κατασκευή τους χρησιμοποιείται ανοξείδωτος χάλυβας, ο οποίος είναι σχετικά αδρανής στη χημική διάβρωση και έχει την ικανότητα να αντέχει στις υψηλές πιέσεις που εφαρμόζονται κατά τη διάρκεια των αναλύσεων. Το εσωτερικό των στηλών αποτελείται από σωληνώσεις οι οποίες λειαίνονται για την αποφυγή ανωμαλιών, ραβδώσεων και μικροπορωδών σχηματισμών. Οι τραχείες επιφάνειες μειώνουν σε μεγάλο βαθμό τον αριθμό των θεωρητικών πλακών και επηρεάζουν δραματικά την ανάλυση.



Εικόνα 4. Χρωματογραφικές στήλες διαφόρων μεγεθών

2.2.5 Ανιχνευτές^{8,23,24}

Σήμερα υπάρχουν αρκετοί διαφορετικοί τύποι ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται στην υγροχρωματογραφία. Ο ανιχνευτής παρακολουθεί και στη συνέχεια μετατρέπει τη μεταβολή της σύστασης της κινητής φάσης σε ένα ηλεκτρικό σήμα το οποίο καταγράφεται από ένα καταγραφικό σύστημα ή έναν

ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η επεξεργασία και μελέτη των αποτελεσμάτων παρέχει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την ποιοτική και ποσοτική σύσταση του δείγματος.

Ένας ιδανικός ανιχνευτής θα πρέπει να διαθέτει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- Να αποκρίνεται σε όλα τα συστατικά του μίγματος
- Να μην αποκρίνεται στην κινητή φάση
- Να επιτρέπει χαμηλά όρια ανίχνευσης
- Να παρέχει γραμμική απόκριση στην περιοχή συγκεντρώσεων των συστατικών που ελέγχονται, ώστε να μπορεί να δώσει στοιχεία για την ποσοτική ανάλυση
- Να είναι εύκολος - όσο το δυνατόν - στη χρήση
- Να είναι - όσο το δυνατόν – οικονομικότερος
- Να διαθέτει αμελητέο νεκρό όγκο, για να μην προκαλεί διεύρυνση κορυφών
- Να μην επηρεάζεται από μεταβολές της θερμοκρασίας και της ταχύτητας ροής του υγρού ελκούσης.

Όπως είναι προφανές, κανένας ανιχνευτής ως σήμερα δεν διαθέτει όλα αυτά τα χαρακτηριστικά, αλλά γίνονται διαρκώς προσπάθειες βελτίωσης και εξέλιξής τους. Υπάρχουν διάφορων ειδών ανιχνευτές, οι κυριότεροι εκ των οποίων αναφέρονται παρακάτω :

- Φασματοφωτομετρικός ανιχνευτής (UV – Vis Detector)
- Φασματοφωτομετρικός ανιχνευτής σειράς φωτοδιόδων (PDA Detector)
- Διαφορικός ανιχνευτής δείκτη διάθλασης (RI Detector)
- Φθορισμομετρικός ανιχνευτής (Fluorescence Detector)
- Ηλεκτροχημικός ανιχνευτής (Electrochemical Detector)

- Εξατμιστικός ανιχνευτής σκέδασης ακτινοβολίας (ELS Detector)
- Φασματόμετρο μαζών

2.2.1 Καταγραφείς - Επεξεργαστές δεδομένων

Το κάθε εξερχόμενο ηλεκτρικό σήμα που λαμβάνεται από έναν ανιχνευτή υπόκειται σε μετατροπή είτε από ένα καταγραφικό σύστημα, είτε από ένα επεξεργαστή δεδομένων σε ένα μόνιμο αρχείο. Το χρωματογράφημα στην πρώτη περίπτωση είναι απεικονισμένο σε ένα καταγραφικό χαρτί γεγονός που μας δίνει τη δυνατότητα για περαιτέρω παρουσίαση με διάφορους τρόπους και αποθήκευσης, αλλά δεν μας δίνει καμία δυνατότητα για επεξεργασία των δεδομένων. Από τη στιγμή που το σήμα καταγράφεται, είναι απολύτως καθορισμένο και δεν επιδέχεται καμία παρέμβαση. Μια λύση στο πρόβλημα που εμφανίζεται σε αυτήν την περίπτωση είναι η χρήση ολοκληρωτών. Οι ολοκληρωτές χρησιμοποιούνται στην ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων, κοστίζουν λιγότερο από τους καταγραφείς, και καταγράφουν το χρωματογράφημα σε χαρτί με παράλληλη δυνατότητα μετατροπής του σήματος του ανιχνευτή από αναλογικό σε ψηφιακό, γεγονός που επιτρέπει υπολογισμούς δεδομένων. Βασικό μειονέκτημα των ολοκληρωτών αποτελεί η αδυναμία τους να δεχτούν δεδομένα από περισσότερους του ενός ανιχνευτές σε ένα χρωματογραφικό σύστημα.

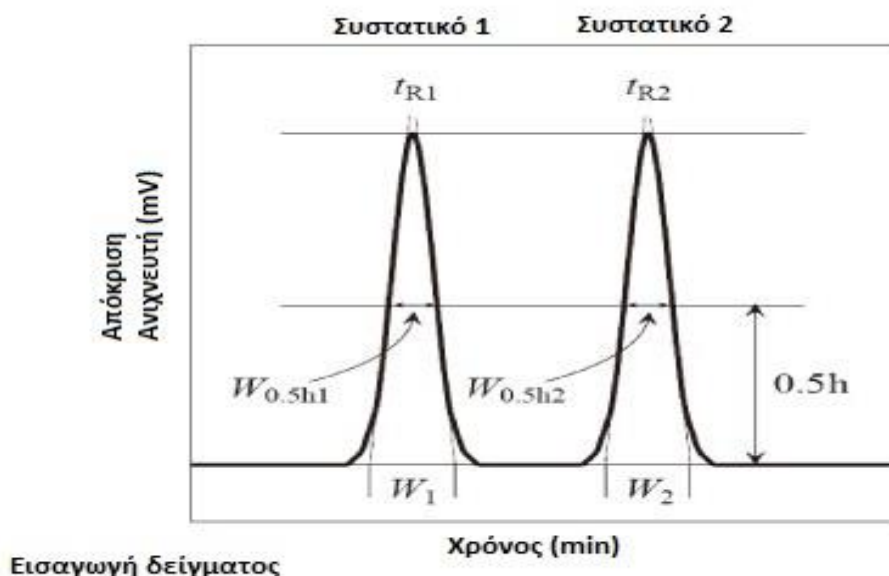
Με τη συνεχιζόμενη ανάπτυξη της τεχνολογίας, οδηγηθήκαμε στη χρήση επεξεργαστών δεδομένων που διαθέτουν όλα τα χαρακτηριστικά των ολοκληρωτών, αλλά έχουν τη δυνατότητα αποθήκευσης δεδομένων και επεξεργασίας αυτών οποιαδήποτε στιγμή καταστεί απαραίτητο.

Τα σύγχρονα συστήματα HPLC είναι συνδεδεμένα με ηλεκτρονικούς υπολογιστές οι οποίοι έχουν την δυνατότητα της προβολής, συλλογής, αποθήκευσης και περαιτέρω επεξεργασίας των σημάτων των ανιχνευτών. Οι ηλεκτρονικοί υπολογιστές παρέχουν απεριόριστες δυνατότητες και στον έλεγχο της λειτουργίας ενός συστήματος HPLC, καθώς μέσω εκείνων ρυθμίζεται η σύσταση και η ροή της κινητής φάσης, το μήκος κύματος, η

ταχύτητα απαερίωσης, κα. Η χρήση υπολογιστών προσφέρει πολλές δυνατότητες στην ποσοτική μελέτη των σημάτων των ανιχνευτών, ενώ με την επιλογή κατάλληλου λογισμικού είναι δυνατή η επιλογή ορισμένων κορυφών του χρωματογραφήματος, επιτρέποντας εκλεκτικότερη μελέτη, καθορισμό ορίων ολοκλήρωσης και πολλές άλλες δυνατότητες. Με την χρήση ανιχνευτών PDA είναι δυνατή η λήψη του φάσματος κάθε μεμονωμένης ουσίας και ο έλεγχος καθαρότητας κάθε κορυφής.

2.3 Βασικές Χρωματογραφικές Αρχές^{1,4,8,25}

Σε μια ανάλυση HPLC, το εξεταζόμενο δείγμα εισάγεται στην κατάλληλη στήλη σε μικρή και πολύ συμπαγή μορφή με σκοπό να επιτευχθεί όσο το δυνατόν ένα ακριβές σημείο εκκίνησης. Η συνεχής κατανομή του δείγματος κατά μήκος της στήλης, έχει ως αποτέλεσμα τη μετακίνηση της ζώνης της διαλυμένης ουσίας κατά μήκος της στατικής φάσης και τη διεύρυνση της κορυφής. Στο σχήμα 2.4 παρουσιάζεται ένα τυπικό χρωματογράφημα δύο ουσιών ενός μίγματος.



Σχήμα 2.4. Χρωματογράφημα δείγματος 2 συστατικών, με τα κυριότερα χαρακτηριστικά του.

Ως χρωματογράφημα θεωρείται το γράφημα της κατανομής μιας ουσίας κατά την έξοδο της από τη στήλη σε συνάρτηση της απόστασης την οποία έχει διανύσει από το σημείο εκκίνησης ή του χρόνου από τη στιγμή που εισήχθη στον χρωματογράφο. Στις περισσότερες των περιπτώσεων οι κορυφές των χρωματογραφημάτων που λαμβάνονται ακολουθούν κατανομή κατά Gauss.

2.3.1 Χρωματογραφική ταχύτητα

Η κινητή φάση παρασύρει το δείγμα αμέσως μετά τη εισαγωγή του στο χρωματογραφικό σύστημα και ρέει διαμέσου της στήλης εξαιτίας της διαφοράς πίεσης μεταξύ των άκρων της στήλης

$$P = P_2 - P_1 \quad (2.1)$$

Όπου P_1 και P_2 είναι οι πιέσεις στην είσοδο και την έξοδο της στήλης, αντίστοιχα.

Τα μόρια της εξεταζόμενης ουσίας κινούνται στην ίδια κατεύθυνση και με ταχύτητα ίση ή μικρότερη από την ταχύτητα των μορίων του διαλύτη. Η μέση γραμμική ταχύτητα της ουσίας (u) και της κινητής φάσης (u_0) δίνονται από τις σχέσεις:

$$u = L / t_R \quad (2.2)$$

$$u_0 = L / t_M \quad (2.3)$$

Όπου L είναι το μήκος της στήλης, t_M ο νεκρός χρόνος και t_R ο χρόνος ανάσχεσης μιας ουσίας η οποία συγκρατείται από τη στήλη.

2.3.2 Σχέσεις ανάσχεσης

➤ *Χρόνος ανάσχεσης ή συγκράτησης (Retention Time, t_R)*

Χρόνος ανάσχεσης ορίζεται ως ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ της εισαγωγής του δείγματος (injection) στην είσοδο της στήλης και της εμφάνισης του μέγιστου σημείου της κορυφής της υπό εξέταση ουσίας, και δίνεται από την σχέση :

$$t_R = \frac{1}{A} \int_0^{\infty} C t dt \quad (2.4)$$

Όπου: A είναι το εμβαδόν της κορυφής της ουσίας, C η συγκέντρωση της ουσίας και t ο χρόνος.

➤ *Νεκρός χρόνος ανάσχεσης ή συγκράτησης (t_M)*

Ως νεκρός χρόνος ορίζεται ο απαιτούμενος χρόνος για να διέλθει μια ουσία, η οποία δεν συγκρατείται από το υλικό πλήρωσης της στήλης, μέσω αυτής και δίνεται από την σχέση:

$$t_M = L / u_0 \quad (2.5)$$

➤ *Ανηγμένος χρόνος ανάσχεσης (t_R')*

Ως ανηγμένος χρόνος ανάσχεσης ορίζεται η διαφορά του χρόνου ανάσχεσης μια ουσίας και του νεκρού χρόνου της στήλης,

$$t_R' = t_R - t_M \quad (2.6)$$

Ο ανηγμένος χρόνος ανάσχεσης χρησιμοποιείται τις περισσότερες φορές αντί του χρόνου ανάσχεσης γιατί είναι ανεξάρτητος των παραγόντων που επηρεάζουν τον χρόνο ανάσχεσης.

➤ *Όγκος ανάσχεσης ή συγκράτησης (Retention Volume, V_R)*

Όγκος ανάσχεσης ορίζεται ο όγκος της κινητής φάσης που απαιτείται να διέλθει από μια στήλη για να εκκλουστεί μια ουσία στο μέγιστο της συγκέντρωσής της,

$$V_R = t_R F \quad (2.7)$$

όπου F, η ογκομετρική ταχύτητα ροής

➤ Παράγοντας χωρητικότητας (k')

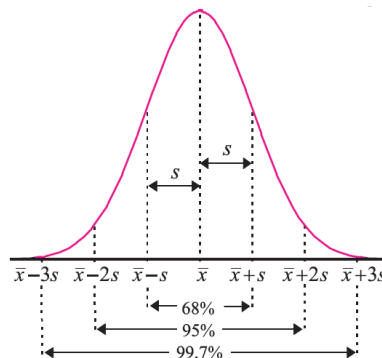
Ο παράγοντας χωρητικότητας εκφράζει τον βαθμό συγκράτησης ενός συστατικού από τη χρωματογραφική στήλη. Ορίζεται ως ο λόγος του αριθμού των μορίων του αναλύτη στην στατική φάση (N_s) προς τα μόρια του αναλύτη στην κινητή φάση (N_m) και δίνεται από την σχέση :

$$k' = N_s / N_m \quad (2.8)$$

2.3.3 Μορφή χρωματογραφικής κορυφής

Κατανομή κατά Gauss

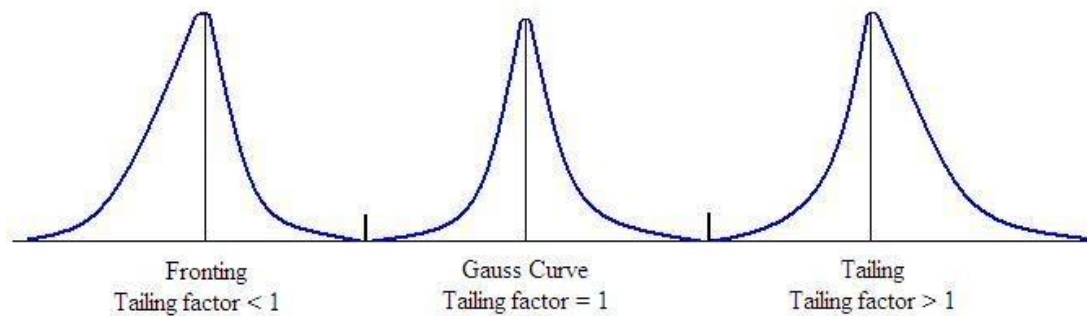
Μια χρωματογραφική κορυφή έχει θεωρητικά μορφή κατανομής κατά Gauss (Σχήμα 2.5), η οποία συνδέει τη συγκέντρωση της ουσίας με τον χρόνο από την ένεσή της στη χρωματογραφική στήλη.



Σχήμα 2.5. Γραφική παράσταση κατανομής κατά Gauss.

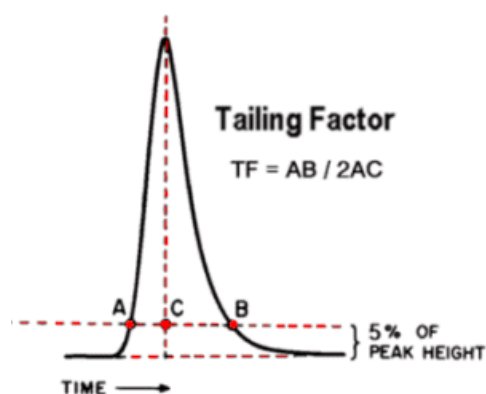
Ασυμμετρία κορυφής^{1,36}

Αν και ο στόχος είναι η χρωματογραφική κορυφή να έχει κατανομή κατά Gauss, συχνά παρατηρείται ασυμμετρία όσο προσεκτικά κι αν πραγματοποιηθεί η ανάλυση. Η εμφάνιση της ασυμμετρίας μπορεί να γίνει είτε στην αρχή της κορυφής (μέτωπο - fronting) είτε στο τέλος της (ουρά - tailing), όπως φαίνεται στο σχήμα 2.6.



Σχήμα 2.6α. Μορφές χρωματογραφικών κορυφών

Η πιο συνηθισμένη περίπτωση είναι εκείνη της εμφάνισης ουράς, δηλαδή της ασυμμετρίας στο τέλος της κορυφής. Μια χρωματογραφική κορυφή χαρακτηρίζεται ικανοποιητικά συμμετρική όταν ο παράγοντας ασυμμετρίας της είναι μεταξύ των τιμών 0,80 και 1,20.



Σχήμα 2.6β. Σχηματική απεικόνιση και τύπος υπολογισμού του tailing factor.

2.3.4 Διεύρυνση χρωματογραφικής ζώνης^{1,36}

➤ Αριθμός θεωρητικών πλακών

Η ποιότητα της στήλης χαρακτηρίζεται από την ικανότητά της για διαχωρισμό ή από το ύψος ισοδύναμο με μια θεωρητική πλάκα (ΥΙΘΠ).

$$\text{ΥΙΘΠ} = h = \frac{L}{n}$$

(2.9)

όπου : L το μήκος της στήλης σε cm, n ο αριθμός των θεωρητικών πλακών και h το μέσο ύψος των θεωρητικών πλακών.

Ο γενικός τύπος υπολογισμού της ικανότητας της στήλης είναι:

$$N = \alpha \left(\frac{V_r}{W} \right)^2 \quad (2.10)$$

όπου : V_r ο όγκος συγκράτησης, W το εύρος της καμπύλης του Gauss και α μια σταθερά αναλογίας.

➤ Διαχωριστική ικανότητα R (Resolution)

Η διαχωριστική ικανότητα R μιας στήλης σε συνδυασμό με την κινητή φάση είναι η ικανότητα να διαχωρίζει δύο ή και περισσότερα συστατικά και εκφράζεται συνήθως σε μονάδες όγκου συγκράτησης ή χρόνου συγκράτησης δια του μέσου εύρους των κορυφών.

$$R_t = 2 \left(\frac{tR_2 - tR_1}{W_1 + W_2} \right) \quad (2.11)$$

Ο Purnell (1960) απέδειξε ότι οι παράγοντες, οι οποίοι ρυθμίζουν τη διαχωριστική ικανότητα μιας στήλης αποδίδονται καλύτερα με τη σχέση:

$$R = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left(\frac{a-1}{a} \right) \left(\frac{K'_2}{K'_2+1} \right) \quad (2.12)$$

όπου : N ο αριθμός των θεωρητικών πλακών, a παράγοντας διαχωρισμού και K'_2 παράγοντας χωρητικότητας για το συστατικό που εκλούεται τελευταίο.

➤ Παράγοντας χωρητικότητας K'

Ο παράγοντας χωρητικότητας K' , ο οποίος στην περίπτωση αυτή είναι το μέτρο της συγκράτησης δίνεται από τη σχέση :

$$K'_2 = \frac{V_2 - V_0}{V_0} \quad (2.13)$$

όπου : V_0 είναι ο όγκος συγκράτησης που οφείλεται στον διαλύτη που είναι διαλυμένα τα συστατικά 1 και 2, V_1 , V_2 οι όγκοι συγκράτησης των συστατικών 1 και 2. Δίδεται επίσης και από την σχέση 2.8.

Τέλος, ο παράγοντας διαχωρισμού α εκφράζει τη σχετική συγκράτηση των συστατικών από τη στατική φάση και δίνεται από τη σχέση:

$$\alpha = \frac{K'_2}{K'_1} = \frac{V_2 - V_0}{V_1 - V_0} \quad (2.14)$$

2.3.5 Παράγοντες διεύρυνσης χρωματογραφικής ζώνης^{1,26}

Σε έναν χρωματογραφικό διαχωρισμό λαμβάνουν χώρα διάφορες κινητικές και θερμοδυναμικές διεργασίες εντός της χρωματογραφικής στήλης, οι οποίες όπως είναι φυσικό ασκούν επιρροή προς τη διεύρυνση της ζώνης της κορυφής. Σημαντικοί παράγοντες στη διεύρυνση είναι η εγκάρσια και επιμήκης διάχυση της ουσίας στην κινητή φάση, η ανομοιόμορφη ροή των σωματιδίων της εξεταζόμενης ουσίας και η ταχύτητα εξισορρόπησης της ουσίας μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης. Οι παράγοντες αυτοί παρουσιάζονται στην εξίσωση Van Deemter, η οποία παρέχει το ύψος ισοδύναμο προς μια θεωρητική πλάκα (H) και στην υδροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης έχει τη μορφή :

$$HETP = A + B/u + Cu \quad (2.15)$$

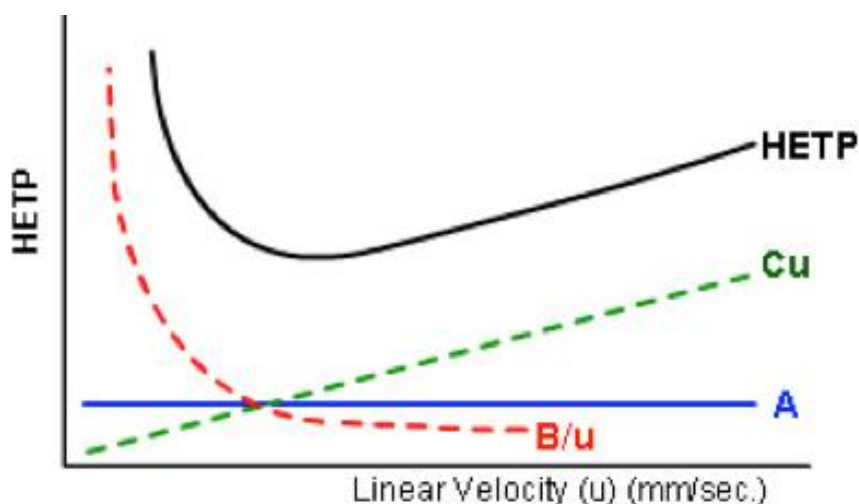
Όπου u είναι η μέση γραμμική ταχύτητα της κινητής φάσης και A , B , και C είναι σταθερές.

Η σταθερά A της εξίσωσης Van Deemter σχετίζεται με τη στροβιλώδη διάχυση, αποτελεί μέτρο διεύρυνσης μιας κορυφής, η οποία οφείλεται στο

γεγονός ότι όλα τα μόρια της ουσίας δεν διατρέχουν ακριβώς την ίδια απόσταση κατά τη μετακίνησή τους εντός της στήλης, λόγω της ανομοιομορφίας του μεγέθους και του σχήματος των σωματιδίων του πληρωτικού υλικού της στήλης. Η σταθερά A είναι πρακτικά ανεξάρτητη από την ταχύτητα u .

Η σταθερά B σχετίζεται με τη διαμήκη διάχυση της ουσίας η οποία είναι μεγαλύτερη στα αέρια από ό,τι στα υγρά. Η ταχύτητα διάχυσης εξαρτάται από τον συντελεστή διάχυσης, ο οποίος επηρεάζεται από αρκετούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία και το ιξώδες του διαλύτη. Η διαμήκης διάχυση αυξάνεται με τον χρόνο, άρα η διεύρυνση της κορυφής αυξάνεται με τη μείωση της ταχύτητας u .

Η σταθερά C , περιλαμβάνει τις σταθερές C_m και C_s που οφείλονται στην αντίσταση της μεταφοράς μάζας της ουσίας μεταξύ των διαύλων της κινητής φάσης και της μεσεπιφάνειας της στατικής φάσης, αντίστοιχα. Η σταθερά C_m μειώνεται με τη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων της στατικής φάσης, ενώ η σταθερά C_s με τη μείωση του πάχους της στατικής φάσης. Στο σχήμα 2.7 φαίνεται η γραφική παράσταση της εξίσωσης Van Deemter.



Σχήμα 2.7. Γραφική παράσταση της εξίσωσης Van Deemter.

2.4 Παράμετροι Αξιολόγησης Μεθόδων^{1,26}

Για την αξιολόγηση των αναλυτικών μεθόδων είναι αναγκαίος και απαραίτητος ο καθορισμός του σκοπού της μεθόδου, των αποδεκτών ορίων των προδιαγραφών και των χαρακτηριστικών εκτέλεσής της. Η ειδικότητα, η ακρίβεια και η πιστότητα των μεθόδων ελέγχου πρέπει να εξεταστούν, να επαληθευτούν και να τεκμηριωθούν.

2.4.1 Ειδικότητα (Specificity) / Εκλεκτικότητα (Selectivity)

Μια μέθοδος είναι πλήρως ειδική (specific) για μια συγκεκριμένη ουσία, αν η συγκέντρωσή της μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια, χωρίς επίδραση από άλλα συστατικά του εξεταζόμενου δείγματος. Όλα τα υπόλοιπα συστατικά δεν παράγουν αναλυτικό σήμα.

Μια μέθοδος είναι πλήρως εκλεκτική (selective), αν παρέχει ορθά αναλυτικά αποτελέσματα για τα συστατικά του δείγματος χωρίς να έχουμε εμφάνιση αλληλεπίδρασης μεταξύ αυτών.

Δεν είναι λίγες οι φορές που οι όροι ειδικότητα και εκλεκτικότητα χρησιμοποιούνται ισοδύναμα και δεν γίνεται διάκριση μεταξύ τους.

Με τη μελέτη της εκλεκτικότητας γίνεται έλεγχος της ικανότητας του συστήματος να προσδιορίσει με ακρίβεια μια ουσία παρουσία δευτερευουσών ουσιών, όπως συνυπάρχουσα της δραστικής, έκδοχα ή προϊόντα αποικοδόμησης. Η εκλεκτικότητα μιας μεθόδου HPLC μπορεί να ελεγχθεί με έναν ή περισσότερους από τους παρακάτω τρόπους:

- Με σύγκριση χρωματογραφήματος της υπό εξέταση ουσίας με χρωματογράφημα ουσίας αναφοράς.
- Με σύγκριση των κορυφών από φάσματα UV – Vis (αν υπάρχει διαθέσιμος ανιχνευτής).
- Με έλεγχο καθαρότητας των κορυφών μετά από κατεργασία του δείγματος (θερμική κατεργασία, οξειδωση, κατεργασία με οξύ ή βάση, κα).

- Με έλεγχο δειγμάτων placebo και λευκών διαλυμάτων (blank).
- Εμβολιάζοντας το προϊόν με κατάλληλες ποσότητες προσμίξεων και στην συνέχεια με προσδιορισμό αυτών με πιστότητα και ακρίβεια (Η διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις ποσοτικού προσδιορισμού προσμίξεων).

2.4.2 Ακρίβεια (Accuracy)

Ο προσδιορισμός της ακρίβειας γίνεται αναλύοντας μια σειρά δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων και συγκρίνοντας τις πειραματικές συγκεντρώσεις με τις θεωρητικές. Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται προκύπτουν με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας της εξεταζόμενης ουσίας σε διαλύματα placebo. Σημαντικό ρόλο παίζει η προετοιμασία και η σύσταση του δείγματος, για τον λόγο αυτόν, τα διαλύματα παρασκευάζονται με τρόπο ανάλογο του τρόπου παρασκευής του πραγματικού διαλύματος ελέγχου του σκευάσματος. Για τον έλεγχο της ακρίβειας μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια σειρά από 5 τουλάχιστον διαφορετικών συγκεντρώσεων της ουσίας κατανεμημένων ομοιόμορφα, ώστε να περιλαμβάνουν το 80% - 120% της αναμενόμενης περιοχής εργασίας.

2.4.3 Πιστότητα (Precision)

Η πιστότητα μιας μεθόδου είναι ο βαθμός στον οποίο μεμονωμένα αποτελέσματα πολλαπλών αναλύσεων μιας σειράς προτύπων συμφωνούν. Η πιστότητα μπορεί να εκφραστεί ως η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) και διακρίνεται σε επαναληψιμότητα (Repeatability) ή της ενδιάμεση πιστότητα (Intermediate Precision). Με τον όρο επαναληψιμότητα αναφερόμαστε στο μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων διαδοχικών ελέγχων στο ίδιο δείγμα, κάτω από τις ίδιες συνθήκες, τον ίδιο αναλυτή, το ίδιο όργανο, το ίδιο εργαστήριο και για βραχύ χρονικό διάστημα. Με τον όρο ενδιάμεση πιστότητα αναφερόμαστε στο μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων ελέγχων, σε όσο το δυνατόν διαφορετικές συνθήκες από διαφορετικούς αναλυτές, διαφορετικές μέρες ανάλυσης, διαφορετικά όργανα ή στήλες, κα.

2.4.4 Εύρος (Range)

Το εύρος μιας αναλυτικής μεθόδου ορίζεται ως η περιοχή ανάμεσα στο ανώτερο και κατώτερο όριο που καθορίζουν η πιστότητα, η ακρίβεια και η γραμμικότητα. Σε ποσοτικούς προσδιορισμούς δραστικών ουσιών το ελάχιστο εύρος που ελέγχεται κυμαίνεται μεταξύ 80% και 120%, ενώ σε προσδιορισμούς προσμίξεων κυμαίνεται από 50% έως 120%.

2.4.5 Όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD)

Το όριο ανίχνευσης είναι η ελάχιστη δυνατή συγκέντρωση μιας ουσίας σε ένα συγκεκριμένο δείγμα η οποία μπορεί να ανιχνευτεί αλλά όχι απαραίτητως και να προσδιοριστεί ποσοτικά. Προσδιορίζεται με διάφορους τρόπους και στην HPLC από τον λόγο S/N που για το LOD $\geq 3,3$.

2.4.6 Όριο ποσοτικοποίησης (Limit of Quantitation, LOQ)

Το όριο ποσοτικοποίησης είναι η ελάχιστη συγκέντρωση μιας ουσίας σε ένα συγκεκριμένο δείγμα που μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με αποδεκτή ακρίβεια. Προσδιορίζεται με διάφορους τρόπους και στην HPLC από τον λόγο S/N ≥ 10 .

2.4.7 Γραμμικότητα (Linearity)

Η μελέτη της γραμμικότητας μιας μεθόδου ξεκινάει με την παρασκευή διαφόρων διαλυμάτων με αραιώσεις ενός πυκνού πρότυπου διαλύματος, τουλάχιστον 5 διαφορετικών συγκεντρώσεων στην περιοχή 80% - 120% και αναλύονται 3 - 6 φορές το καθένα. Η λαμβανόμενη απόκριση θα πρέπει να είναι ανάλογη των συγκεντρώσεων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε μια γραφική παράσταση [Response = f(concentration ή amount)] και βρίσκεται η εξίσωση της ευθείας με την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων. Η τεταγμένη επί την αρχή δεν θα πρέπει να διαφέρει σημαντικά από το μηδέν. Τα όρια αποδοχής είναι R^2 μεγαλύτερο ή ίσο του 0,990 για μέθοδο υπολογισμού προσμίξεων και R^2 μεγαλύτερο ή ίσο του 0,993 για ποσοτικό προσδιορισμό δραστικών ουσιών.

2.4.8 Ανθεκτικότητα (Robustness)

Η ανθεκτικότητα μιας μεθόδου εξετάζεται με τον έλεγχο της επίδρασης μικρών μεταβολών των πειραματικών παραμέτρων που μπορούν να λάβουν χώρα σε συνθήκες ρουτίνας στο αναλυτικό αποτέλεσμα. Οι παράμετροι που μπορούν να εξεταστούν είναι το pH, η ροή και η σύσταση της κινητής φάσης, η θερμοκρασία στήλης και δειγματολήπτη, ο όγκος της ένεσης, το μήκος κύματος, κα. Στην περίπτωση που κάποια αλλαγή προκαλεί σημαντική επίδραση στο αναλυτικό αποτέλεσμα αναφέρεται και στη συνέχεια κρίνεται εάν είναι απαραίτητο η μέθοδος να επαναξιολογηθεί ή να τεθούν αυστηρά όρια ανοχής.

2.4.9 Σταθερότητα διαλυμάτων (Stability of solutions)

Για την επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου είναι απαραίτητη και η μελέτη της σταθερότητας του πρότυπου διαλύματος, του δείγματος και της κινητής φάσης. Για τη μελέτη του πρότυπου διαλύματος παρασκευάζονται 2 πρότυπα διαλύματα και ελέγχεται η ακρίβεια τους. Ένα εκ των δυο προτύπων θεωρείται πρότυπο (Πρότυπο Α), το άλλο εξετάζεται ως δείγμα Πρότυπο Β). Η μελέτη περιλαμβάνει την ανάλυση δειγμάτων που έχουν παραμείνει 24 ή και 48 ώρες στις συνθήκες του ελέγχου.

2.5 Διαδικασία Επανεπικύρωσης (Revalidation)

Αναγκαία κρίνεται η πλήρης ή μερική επανεπικύρωση μιας μεθόδου όταν :

- Η μέθοδος έχει αλλάξει και κάποια ή κάποιες παράμετροι βρίσκονται εκτός ορίων της ανθεκτικότητας, όπως για παράδειγμα, αν το εύρος λειτουργίας μιας στήλης είναι 30-40 °C και για κάποιο λόγο η νέα θερμοκρασία της στήλης πρέπει να είναι στους 45 °C, τότε η μέθοδος θα χρειαστεί επανεπικύρωση.
- Ο σκοπός της μεθόδου που έχει επικυρωθεί, έχει αλλάξει ή έχει επεκταθεί (εφαρμογή σε προϊόν διαφορετικής συγκέντρωσης)

- Ο ποιοτικός έλεγχος του δείγματος ή οι δοκιμασίες καταλληλότητας του συστήματος βρεθούν εκτός των αποδεκτών ορίων και δεν καταστεί δυνατός ο εντοπισμός του προβλήματος.
- Γίνει χρήση οργάνων ή στηλών με διαφορετικά χαρακτηριστικά.

2.6 Διαδικασία Επαλήθευσης (Verification)

Είναι σύνηθες σε ένα εργαστήριο ελέγχου φαρμάκων να χρησιμοποιούνται μονογραφίες σκευασμάτων που προτείνονται από την Αμερικάνικη Φαρμακοποιία (USP) ή την Βρετανική Φαρμακοποιία (BP). Στην περίπτωση αυτή, δεν κρίνεται απαραίτητο να επικυρωθούν οι μέθοδοι πλήρως, αλλά πρέπει να κατατεθούν απολύτως τεκμηριωμένες αποδείξεις για την καταλληλότητα των μεθόδων αυτών όταν χρησιμοποιούνται σε πραγματικές συνθήκες. Η αποτίμηση της εκλεκτικότητας είναι μια κρίσιμη παράμετρος για να επαληθευτεί η καταλληλότητα της μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό μια φαρμακευτικής ουσίας ή φαρμακευτικού προϊόντος. Σε ορισμένες αναλύσεις, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση του προσδιορισμού του ορίου ανίχνευσης και του ορίου ποσοτικοποίησης είναι προτιμότερο να αποδειχθεί η καταλληλότητα των μεθόδων που έχουν προταθεί από τις μονογραφίες σε πραγματικές συνθήκες ανάλυσης. Σχετικά με ορισμένες βασικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται σε αναλύσεις ρουτίνας, αν δεν υπάρχουν σοβαροί λόγοι ότι η συγκεκριμένη μέθοδος δεν λειτουργεί για το υπό εξέταση δείγμα, δεν είναι απαραίτητη η επαλήθευση.

2.7 Πρωτόκολλο και Έκθεση Αξιολόγησης

Το πρώτο στάδιο πριν την έναρξη της αξιολόγησης μιας μεθόδου, είναι η σύνταξη ενός πρωτοκόλλου επικύρωσης της μεθόδου. Στο πρωτόκολλο επικύρωσης της μεθόδου αναφέρονται όλες οι παράμετροι που πρόκειται να εξεταστούν και να αξιολογηθούν και ο τρόπος αξιολόγησης και ακολουθεί η έγκρισή του. Στη συνέχεια, όταν η διαδικασία αξιολόγησης της αναλυτικής

μεθόδου ολοκληρωθεί, είναι απαραίτητη η σύνταξη μιας έκθεσης στην οποία καταγράφονται αναλυτικά και αξιολογούνται όλα τα αποτελέσματα της μελέτης. Είναι προφανές ότι για να κριθεί μια αξιολόγηση επιτυχής θα πρέπει όλα τα αποτελέσματα να ικανοποιούν τα κριτήρια αποδοχής που είχαν καθοριστεί εξ αρχής.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

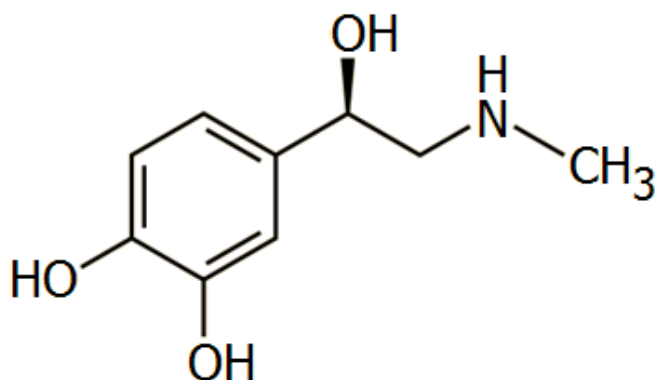
3.1 Περί αδρεναλίνης⁹

Χημικός τύπος :

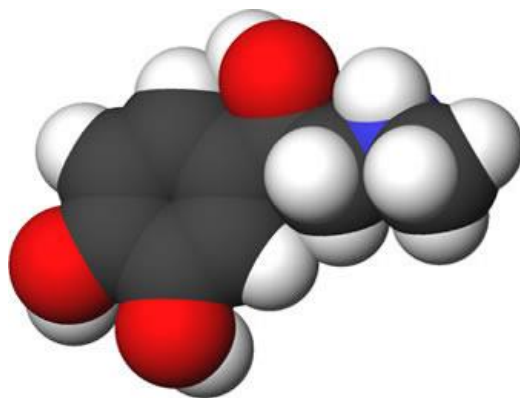
Ο χημικός τύπος της αδρεναλίνης είναι: $C_9H_{13}NO_3$ (M_r : 183,2)

4-[(1R)-υδροξυ-2-(μεθυλαμινο)αιθυλο] βενζολο-1,2-διόλη

Η δομή της αδρεναλίνης παρουσιάζεται στα δύο σχήματα που ακολουθούν σε απεικόνιση δύο και τριών διαστάσεων αντίστοιχα:



Σχήμα 3.1. Απεικόνιση μορίου αδρεναλίνης σε δυο διαστάσεις (2D).



Σχήμα 3.2. Απεικόνιση μορίου αδρεναλίνης σε τρεις διαστάσεις (3D).

3.1.1 Γενικά στοιχεία^{27,28,29}

Η αδρεναλίνη είναι σημαντική ορμόνη και νευροδιαβιβαστής που παράγεται από τη μυελώδη μοίρα των επινεφριδίων, ως απόκριση στο ερέθισμα της άσκησης ή του άγχους με την άφιξη ενός νευρικού παλμού και συντελεί στην κινητοποίηση του οργανισμού όταν εκείνος βρεθεί κάτω από μια κατάσταση έκτακτης ανάγκης. Η αδρεναλίνη μαζί με την πρόδρομη ένωση σχηματισμού της τη νοραδρεναλίνη αποτελούν τις κυριότερες ορμόνες που παράγονται στη μυελώδη μοίρα των επινεφριδίων. Και οι δύο αυτές μαζί με τη ντοπαμίνη χαρακτηρίζονται ως κατεχολαμίνες, δηλαδή παράγωγα της πυροκατεχίνης, μιας συμπαθομιμητικής αμίνης που προέρχεται από τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη και τυροσίνη.

Η αδρεναλίνη είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση του μηχανισμού διάσπασης του γλυκογόνου στο ήπαρ με παράλληλη αύξηση των επιπέδων σακχάρου στο αίμα.

Η ονομασία της αδρεναλίνης προέρχεται από τις λατινικές λέξεις: *ad* (επί) και *renes* (νεφροί). Στην επιστημονική βιβλιογραφία εκτός από τη λέξη «αδρεναλίνη» χρησιμοποιείται και η ελληνικής προέλευσης ονομασία «επινεφρίνη».

3.1.2 Ιστορική αναδρομή^{27,28,29}

Τον Μάιο του 1886, στο *New York Medical Journal* αναφέρθηκε η ανακάλυψη μιας ουσίας που παραγόταν από τα επινεφρίδια από τον William Bates. Σχεδόν μια δεκαετία αργότερα, το 1895 απομονώθηκε και αναγνωρίστηκε η επινεφρίνη από τον Πολωνό φυσιολόγο Napoleon Cybulski. Η ίδια ανακάλυψη πραγματοποιήθηκε ανεξάρτητα το 1897 από τον John Jacob Abel. Ο Ιάπωνας χημικός Jokichi Takamine, με τον βοηθό του Keizo Uenaka απομόνωσαν την ίδια ορμόνη το 1900 από αδένες βοοειδών. Το 1904 συντέθηκε τεχνητά για πρώτη φορά από τον Friedrich Stolz. Τέλος, ο χημικός της τύπος προσδιορίστηκε το 1906.

3.1.3 Θεραπευτική δράση^{27,28,29}

Η επινεφρίνη δρα, σε ποικίλο βαθμό, τόσο στους άλφα, όσο και στους βήτα αδρενεργικούς υποδοχείς. Στις συνήθεις δόσεις, οι πιο έκδηλες δράσεις της σχετίζονται με τους βήτα υποδοχείς της καρδιάς και των αγγειακών και άλλων λείων μυϊκών ινών. Σε μεγάλες δόσεις επικρατούν οι άλφα αδρενεργικές επιδράσεις. Χορηγούμενη ταχέως ενδοφλεβίως προκαλεί ταχεία άνοδο κυρίως της συστολικής αρτηριακής πίεσης, διεγείρει το μυοκάρδιο και αυξάνει τη συστατικότητα των κοιλιών, αυξάνει τον καρδιακό ρυθμό και συστέλλει τα αρτηρίδια στο δέρμα και τους βλεννογόνους.

Οι φαρμακευτικές ιδιότητες της αδρεναλίνης χρησιμοποιούνται σε περιπτώσεις ανακοπής καρδιάς και πτώσης της αρτηριακής πίεσης. Ως βρογχοδιασταλτικό χρησιμοποιείται επίσης για την αντιμετώπιση του βρογχικού άσθματος ή διάφορων αλλεργικών καταστάσεων. Ακόμα, χρησιμοποιείται σε διαλύματα αναισθητικών, για βραδύτερη απορρόφηση και μεγαλύτερη χρονικά δράση. Στην επιστήμη της οφθαλμιατρικής η αδρεναλίνη χρησιμοποιείται συχνά για τη μείωση της εσωτερικής πίεσης του οφθαλμού και στη θεραπεία του γλαυκώματος.

Υπάρχουν μερικά πιθανά αρνητικά φαινόμενα από τη λήψη της αδρεναλίνης όπως ταχυπαλμία και καρδιακή αρρυθμία, άγχος, πονοκέφαλος, αύξηση της αρτηριακής πίεσης. Επιπλέον, επειδή η αδρεναλίνη αναστέλλει την έκκριση ινσουλίνης, οι πάσχοντες από διαβήτη μπορεί να χρειαστούν επιπλέον ποσότητες ινσουλίνης.

Φυσικοχημικές ιδιότητες²⁷

Εμφάνιση: Λευκοί μικροί κρύσταλλοι

Σημείο τήξης: 211-212°C, 215°C κατά την ταχεία θέρμανση (υπό αποσύνθεση)

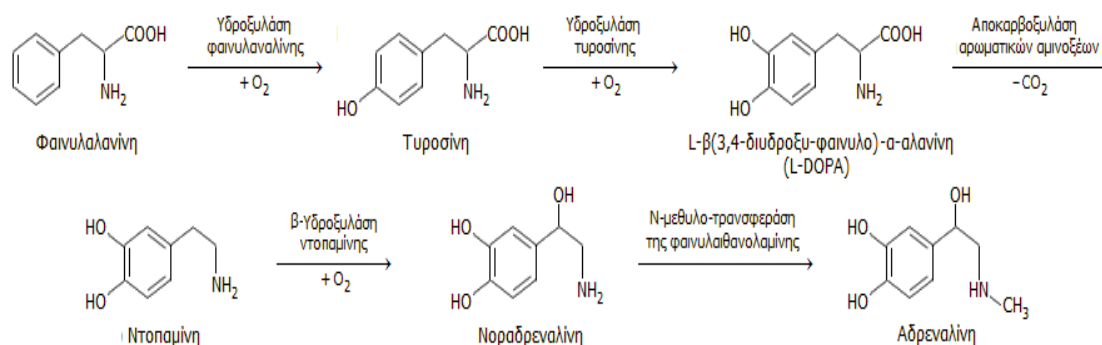
Σημείο τήξης υδροχλωρικού άλατος: 157 °C

Στροφική ικανότητα, $[\alpha]_{D25} = -50,0$ έως $-53,5^\circ$ (σε HCl 0,6 M)

pKa (ως κατιοντικό οξύ): 8,55

Ελαφρά διαλυτή στο νερό (<0,01 g/100 mL, στους 18°C), διαλυτή σε διαλύματα ισχυρών οξέων και βάσεων. Τα άλατά της (π.χ. με HCl) είναι εξαιρετικά ευδιάλυτα στο νερό.

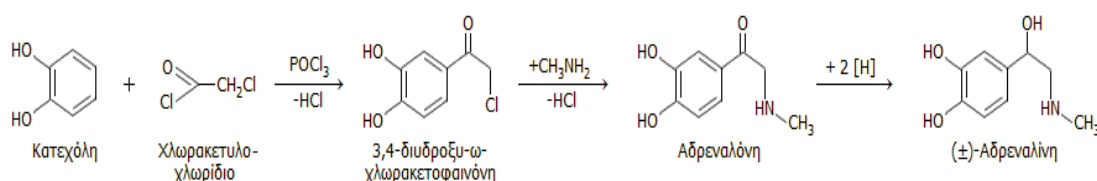
Βιοσύνθεση της αδρεναλίνης^{33,34}



Σχήμα 3.3. Βιοσύνθεση της αδρεναλίνης

Η βιοσύνθεση των κατεχολαμινών²⁸ λαμβάνει χώρα από τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη και τυροσίνη. Το τελευταίο στάδιο της, δηλαδή η μετατροπή της νοραδρεναλίνης σε αδρεναλίνη, πραγματοποιείται μόνο στον μυελό των επινεφριδίων, επειδή μόνο εκεί βρίσκεται το αντίστοιχο ένζυμο.

Χημική σύνθεση της αδρεναλίνης^{33,34}

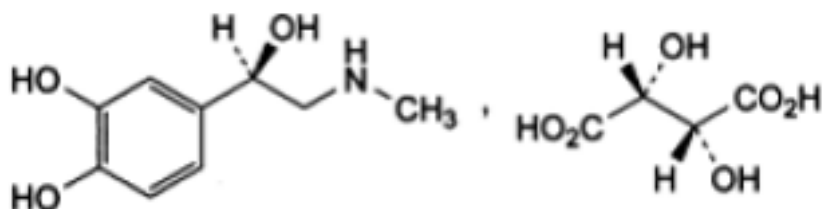


Σχήμα 3.4. Χημική σύνθεση της αδρεναλίνης

Η χημική σύνθεση της αδρεναλίνης στο εργαστήριο, όπως παρουσιάζεται στο παραπάνω σχήμα είναι αρκετά απλή. Η σύνθεση ξεκινά με την αντίδραση της κατεχόλης με χλωρακετυλοχλωρίδιο, ακολουθεί η αντίδραση του

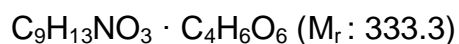
χλωρακετυλοπαραγώγου με μεθυλαμίνη και αναγωγή της παραγόμενης κετόνης για να παραχθεί αδρεναλίνη.

3.1.4 Αδρεναλίνη τρυγική (Adrenaline Tartrate)⁹



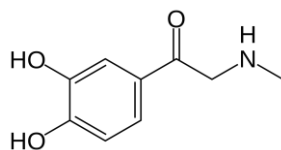
Σχήμα 3.5. Απεικόνιση μορίου Adrenaline Tartrate (2D).

Χημικός τύπος:

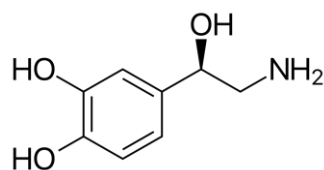


(1R) -1- (3,4-διυδροξυφαινυλ -2 - (μεθυλαμινο) υδρογονοαιθανόλη (2R, 3R) - 2,3- διυδροξυβουτανιοδιοϊκό άλας

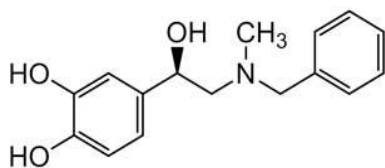
Στην συνέχεια παρουσιάζονται οι δομές των διαφόρων προσμίξεων που αναφέρονται στην ευρωπαϊκή φαρμακοποιία σχετικά με την τρυγική αδρεναλίνη.



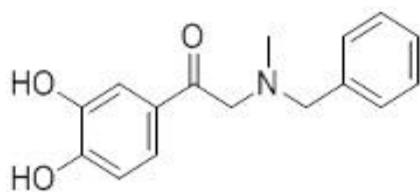
Σχήμα 3.6. Απεικόνιση μορίου 1-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-(methylamino)ethanone (adrenalone)



Σχήμα 3.7. Απεικόνιση μορίου [(1R)-2-amino-1-(3,4-dihydroxyphenyl)ethanol (noradrenaline)



Σχήμα 3.8. Απεικόνιση μορίου 4-[(1R)-2-(benzylmethylamino)-1-hydroxyethyl]benzene-1,2-diol



Σχήμα 3.9. Απεικόνιση μορίου 2-(benzyl(methyl)amino)-1-(3,4-dihydroxyphenyl)ethanone

3.2 Περί υδροχλωρικής λιδοκαΐνης^{10,30,31,35}

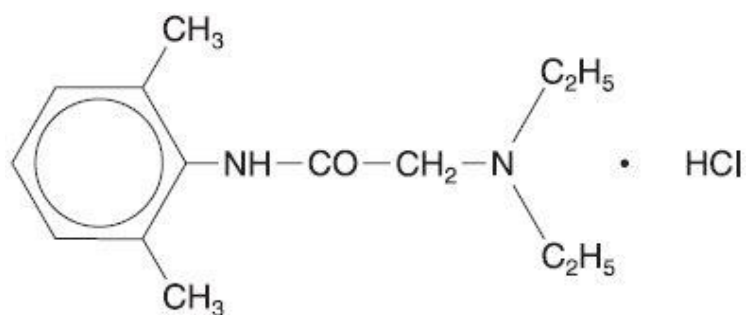
Χημικός τύπος:

Ο χημικός τύπος της λιδοκαΐνης είναι: $C_{14}H_{22}N_2O$ (M_r :234,3)

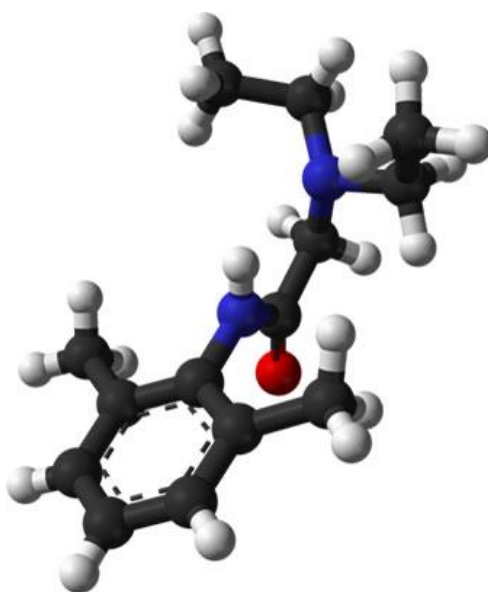
Ο χημικός τύπος της υδροχλωρικής λιδοκαΐνης είναι: $C_{14}H_{23}ClN_2O \cdot H_2O$ (M_r :288,8)

2- (διαιθυλαμινο) - *N* - (2,6-διμεθυλοφαινυλ) ακεταμίδιο, υδροχλωρικό, μονοϋδρικό

Η δομή της λιδοκαΐνης παρουσιάζεται στα δύο σχήματα που ακολουθούν σε απεικόνιση δύο και τριών διαστάσεων, αντίστοιχα:



Σχήμα 3.10. Απεικόνιση μορίου λιδοκαΐνης υδροχλωρικής σε δυο διαστάσεις (2D).



Σχήμα 3.11. Απεικόνιση μορίου λιδοκαΐνης υδροχλωρικής σε τρεις διαστάσεις (3D).

3.2.1 Γενικά στοιχεία^{30,31,35}

Η λιδοκαΐνη ανήκει στα αμινοαμιδικά τοπικά αναισθητικά, λόγω του αμιδικού δεσμού που υπάρχει στο μόριο (χαρακτηριστική τριτοταγής αμινομάδα). Χαρακτηριστικός είναι ο δι-υποκατεστημένος στις ορθο-θέσεις ως προς το άζωτο βενζολικός πυρήνας.

3.2.2 Ιστορική αναδρομή^{30,31,35}

Η λιδοκαΐνη, συντέθηκε για πρώτη φορά από τον Σουηδό χημικό Nils Löfgren το 1943. Ο συνάδελφός του Bengt Lundqvist πραγματοποίησε τα πρώτα πειράματα αναισθησίας με ένεση, ενώ πρώτη φορά διατέθηκε στην αγορά το 1949.

3.2.3 Θεραπευτική δράση^{30,31,35}

Η λιδοκαΐνη χρησιμοποιείται κυρίως ως τοπικό αναισθητικό σε χειρουργικές επεμβάσεις και ενδοσκοπήσεις (τοπική αναισθησία της εξεταζόμενης περιοχής και λίπανση της περιοχής), σε εγχειρήσεις του οφθαλμού και σε διάφορες οδοντιατρικές επεμβάσεις. Χρησιμοποιείται επίσης για την ανακούφιση του πόνου που προκαλείται από διάφορες παθήσεις, όπως για παράδειγμα φλεγμονώδεις παθήσεις του ορθού (πχ αιμορροΐδες, ραγάδες), του δέρματος, του ρινοφάρυγγα (λοιμώξεις και ερεθισμός του ρινοφάρυγγα), και του στομάχου (γαστρίτιδα).

Η λιδοκαΐνη μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την τοπική αναισθησία περιοχής όπου επρόκειτο να γίνει ένεση.

Βρίσκει εφαρμογή και ως φάρμακο για την αντιμετώπιση των κοιλιακών αρρυθμιών, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις όπου έχει προηγηθεί έμφραγμα του μυοκαρδίου. Προκαλεί αναστρέψιμο αποκλεισμό της μετάδοσης των ώσεων κατά μήκος των κεντρικών και περιφερικών νευρικών οδών. Η δράση της πιστεύεται ότι οφείλεται σε αναστολή της διόδου των ιόντων νατρίου στις κυτταρικές μεμβράνες με αποτέλεσμα επιβράδυνση της αποπόλωσης σε βαθμό που δεν αναπτύσσεται δυναμικό ενέργειας.

Η λήψη λιδοκαΐνης, πέραν του επιθυμητού αποτελέσματος, δύναται να προκαλέσει διάφορες ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως νευρική κούραση, πονοκέφαλος, υπεραίσθησία, αίσθημα ευφορίας, κα.

Φυσικοχημικές ιδιότητες^{30,31,35}

Εμφάνιση: Λευκή κρυσταλλική σκόνη

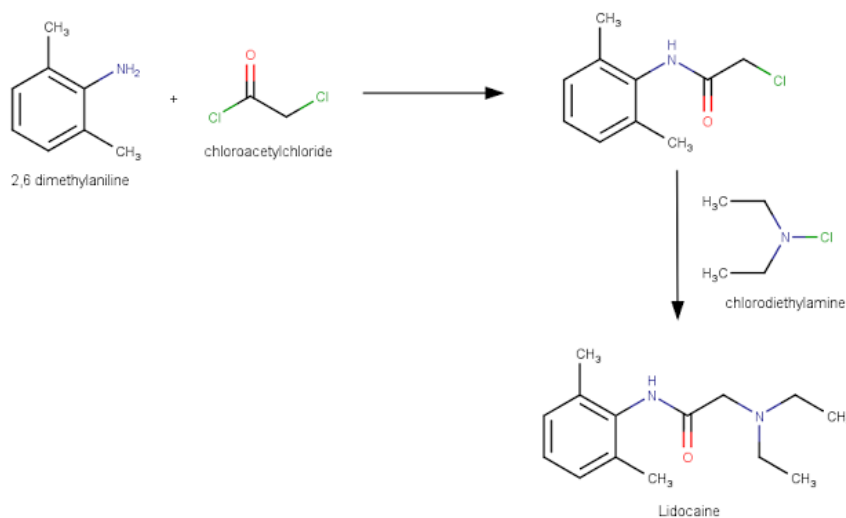
Σημείο τήξης: 67-70 °C

pKa : 7,86

Πρακτικά αδιάλυτη στο νερό, διαλυτή σε αιθανόλη και διχλωρομεθάνιο.

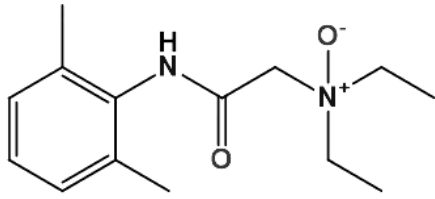
Χημική σύνθεση της λιδοκαΐνης³⁵

Η ολική σύνθεση της λιδοκαΐνης, πραγματοποιείται σε 2 στάδια. Στο πρώτο στάδιο, επιδρούμε σε 2,6 διμεθυλανιλίνη, με χλωροαιθανοϋλοχλωρίδιο. Στη συνέχεια κατά το δεύτερο στάδιο, επιδρούμε στο παράγωγο της αντίδρασης του πρώτου σταδίου με χλωροδιαιθυλαμίνη, οπότε προκύπτει η λιδοκαΐνη. Αναλυτικά η διαδικασία σύνθεσης της λιδοκαΐνης παρουσιάζεται στο διάγραμμα που ακολουθεί:

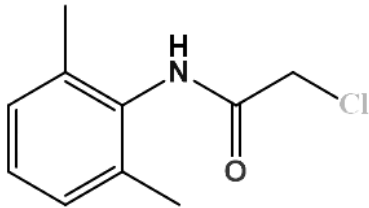


Σχήμα 3.12. Χημική σύνθεση της λιδοκαΐνης

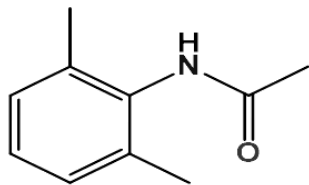
Στην συνέχεια παρουσιάζονται οι δομές των διαφόρων προσμίξεων που αναφέρονται στην ευρωπαϊκή φαρμακοποία σχετικά με την υδροχλωρική λιδοκαΐνη.



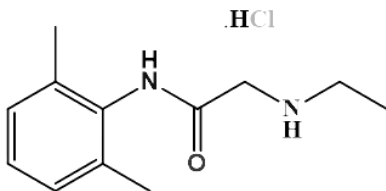
Σχήμα 3.13. Απεικόνιση μορίου Lidocaine N-Oxide (impurity B)



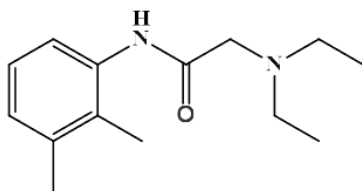
Σχήμα 3.14. Απεικόνιση μορίου 2-Chloro-N-(2,6-dimethylphenyl)acetamide (impurity H)



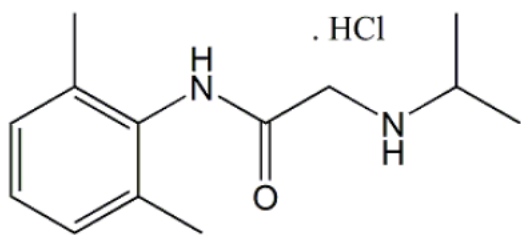
Σχήμα 3.15. Απεικόνιση μορίου N-(2,6-Dimethylphenyl)acetamide (impurity C)



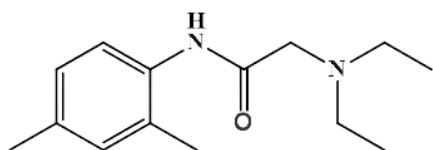
Σχήμα 3.16. Απεικόνιση μορίου N-(2,6-Dimethylphenyl)-2-(ethylamino)acetamide HCl (impurity D)



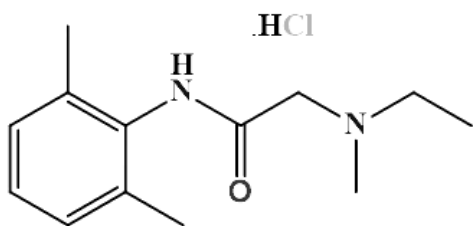
Σχήμα 3.17. Απεικόνιση μορίου 2-(Diethylamino)-N-(2,3-dimethylphenyl) acetamide (impurity F)



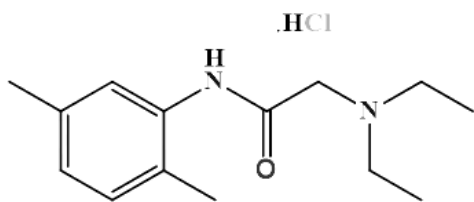
Σχήμα 3.18. Απεικόνιση μορίου N-(2,6-Dimethylphenyl)-2-[(1-methylethyl)amino]acetamide HCl (impurity G)



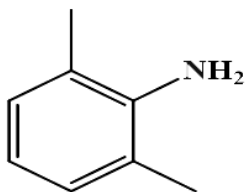
Σχήμα 3.19. Απεικόνιση μορίου 2-(Diethylamino)-N-(2,4-dimethylphenyl)acetamide (impurity I)



Σχήμα 3.20. Απεικόνιση μορίου N-(2,6-Dimethylphenyl)-2-(ethylmethylamino)acetamide (impurity K)



Σχήμα 3.21. Απεικόνιση μορίου 2-(Diethylamino)-N-(2,5-dimethylphenyl)acetamide HCl (impurity J)



Σχήμα 3.22. Απεικόνιση μορίου 2,6-Dimethylbenzenamine (impurity A)

3.3 Τοπικά αναισθητικά^{30,31}

Τα τοπικά αναισθητικά ανάλογα με τη χημική τους δομή διακρίνονται σε εστέρες του βενζοϊκού και παρα-αμινοβενζοϊκού οξέος, όπως κοκαΐνη, προκαΐνη και σε αμίδια αρωματικών οξέων, όπως λιδοκαΐνη, βουπιβακαΐνη, ροπιβακαΐνη.

Τα τοπικά αναισθητικά ταξινομούνται, επίσης, ανάλογα με τη διάρκεια δράσης, σε μικρής διάρκειας (προκαΐνη), σε μέσης (λιδοκαΐνη) και σε μεγάλης διάρκειας (βουπιβακαΐνη). Τα τοπικά αναισθητικά, εκτός της κοκαΐνης, μπορούν να δοθούν με α-αδρενεργικούς διεγέρτες, όπως κυρίως αδρεναλίνη. Με προσθήκη αδρεναλίνης παρατηρείται ότι παρατείνεται τη δράση του φαρμάκου και ελαττώνει η τοξικότητά του.

3.4 Συνδυαστική δράση αδρεναλίνης – λιδοκαΐνης^{30,31}

Με βάση τα στοιχεία που παρουσιάστηκαν παραπάνω για την αδρεναλίνη και την λιδοκαΐνη συμπεραίνουμε ότι οι δυο αυτές δραστικές ουσίες μπορούν να δράσουν συνδυαστικά. Σε πολλές περιπτώσεις ασθενείς χρειάζονται ταυτόχρονη χορήγηση αδρεναλίνης και λιδοκαΐνης στη θεραπεία τους. Μέχρι σήμερα για να το πετύχουμε αυτό έπρεπε να χρησιμοποιήσουμε δυο διαφορετικά φαρμακευτικά σκευάσματα τα οποία περιέχουν αδρεναλίνη και λιδοκαΐνη, αντίστοιχα. Όπως θα παρουσιαστεί εκτενέστερα στα επόμενα κεφάλαια πραγματοποιούνται προσπάθειες στην κατεύθυνση παρασκευής ενός φαρμακευτικού προϊόντος το οποίο θα περιέχει και τις δυο δραστικές

ουσίες στις κατάλληλες συγκεντρώσεις ώστε με τη λήψη του φαρμάκου, ο ασθενής να τις λαμβάνει ταυτόχρονα.

3.5 Τοπικά Αναισθητικά και Συνδυασμοί τους με άλλα Φάρμακα^{30,31}

Το 1905 κατασκευάστηκε από τον Einborn το πρώτο τοπικό αναισθητικό που ήταν ένας εστέρας, η προκαΐνη. Από τότε μέχρι σήμερα έχουν κάνει την εμφάνισή τους πολλά τοπικά αναισθητικά τα οποία έχουν σχεδόν κοινή μοριακή δομή (οργανικές αμίνες) και παρόμοιο τρόπο δράσης. Οι διαφορές τους εντοπίζονται κυρίως σε στοιχεία της κλινικής συμπεριφοράς τους, όπως την ταχύτητα έναρξης δράσης, την ισχύ, τη διάρκεια και την τοξικότητα.

3.5.1 Η Μοριακή δομή των Τοπικών Αναισθητικών

Ένα τυπικό μόριο τοπικού αναισθητικού αποτελείται από τρία τμήματα: α) Αρωματικό δακτύλιο (λιπόφιλο τμήμα) β) Ενδιάμεση αλυσίδα γ) Αμινική ομάδα (υδρόφιλο τμήμα).

Στην ενδιάμεση αλυσίδα, που περιλαμβάνει πάντοτε έναν εστερικό (-COO-) ή έναν αμιδικό δεσμό (-NHCO-), οφείλεται ο διαχωρισμός των τοπικών αναισθητικών σε δυο κατηγορίες, τους εστέρες και τα αμίδια.

Εστέρες: Ο εστερικός δεσμός είναι σχετικά ασταθής και τα τοπικά αναισθητικά αυτής της κατηγορίας υδρολύονται είτε βρίσκονται σε διάλυμα είτε έχουν ενεθεί στο πλάσμα. Στο πλάσμα διασπώνται από την ψευδοχολινεστεράση. Τα διαλύματα των εστέρων έχουν σχετικά σύντομη διάρκεια συντήρησης και δύσκολη αποστείρωση λόγω αποκλεισμού της χρήσης θερμότητας. Χαρακτηρίζονται από αυξημένη συχνότητα εμφάνισης αλλεργικών αντιδράσεων εξ αιτίας των μεταβολιτών τους που είναι παράγωγα του παρα-αμινοβενζοϊκού οξέος. Στους εστέρες ανήκουν η κοκαΐνη, η προκαΐνη, η τετρακαΐνη και η χλωροπροκαΐνη.

Αμίδια: Ο αμιδικός δεσμός χαρακτηρίζεται από σταθερότητα και αντοχή στην αποστείρωση με θερμότητα και στις μεταβολές του PH. Τα αμίδια δεν διασπώνται στο πλάσμα αλλά μεταβολίζονται στο ήπαρ. Σπάνια προκαλούν αλλεργικές αντιδράσεις. Στην ομάδα αυτή ανήκουν τα ευρέως

χρησιμοποιούμενα τοπικά αναισθητικά, λιδοκαΐνη και βουπιβακαΐνη αλλά και η πριλοκαΐνη, η μεπιβακαΐνη και η ετιδοκαΐνη.

3.5.2 Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των τοπικών αναισθητικών³²

Η έναρξη δράσης των τοπικών αναισθητικών εξαρτάται από την pK_a δηλαδή από τη σταθερά διάστασής τους. Σταθερά διάστασης pK_a ενός τοπικού αναισθητικού ονομάζεται η ειδική για το συγκεκριμένο τοπικό αναισθητικό συγκέντρωση ιόντων H^+ στην οποία η συγκέντρωση της αναισθητικής βάσης του $[B]$ ισούται με τη συγκέντρωση του ιονισμένου κατιόντος του $[BH^+]$. Πιο απλά, pK_a είναι το pH στο οποίο το τοπικό αναισθητικό είναι κατά 50% ιονισμένο. Σύμφωνα με την εξίσωση Henderson-Hasselbach:

$pK_a = pH - \log([B]/[BH^+])$. Η pK_a ενός τοπικού αναισθητικού καθορίζει πόσο από αυτό θα βρίσκεται σε ιονισμένη μορφή και πόσο σε μη ιονισμένη, όταν ενεθεί. Έτσι, όσο υψηλότερη είναι η τιμή της pK_a ενός τοπικού αναισθητικού, τόσο μικρότερη θα είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου που θα βρίσκεται σε μη ιονισμένη μορφή. Η λιπόφιλη μη ιονισμένη μορφή είναι αυτή που διαπερνά τη μεμβράνη του νευρώνα (η οποία αποτελείται κατά 90% από λιπίδια) και εισχωρεί στο εσωτερικό του. Συνεπώς, όσο χαμηλότερη είναι η pK_a του τοπικού αναισθητικού, τόσο ταχύτερη είναι η έναρξη δράσης του. Η σταθερά διάσταση (pK_a) της λιδοκαΐνης είναι 7,72 και όταν ενεθεί στους ιστούς που έχουν $pH=7,4$ βρίσκεται κατά 65% σε ιονισμένη μορφή και κατά ποσοστό 35% σε μη ιονισμένη. Αυτός είναι ο λόγος που έχει ταχύτερη έναρξη δράσης από τη βουπιβακαΐνη η οποία με $pK_a=8,1$ βρίσκεται κατά 80% σε ιονισμένη και κατά 20% σε μη ιονισμένη μορφή. Η λιδοκαΐνη ανήκει στις αμινοαλκυλικές ξυλιδίδες και η κλινική χρήση της χρονολογείται από το 1944. Έχει ταχεία έναρξη και μέση διάρκεια δράσης. Χρησιμοποιείται σε όλα τα είδη αναισθησίας με διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η μέγιστη επιτρεπόμενη δόση της λιδοκαΐνης καθορίστηκε στα 200 mg απλού διαλύματος και στα 500 mg διαλύματος λιδοκαΐνης που περιέχει αδρεναλίνη. Η λιδοκαΐνη μεταβολίζεται στο ήπαρ από μικτής λειτουργίας οξειδάσες και αμιδάσες των μικροσωμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζεται ο εξοπλισμός, τα βοηθητικά όργανα καθώς και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της συγκεκριμένης εργασίας.

4.1 Οργανολογία HPLC

4.1.1 Σύστημα Υγροχρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης – HPLC

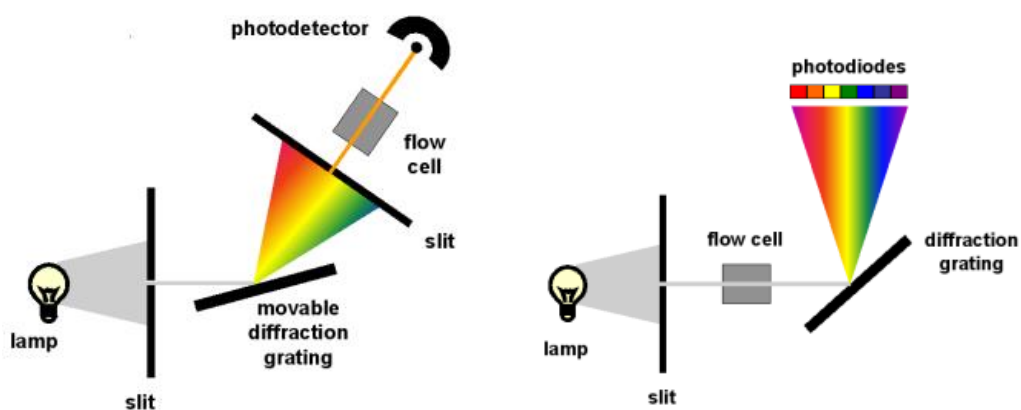
Χρησιμοποιήθηκε κυρίως ένα σύστημα της εταιρίας WATERS τύπου ALLIANCE 2690 Separations Module (Εικόνα 5), με φασματοφωτομετρικό ανιχνευτή (UV), αποτελούμενο από μέρη που περιγράφονται στη συνέχεια. Σε μικρότερη έκταση έγινε χρήση του συστήματος Infinity 1260 της εταιρίας AGILENT Technologies, αλλά και του συστήματος Prominence – i LC2030C της εταιρίας SHIMADU.



Εικόνα 5. Σύστημα Υγροχρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης – HPLC Waters Alliance 2690.

4.1.2 Ανιχνευτές

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων έγινε χρήση ανιχνευτή UV-Vis. Ο τύπος του συγκεκριμένου ανιχνευτή ήταν ο ALLIANCE 2487 Dual λ Absorbance Detector της εταιρίας WATERS με λυχνία δευτερίου. Ένας ακόμα ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο ανιχνευτής PDA τύπου ALLIANCE 2996 Photodiode Array Detector της εταιρίας WATERS, με τον οποίο έγινε δυνατή η ταυτόχρονη λήψη φασμάτων σε μεγάλο εύρος μηκών κύματος λ, με την βοήθεια της συστοιχίας φωτοδιόδων που διαθέτει. Με τον τρόπο αυτόν, πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός στο μέγιστο της απορρόφησης της κάθε ουσίας και ταυτόχρονα έγινε έλεγχος καθαρότητας κορυφών για τυχόν αλληλεπικαλύψεις μεταξύ κορυφών (Λήψη φασμάτων Purity Plot – έλεγχος Purity Angle και Purity Threshold), όπως θα παρουσιαστεί αναλυτικότερα στη συνέχεια.



Σχήμα 4.1. Σχηματική απεικόνιση λειτουργίας των ανιχνευτών UV-Vis και PDA.

4.1.3 Αντλία

Χρησιμοποιήθηκε αντλία διπλού εμβόλου, μηδενικού παλμού με ηλεκτρονική αντιστάθμιση συμπιεστότητας της εταιρίας WATERS. Είναι ειδική για αναλύσεις υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, διαθέτει υψηλή ακρίβεια και ικανοποιεί πλήρως τις απαιτήσεις αναπαραγωγιμότητας και αξιοπιστίας. Σχεδιασμένη να λειτουργεί με ταχύτητες ροής που φτάνουν ακόμα και τα 10

ml/min και πιέσεις που αγγίζουν τα 5000 psi η αντλία κρίθηκε κατάλληλη για χρήση για τις σκοπούμενες αναλύσεις.

4.1.4 Χρωματογραφικές Στήλες

Έγινε χρήση των αναλυτικών στηλών Hypersil BDS (Base Deactivated Silica, C18) των εταιριών THERMO Fisher Scientific και MZ-Analysentechnik. Οι διαστάσεις των στηλών ήταν 4,6 x 150 mm, οι οποίες φέρουν υπόστρωμα διοξειδίου του πυριτίου, με διάμετρο σωματιδίων 5 μm.

4.1.5 Ηλεκτρονικός υπολογιστής – εκτυπωτής

Η καταγραφή και η επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή OptiPlex 3020 του οίκου DELL, ο οποίος ήταν συνδεδεμένος με το υπόλοιπο σύστημα. Τα προγράμματα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Empower 2 PRO Software της εταιρίας WATERS και το Lab Solutions της εταιρίας SHIMADU. Η χρήση των προγραμμάτων αυτών μας έδωσε τη δυνατότητα να λαμβάνουμε για κάθε χρωματογράφημα πληροφορίες για το εμβαδόν και το ύψος των χρωματογραφικών κορυφών, για τον χρόνο ανάσχεσης, τη διαχωριστική ικανότητα, τον παράγοντα ασυμμετρίας και διάφορες άλλες αρκετά σημαντικές πληροφορίες. Στη συνέχεια όλα τα δεδομένα και τα χρωματογραφήματα καταγράφονταν με την βοήθεια εκτυπωτή CANON Image Runner Advance.

4.2 Αναλυτικός ζυγός

Ανάλογα με την ακρίβεια που απαιτείται σε κάθε περίπτωση έγινε χρήση διάφορων ζυγών. Συγκεκριμένα για ζύγιση με την μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια (παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων εργασίας) χρησιμοποιήθηκε ο ζυγός του οίκου Mettler, Toledo MT5, με δυνατότητα ανάγνωσης πέντε δεκαδικών ψηφίων. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο ζυγός βρίσκεται σε ειδικό διαμορφωμένο χώρο, απομονωμένο από το υπόλοιπο εργαστήριο και κάθε ζύγιση γινόταν παρουσία ξηραντικού υλικού. Για ζύγιση μεγάλων ποσοτήτων αντιδραστηρίων (παρασκευή διαλυμάτων κινητής φάσης) χρησιμοποιήθηκε ζυγός τύπου KERN PLS 2100-2 με ακρίβεια ανάγνωσης δύο δεκαδικών ψηφίων. Η

εκτύπωση των αποτελεσμάτων γινόταν με το καταγραφικό μηχάνημα LC – P45 Printer του οίκου Mettler.

4.3 Πεχάμετρο

Απαραίτητη ήταν η ρύθμιση και η μέτρηση του pH διαφόρων διαλυμάτων. Για τον λόγο αυτόν χρησιμοποιήθηκε pHμετρο (Εικόνα 6) τύπου Consort Multi-parameters analyzer C3050, το οποίο διαθέτει 3 ηλεκτρόδια υάλου που καθημερινά βαθμονομούνταν στις περιοχές [2,00-4,00], [4,00-7,00] και [7,00-10,00] αντίστοιχα, σε θερμοκρασία $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Εικόνα 6. pHμετρο τύπου Consort Multi-parameters analyzer C3050

4.4 Συσκευή παραγωγής νερού καθαρότητας HPLC

Σε όλα τα πειράματα γινόταν χρήση νερού καθαρότητας HPLC, το οποίο λαμβανόταν από ειδική συσκευή παραγωγής νερού υψηλής καθαρότητας Aquamax Ultra 370 Series της εταιρίας YoungLin. Η τροφοδοσία της συσκευής γινόταν με νερό PW (Purified Water) που στη συνέχεια περνούσε μέσα από φίλτρα και παραλαμβάνονταν από τον αναλυτή.

4.5 Σύστημα διήθησης – σύστημα απαέρωσης

Είναι γνωστό ότι η ύπαρξη διαλυμένου αέρα, καθώς και τυχόν σωματιδίων στην κινητή φάση είναι πολύ πιθανόν να δημιουργήσουν διάφορα προβλήματα στον χρωματογράφο. Για να αποφευχθούν τέτοιου είδους προβλήματα έγινε χρήση διάταξης διήθησης υπό κενό με φίλτρα Durapore membrane $0,45\text{ }\mu\text{m HV}$ της εταιρίας Millipore.

4.6 Λουτρό υπερήχων

Κατά την παρασκευή ορισμένων διαλυμάτων κρίθηκε αναγκαίο για την διευκόλυνση της διαλυτοποίησης των ουσιών η χρήση λουτρού υπερήχων τύπου BEK.

4.7 Κλίβανοι ξήρανσης

Σε ορισμένα πειράματα ανθεκτικότητας της μεθόδου, δείγματα τοποθετήθηκαν σε κλίβανο ξήρανσης για χρονικό διάστημα κάποιων ωρών έως αρκετών ημερών. Ο κλίβανος που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρίας Memmert.

4.8 Διαλύτες

Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, συγκεκριμένα:

Ακετονιτρίλιο (ACN) καθαρότητας HPLC της εταιρίας Baker

Μεθανόλη (MeOH) καθαρότητας HPLC της εταιρίας Baker

προσφορά της εταιρίας DEMO S.A

4.9 Αντιδραστήρια - Πρότυπα

Για την παρασκευή των διαλυμάτων υδροχλωρικής λιδοκαΐνης χρησιμοποιήθηκε πιστοποιημένο πρότυπο αναφοράς (CRS) το οποίο αγοράστηκε από την ευρωπαϊκή φαρμακοποιία και ήταν καθαρότητας 93,5%. Για τα αντίστοιχα διαλύματα αδρεναλίνης χρησιμοποιήθηκε δευτερογενές πρότυπο τρυγικής αδρεναλίνης σε μορφή σκόνης, προσφορά της εταιρίας DEMO S.A, καθαρότητας 99,4%. Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε, περιείχε tetra methyl ammonium hydrogen sulfate, καθώς και sodium heptane sulfonate της εταιρίας Merck. Τόσο τα δείγματα των φαρμάκων που εξετάστηκαν, όσο και οι πρώτες ύλες και τα έκδοχα για την παρασκευή λευκών δειγμάτων χορηγήθηκαν από την εταιρία DEMO S.A.

Επίσης τα αντιδραστήρια, Υδροξείδιο του Νατρίου (Sodium hydroxide) της εταιρίας Merck και Δινάτριο EDTA (Disodium edetate) της εταιρίας Merck ήταν προσφορά της εταιρίας DEMO S.A.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Ανάπτυξη μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό δυο (2) δραστικών ουσιών – αδρεναλίνης και λιδοκαΐνης – σε φαρμακευτικά σκευάσματα

5.1 Εισαγωγή

Στην ευρωπαϊκή και την αμερικάνικη φαρμακοποιία υπάρχουν αναφορές για τον προσδιορισμό της αδρεναλίνης⁹ σε διάφορα φαρμακευτικά σκευάσματα που περιέχουν αδρεναλίνη καθώς και αναφορές για τον προσδιορισμό της λιδοκαΐνης¹⁰ σε διάφορα φαρμακευτικά σκευάσματα που περιέχουν λιδοκαΐνη. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη και επικύρωση μιας νέας αναλυτικής μεθόδου ταυτόχρονου ποσοτικού προσδιορισμού δυο (2) δραστικών ουσιών, της αδρεναλίνης (Adrenaline Tartrate) και της λιδοκαΐνης (Lidocaine HCl), σε φαρμακευτικά σκευάσματα αδρεναλίνης / λιδοκαΐνης:

- i. Lidocaine 1% w/v and Adrenaline (1:200,000) Injection
- ii. Lidocaine 2% w/v and Adrenaline (1:200,000) Injection
- iii. Lidocaine 1% w/v and Adrenaline (1:100,000) Injection

5.2 Επιλογή κινητής φάσης

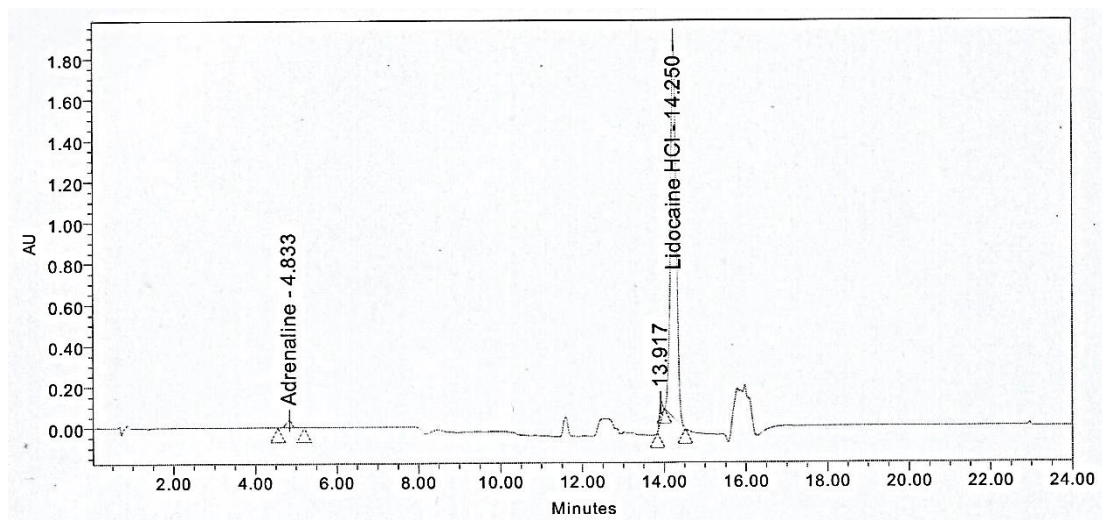
Αρχικά ακολουθήθηκε ισοκρατική έκλουση για τον προσδιορισμό της αδρεναλίνης και της λιδοκαΐνης με χρήση στήλης Thermo Hypersil BDS C18 με διαστάσεις 125 mm x 4,6 mm, 5 μm. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα 950 ml νερού και 50 ml μεθανόλης με προσθήκη 4,0 g όξινου θειικού τετραβουτυλαμμωνίου (tetrabutylammonium hydrogen sulfate), 1,1 g επτανοσουλφονικού νατρίου (sodium heptane sulfonate) και 2,0 ml δινάτριου EDTA και ακολούθησε ρύθμιση του pH του διαλύματος στο 3,5 με την χρήση διαλύματος NaOH. (βλ. τα δυο πρώτα βήματα στους παρακάτω πίνακες). Αποτέλεσμα αυτής της προσπάθειας ήταν η πολύ μεγάλη διαφορά στους χρόνους έκλουσης των δυο κορυφών αφού η κορυφή της λιδοκαΐνης

εμφανίστηκε μετά από πάρα πολύ χρόνο. Έτσι στραφήκαμε στη λύση ενός συστήματος βαθμιδωτής έκλουσης (Gradient Elusion) δύο διαλυτών. Χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer Solution) – η διαδικασία παρασκευής του οποίου περιγράφεται στην συνέχεια - και μεθανόλη. Κρατήθηκε ανέπαφη η ισοκρατική έκλουση όπως περιγράφεται για την αδρεναλίνη και οι προσπάθειές επικεντρώθηκαν σε αλλαγές του μίγματος διαλυτών (μετά την έκλουση της αδρεναλίνης) για τη γρηγορότερη έκλουση της λιδοκαΐνης. Χρειάστηκαν αρκετές δοκιμές, αλλάζοντας κάθε φορά το μίγμα των διαλυτών, τον χρόνο της κάθε βαθμίδωσης, αλλά και την ταχύτητα ροής, έως ότου να καταλήξουμε σε ένα επιθυμητό αποτέλεσμα. Μερικές από τις προσπάθειες αυτές φαίνονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 1. Αρχική προσπάθεια επιλογής προγράμματος βαθμιδωτής έκλουσης.

	Χρόνος (min)	Ροή Κινητής Φάσης (mL/min)	%A (MeOH)	%C (P.Δ/μα)
1	0,01	2,0	0,0	100,0
2	6,90	2,0	0,0	100,0
3	7,00	2,0	15,8	84,2
4	11,00	2,0	35,0	65,0
5	14,60	2,0	35,0	65,0
6	14,70	2,5	80,0	20,0
7	15,20	2,5	80,0	20,0
8	15,30	2,5	0,0	100,0
9	23,00	2,5	0,0	100,0
10	23,10	2,0	0,0	100,0
11	24,00	2,0	0,0	100,0

Αφού καταλήξαμε ότι θα ξεκινήσουμε τις προσπάθειες με τα δεδομένα που παραπάνω πίνακα, με τη βοήθεια της HPLC λάβαμε το χρωματογράφημα που ακολουθεί.



	Name	RT	Area	Height	USP Resolution
1	Adrenaline	4.833	381555	36701	
2		13.917	450877	89727	44.1
3	Lidocaine HCl	14.250	17717838	1845113	1.7

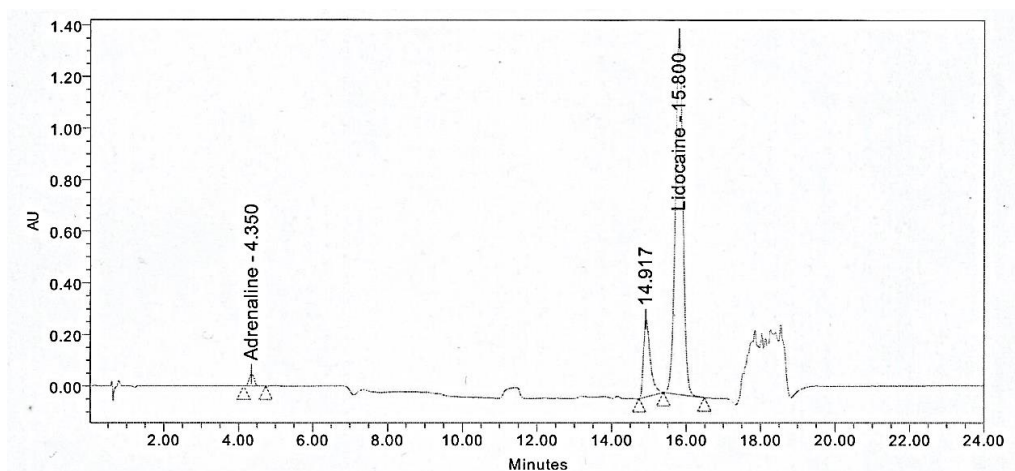
Σχήμα 5.1. Χρωματογράφημα που πάρθηκε μετά την αρχική προσπάθεια

Έγινε χρήση της στήλης Thermo Hypersil BDS C18 με διαστάσεις 125 mm x 4,6 mm, 5 μm. Όπως φαίνεται από το σχήμα 5.1, δεν είναι επαρκής ο διαχωρισμός της κορυφής της λιδοκαΐνης και της κορυφής με χρόνο έκλουσης RT = 13,917 min. Απόδειξη αυτού αποτελεί η χαμηλή τιμή του Resolution των δυο κορυφών που ισούται με 1,7. Συνεχίσαμε λοιπόν τις δοκιμές για να πετύχουμε καλύτερους διαχωρισμούς μεταξύ των κορυφών .

Πίνακας 2Α. Βελτιώση προγράμματος βαθμιδωτής έκλουσης.

	Χρόνος (min)	Ροή Κινητής Φάσης (mL/min)	%A (MeOH)	%C (P.Δ/μα)
1	0,01	2,0	0,0	100,0
2	6,90	2,0	0,0	100,0
3	7,00	2,0	15,8	84,2
4	11,00	2,0	40,0	60,0
5	15,00	2,0	40,0	60,0
6	15,10	2,0	80,0	20,0
7	15,30	2,5	80,0	20,0
8	15,80	2,5	80,0	20,0
9	15,90	2,5	0,0	100,0
10	23,50	2,5	0,0	100,0
11	23,60	2,0	0,0	100,0
12	24,00	2,0	0,0	100,0

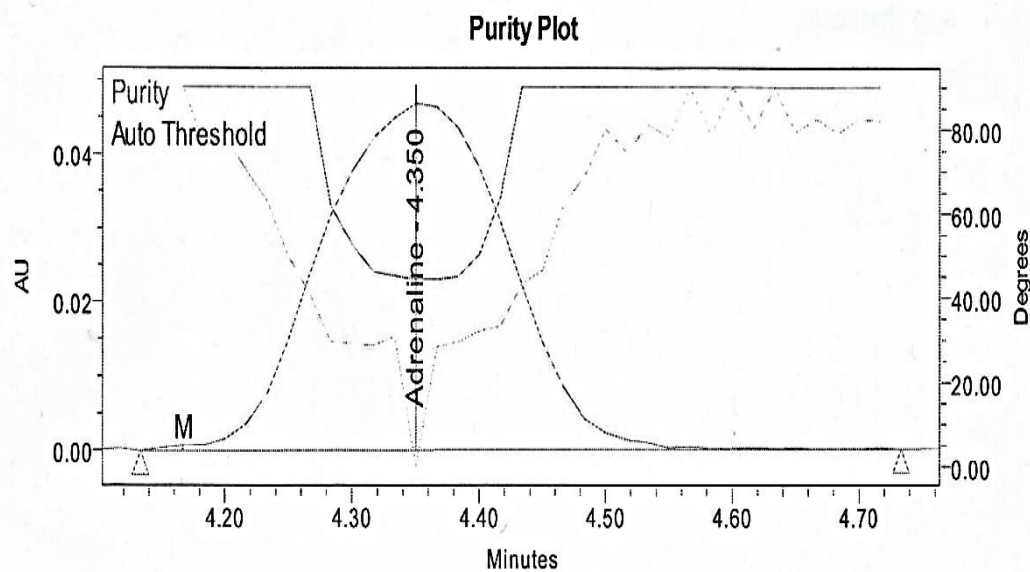
Σε αυτήν την προσπάθεια, επετεύχθη καλύτερος διαχωρισμός, όπως φαίνεται και παρακάτω, το Resolution βρέθηκε ίσο με 2,5. Συνεχίσαμε την μελέτη μας και αυτήν την φορά κάναμε χρήση ανιχνευτή PDA για να διαπιστωθεί αν οι κορυφές είναι καθαρές.



	Name	RT	Area	Height	USP Resolution
1	Adrenaline	4.350	471881	46852	
2		14.917	3778705	302646	36.3
3	Lidocaine	15.800	19737696	1380740	2.5

Σχήμα 5.2. Χρωματογράφημα που λήφθηκε μετά την τροποποίηση του προγράμματος βαθμιδωτής έκλουσης.

Σημειώνεται ότι για να είναι οι κορυφές καθαρές θα πρέπει στο Purity Plot που λαμβάνεται από τον ανιχνευτή PDA, η τιμή του Purity Angle να είναι μεγαλύτερη από την τιμή του Purity Threshold. Σε αυτήν την περίπτωση λοιπόν όπως φαίνεται και παρακάτω, δεν είχαμε καθαρές κορυφές αφού η τιμή του Purity Angle βρέθηκε μικρότερη από εκείνη του Purity Threshold.



PA: 48.369 TH: 90.000

Σχήμα 5.3. Χρωματογράφημα που λήφθηκε από τον ανιχνευτή PDA με το «Purity Plot» να καταδεικνύει ότι δεν ικανοποιείται το κριτήριο καθαρότητας των κορυφών.

Με διάφορες αλλαγές στο προφίλ του χρόνου, τη σύσταση του μίγματος των διαλυτών και την ροή της κινητής φάσης, όπως φαίνεται στους πίνακες 2Α, 2Β και 2Γ και ταυτόχρονο έλεγχο κάθε φορά του διαχωρισμού αλλά και της καθαρότητας των κορυφών μέσω ανιχνευτή PDA έγινε προσπάθεια να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες.

Πίνακας 2Β. Βελτιώση προγράμματος βαθμιδωτής έκλουσης.

	Χρόνος (min)	Ροή Κινητής Φάσης (mL/min)	%A (MeOH)	%C (P.Δ/μα)
1	0,01	2,0	0,0	100,0
2	6,90	2,0	0,0	100,0
3	7,00	2,0	15,8	84,2
4	11,00	2,0	30,0	70,0
5	15,00	2,0	30,0	70,0
6	15,10	2,0	80,0	20,0
7	15,30	2,5	80,0	20,0
8	15,80	2,5	80,0	20,0
9	15,90	2,5	0,0	100,0
10	23,50	2,5	0,0	100,0
11	23,60	2,0	0,0	100,0
12	24,00	2,0	0,0	100,0

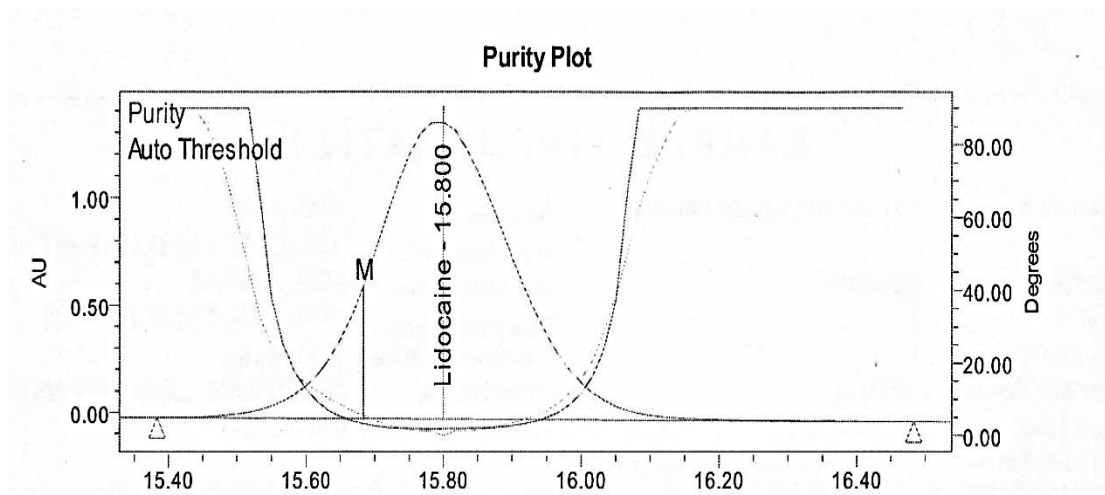
Πίνακας 2Γ. Βελτιώση προγράμματος βαθμιδωτής έκλουσης

	Χρόνος (min)	Ροή Κινητής Φάσης (mL/min)	%A (MeOH)	%C (P.Δ/μα)
1	0,01	2,0	0,0	100,0
2	6,90	2,0	0,0	100,0
3	7,00	2,0	15,8	84,2
4	11,00	2,0	30,0	70,0
5	16,00	2,0	30,0	70,0
6	16,20	2,0	80,0	20,0
7	16,50	2,5	80,0	20,0
8	16,60	2,5	80,0	20,0
9	17,50	2,5	0,0	100,0
10	23,60	2,5	0,0	100,0
11	23,70	2,0	0,0	100,0
12	24,00	2,0	0,0	100,0

Τελικά μετά από αρκετές ακόμα προσπάθειες, βρέθηκε το μίγμα διαλυτών, η κατάλληλη ροή και ο χρόνος ανάλυσης, ώστε να επιτευχθεί υψηλή καθαρότητα και καλός διαχωρισμός μεταξύ των κορυφών.

Πίνακας 3. Τελικό βέλτιστο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης.

	Χρόνος (min)	Ροή Κινητής Φάσης (mL/min)	%A (MeOH)	%C (P.Δ/μα)
1	0,01	2,0	0,0	100,0
2	5,90	2,0	0,0	100,0
3	6,00	2,0	15,8	84,2
4	11,00	2,0	30,0	70,0
5	16,20	2,0	30,0	70,0
6	16,50	2,0	60,0	40,0
7	16,60	2,0	90,0	10,0
8	16,70	2,5	90,0	10,0
9	23,00	2,5	90,0	10,0
10	23,10	2,5	0,0	100,0
11	29,70	2,5	0,0	100,0
12	29,80	2,0	0,0	100,0
13	30,00	2,0	0,0	100,0



PA: 4.241 TH: 3.625

Σχήμα 5.4. Χρωματογράφημα που λάβαμε από τον PDA ανιχνευτή με το Purity Plot να καταδεικνύει ότι ικανοποιείται το κριτήριο καθαρότητας των κορυφών.

5.3 Επιλογή στήλης

Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως στο εδάφιο 4.1.4 έγινε χρήση της στήλης Thermo Hypersil BDS C18 με διαστάσεις 125 mm x 4,6 mm, 5 μm. Μεταξύ των ημερών των αναλύσεων η στήλη φυλασσόταν σε μείγμα διαλυτών νερού / μεθανόλης με αναλογία 80:20. Ακόμα σημειώνεται ότι για την προστασία της στήλης χρησιμοποιήθηκαν προσθήκες οι οποίες φυλάσσονταν και αυτές σε μείγμα διαλυτών νερού / μεθανόλης με αναλογία 80:20.

5.4 Επιλογή άλλων παραμέτρων

Σε ότι αφορά το μήκος κύματος του ανιχνευτή και την θερμοκρασία στήλης, χρησιμοποιήθηκαν πληροφορίες από την ευρωπαϊκή φαρμακοποιία.

Συγκεκριμένα, αναφέρονται $\lambda_{\max} = 210\text{nm}$ και 230nm για την αδρεναλίνη και την λιδοκαΐνη αντίστοιχα. Για τις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν επιλέχθηκε μήκος κύματος 205 nm. Σχετικά με την θερμοκρασία, επιλέχθηκε θερμοκρασία στήλης στους $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ και θερμοκρασία δειγματολήπτη στους $10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, οι οποίες ρυθμίζονταν κάθε φορά από το πρόγραμμα του οργάνου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Επικύρωση μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό δραστικών ουσιών – αδρεναλίνης και λιδοκαΐνης – σε φαρμακευτικά σκευάσματα

6.1 Χρωματογραφικές συνθήκες

Στήλη : Thermo Hypersil BDS C18 με διαστάσεις 125 mm x 4,6mm, 5 μm

Ρυθμιστικό διάλυμα : Σε μίγμα 950 ml νερού και 50 ml μεθανόλης διαλύθηκαν 4,0 g όξινο θειικό τετραβουτυλαμμώνιο (tetrabutylammonium hydrogen sulfate), 1,1 g επτανοσουλφονικό νάτριο (sodium heptane sulfonate) και 2,0 ml δινάτριο EDTA και ακολούθησε ρύθμιση του pH του διαλύματος στο 3,5 με την χρήση διαλύματος NaOH.

Κινητή φάση A (mobile phase A): Ρυθμιστικό διάλυμα

Κινητή φάση B (mobile phase B): Μεθανόλη

Ροή κινητής φάσης : 2,0 ml/min και 2,5 ml/min

Ανιχνευτής : UV με μήκος κύματος 205 nm

Όγκος ένεσης : 20 μl

Θερμοκρασία στήλης : 25°C ± 1°C

Θερμοκρασία δειγματολήπτη : 10 °C ± 1 °C

Χρόνος ανάλυσης : 30 min

Μηχανισμός : Κατανομή ιοντικών ζευγών. Τα επτανοσουλφονικά ιόντα σχηματίζουν λιπόφιλα ιοντικά ζεύγη τα οποία συγκρατούνται από τη στήλη.

6.2 Διαλύματα εργασίας

Πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης αδρεναλίνης: Διαλύθηκαν 10,0 mg αδρεναλίνης τρυγικής σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml με διάλυμα μεθανόλης / ρυθμιστικού διαλύματος σε αναλογία 50%-50%. ($C_{adr} = 0,20 \text{ mg/mL}$).

Πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης λιδοκαΐνης : Διαλύθηκαν 10,7 mg υδροχλωρικής λιδοκαΐνης σε ογκομετρική φιάλη των 20 ml με διάλυμα μεθανόλης / ρυθμιστικού διαλύματος σε αναλογία 50%-50%. ($C_{lid} = 0,54 \text{ mg/mL}$).

Πρότυπο διάλυμα λιδοκαΐνης – αδρεναλίνης: Μεταφέρονται 0,250 ml πρότυπου διαλύματος παρακαταθήκης αδρεναλίνης σε ογκομετρική φιάλη των 5 ml και πραγματοποιείται αραιώση με το πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης λιδοκαΐνης υδροχλωρικής.

Διάλυμα ελέγχου αδρεναλίνης : Μεταφέρεται 1,0 ml δείγματος Lidocaine 1% w/v and Adrenaline (1:100,000) Injection, σε ογκομετρική φιάλη των 2 ml και αραιώνεται με διάλυμα μεθανόλης / ρυθμιστικού διαλύματος σε αναλογία 50%-50%.

Διάλυμα ελέγχου λιδοκαΐνης (test solution for lidocaine): μεταφέρεται 1,0 ml δείγματος Lidocaine 1% w/v and Adrenaline (1:100,000) Injection, σε ογκομετρική φιάλη των 20 ml και αραιώνεται με διάλυμα μεθανόλης / ρυθμιστικού διαλύματος σε αναλογία 50%-50%.

6.3 Υπολογισμοί

- Η συγκέντρωση της αδρεναλίνης υπολογίζεται με βάση τον τύπο:

$$C_{\text{adrenaline}} \text{ (mg/ml)} = \frac{Ru_1}{Rs_1} \times C_{1\text{std}} \times a_1 \times \frac{MW_{\text{adrenaline}}}{MW_{\text{adrenaline acid tartrate}}} \times \frac{10}{5}$$

Και η % περιεκτικότητα σε αδρεναλίνη δίνεται από την σχέση:

$$\%Content = \frac{Adrenaline}{10.00} \times 100$$

Όπου,

Ru_1 : το εμβαδόν της κορυφής της αδρεναλίνης από το χρωματογράφημα διαλύματος ελέγχου.

Rs_1 : το εμβαδόν της κορυφής της αδρεναλίνης από το χρωματογράφημα του προτύπου διαλύματος αδρεναλίνης.

$C_{\text{std}1}$: Η συγκέντρωση της αδρεναλίνης στο πρότυπο διάλυμα.

a_1 : Η περιεκτικότητα του προτύπου αδρεναλίνης (99,4%).

MW Adrenaline Acid Tartrate : 333,29

MW Adrenaline Tartrate : 183,21

- Η συγκέντρωση της υδροχλωρικής λιδοκαΐνης υπολογίζεται με βάση τον τύπο:

$$C_{\text{lidocaine}} \text{ (mg/ml)} = \frac{Ru_2}{Rs_2} \times C_{2\text{std}} \times a_2 \times \frac{MW_{\text{lidocaine HCl}}}{MW_{\text{lidocaine HCl anhydrous}}} \times 20$$

Και η % περιεκτικότητα σε λιδοκαΐνη δίνεται από την σχέση:

$$\%Content = \frac{Lidocaine}{10.70} \times 100$$

Όπου,

R_{u2} : το εμβαδόν της κορυφής της λιδοκαΐνης από το χρωματογράφημα του διαλύματος ελέγχου.

R_{s2} : το εμβαδόν της κορυφής της λιδοκαΐνης από το χρωματογράφημα του προτύπου διαλύματος λιδοκαΐνης.

C_{std2} : Η συγκέντρωση της λιδοκαΐνης στο πρότυπο διάλυμα.

a_2 : Η περιεκτικότητα του προτύπου υδροχλωρικής λιδοκαΐνης (93,5%)

MW Lidocaine HCl άνυδρη : 270,80

MW Lidocaine HCl μονοϋδρική: 288,81

6.4 Κριτήρια αποδοχής

Τα κριτήρια που πρέπει να ικανοποιούνται ώστε η μέθοδος που εφαρμόζεται να είναι αξιόπιστη και αποδεκτή είναι:

Καταλληλότητα συστήματος

Η διαχωριστική ικανότητα ανάμεσα στην κορυφή της λιδοκαΐνης και της γειτονικής, σε αυτή, κορυφής πρέπει να είναι μεγαλύτερο του δυο.

Η σχετική τυπική απόκλιση για 6 επαναλήψεις του προτύπου διαλύματος να μην υπερβαίνει το 2%.

Ειδικότητα μεθόδου

Είναι απαραίτητο να μην προκύπτουν αλληλεπιδράσεις με της υπό εξέταση ουσίας στο διάλυμα δείγματος placebo.

Ορθότητα μεθόδου

Η ανάκτηση των δυο δραστικών ουσιών σε ενισχυμένα δείγματα placebo πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 99,0% και 101,0%.

Πιστότητα μεθόδου

Η σχετική τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων του ποσοτικού προσδιορισμού των δυο δραστικών ουσιών δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 2% (%RSD_r επαναληψιμότητας).

Η σχετική τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων του ποσοτικού προσδιορισμού των δυο δραστικών ουσιών για τρεις διαφορετικούς αναλυτές δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 2% (%RSD_{i,p} ενδιάμεσης πιστότητας).

Η σχετική τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων του ποσοτικού προσδιορισμού των δυο δραστικών ουσιών για αναλύσεις που θα πραγματοποιηθούν σε τρεις διαφορετικές ημέρες από τον ίδιο αναλυτή δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 2% (%RSD_{i,p} ενδιάμεσης πιστότητας).

Γραμμικότητα μεθόδου

Απαραίτητη προϋπόθεση ο συντελεστής συσχέτισης να είναι \geq του 0,993.

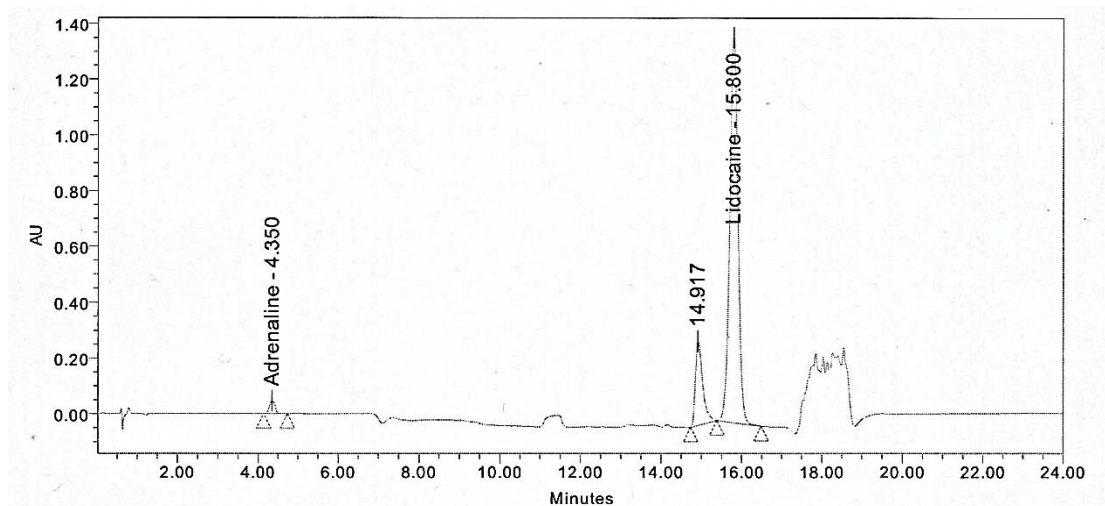
Ανθεκτικότητα μεθόδου

Η διαφορά στα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού των δυο δραστικών ουσιών για διάφορες σκοπούμενες μεταβολές στις πειραματικές συνθήκες που θα εφαρμοστούν δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 2%.

6.5 Αποτελέσματα

6.5.1 Καταλληλότητα συστήματος

Σε όλα τα υπό εξέταση διαλύματα η διαχωριστική ικανότητα μεταξύ της κορυφής της λιδοκαΐνης και της γειτονικής της κορυφής ήταν \geq 2. (Σχήμα 6.1)



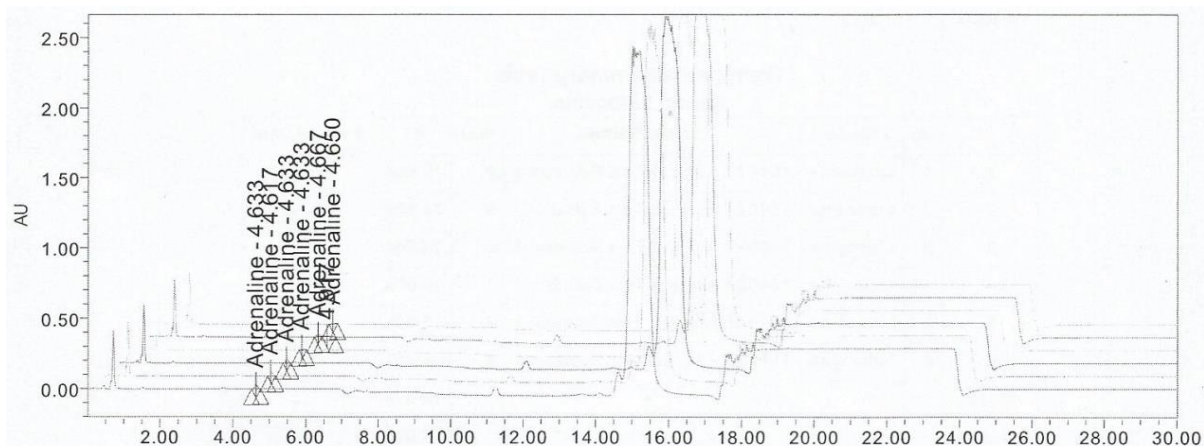
	Name	RT	Area	Height	USP Resolution
1	Adrenaline	4.350	471881	46852	
2		14.917	3778705	302646	36.3
3	Lidocaine	15.800	19737696	1380740	2.5

Σχήμα 6.1. Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος εργασίας όπου φαίνεται η διαχωριστική ικανότητα μεταξύ της κορυφής της λιδοκαΐνης και της γειτονικής της κορυφής.

Η λιδοκαΐνη εκλούεται σε χρόνο 15,8 min και η αδρεναλίνη εκλούεται σε χρόνο 4,35 min όπως φαίνεται στο Σχήμα 6.1.

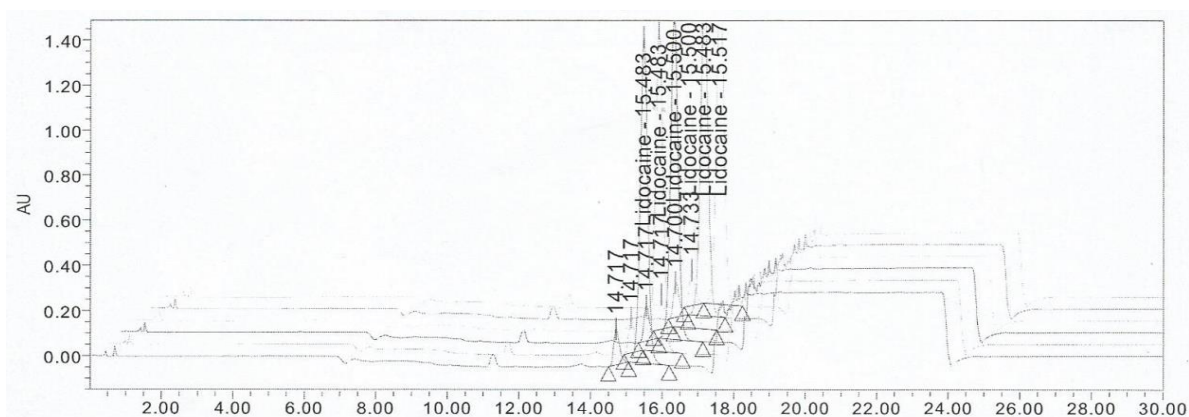
Όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενο εδάφιο, πραγματοποιήθηκαν αρκετές τροποποιήσεις στο σύστημα βαθμιδωτής έκλουσης δύο διαλυτών ώστε να επιτευχθεί τελικά η διαχωριστική ικανότητα μεταξύ της κορυφής της λιδοκαΐνης και της γειτονικής της κορυφής να είναι μεγαλύτερη από δυο.

Η σχετική τυπική απόκλιση για έξι επαναλήψεις διαλυμάτων εργασίας, όπως φαίνεται και στα παρακάτω σχήματα / πίνακες δεν υπερβαίνει το 2%, τόσο για το εμβαδόν της κορυφής της αδρεναλίνη (%RSD = 1,5) όσο και για το εμβαδόν της κορυφής της λιδοκαΐνης (%RSD = 0,2). Τέλος, σχετικά με τον χρόνο έκλουσης της κάθε κορυφής παρατηρείται ότι το %RSD είναι 0,3 και για τις δυο δραστικές ουσίες.



	Sample Name	Inj	RT	Area	Height	Amount	Units
1	151029 Adr_Lid Test Solution 1	1	4.850	209923	14447	0.00456	mg/ml
2	151029 Adr_Lid Test Solution 1	2	4.833	205602	14120	0.00447	mg/ml
3	151029 Adr_Lid Test Solution 1	3	4.817	212247	14371	0.00461	mg/ml
4	151029 Adr_Lid Test Solution 1	4	4.833	212393	14429	0.00462	mg/ml
5	151029 Adr_Lid Test Solution 1	5	4.833	212558	14315	0.00462	mg/ml
6	151029 Adr_Lid Test Solution 1	6	4.817	214996	14412	0.00467	mg/ml
Mean			4.831	211286.638	14349.225		
Std. Dev.			0.013	3215.379	121.697		
% RSD			0.3	1.5	0.8		

Σχήμα 6.2. Επαναληψιμότητα μετρήσεων της αδρεναλίνης στο διάλυμα εργασίας



	Sample Name	Inj	RT	Area	Height	Amount	Units
1	151029 Adr_Lid Test Solution 2	1	15.417	21857130	1420889	0.55490	mg/ml
2	151029 Adr_Lid Test Solution 2	2	15.433	21956108	1424072	0.55741	mg/ml
3	151029 Adr_Lid Test Solution 2	3	15.450	22000726	1417045	0.55854	mg/ml
4	151029 Adr_Lid Test Solution 2	4	15.483	21944697	1400143	0.55712	mg/ml
5	151029 Adr_Lid Test Solution 2	5	15.517	21929884	1378769	0.55675	mg/ml
6	151029 Adr_Lid Test Solution 2	6	15.550	22006109	1375977	0.55868	mg/ml
Mean			15.475	21949109.108	1402815.775		
Std. Dev.			0.051	54427.202	21385.309		
% RSD			0.3	0.2	1.5		

Σχήμα 6.3. Επαναληψιμότητα μετρήσεων της λιδοκαΐνης στο διάλυμα εργασίας

Η ίδια διαδικασία ελέγχου επαναληψιμότητας ακολουθήθηκε και για τα πρότυπα διαλύματα.

	Sample Name	Inj	RT	Area	Height	Amount	Units
1	151029 Adr_Lid Std Solution	1	4.467	464363	45935	0.01009	mg/ml
2	151029 Adr_Lid Std Solution	2	4.433	461563	45732	0.01009	mg/ml
3	151029 Adr_Lid Std Solution	3	4.417	465116	45911	0.01009	mg/ml
4	151029 Adr_Lid Std Solution	4	4.417	461548	46140	0.01009	mg/ml
5	151029 Adr_Lid Std Solution	5	4.400	469072	46442	0.01009	mg/ml
Mean			4.427	464332.612	46032.052		
Std. Dev.			0.025	3102.346	271.315		
% RSD			0.6	0.7	0.6		

Σχήμα 6.4. Επαναληψιμότητα μετρήσεων της αδρεναλίνης στο πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 0,010 mg/ml.

	Sample Name	Inj	RT	Area	Height	Amount	Units
1	151029 Adr_Lid Std Solution	1	15.450	19854233	1290941	0.50402	mg/ml
2	151029 Adr_Lid Std Solution	2	15.417	19800109	1301370	0.50402	mg/ml
3	151029 Adr_Lid Std Solution	3	15.400	19762355	1299264	0.50402	mg/ml
4	151029 Adr_Lid Std Solution	4	15.383	19916953	1311712	0.50402	mg/ml
5	151029 Adr_Lid Std Solution	5	15.383	19932067	1309001	0.50402	mg/ml
Mean			15.407	19853143.510	1302457.638		
Std. Dev.			0.028	73070.159	8253.281		
% RSD			0.2	0.4	0.6		

Σχήμα 6.5. Επαναληψιμότητα μετρήσεων της λιδοκαΐνης στο πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 0,504 mg/ml.

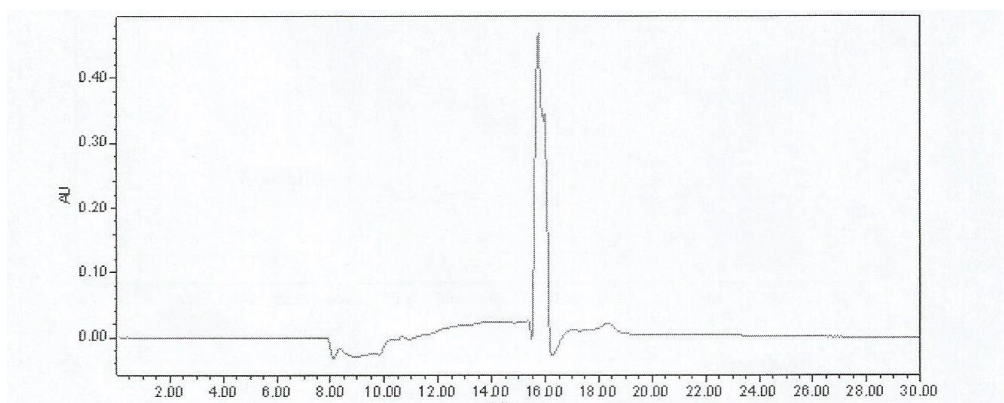
Και στην περίπτωση των πρότυπων διαλυμάτων η σχετική τυπική απόκλιση για πέντε επαναλήψεις δεν υπερβαίνει το 2%, τόσο για το εμβαδόν της κορυφής της αδρεναλίνης (%RSD = 0,7), όσο και για το εμβαδόν της κορυφής της λιδοκαΐνης (%RSD = 0,4). Τέλος, σχετικά με τον χρόνο έκλουσης της κάθε κορυφής παρατηρείται ότι το %RSD είναι 0,6 και 0,2, αντίστοιχα.

6.5.2 Ειδικότητα μεθόδου

Με στόχο να αξιολογηθεί η ειδικότητα της μεθόδου εισήχθη στο χρωματογραφικό σύστημα λευκό διάλυμα διαλύτη αραίωσης.

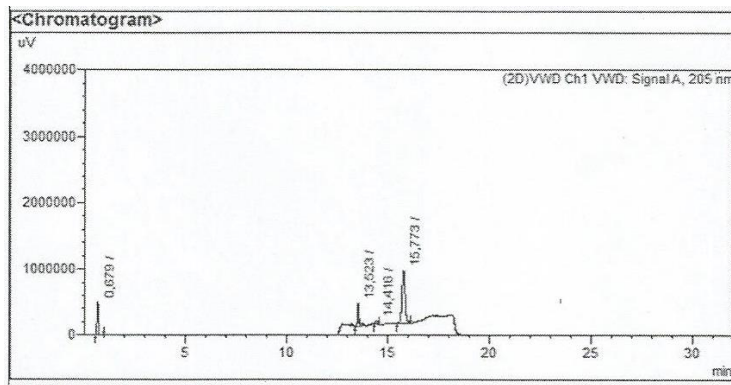
Παρασκευάστηκαν επίσης διαλύματα placebo τα οποία περιείχαν έκδοχα μεταδιθειώδες νάτριο και χλωριούχο νάτριο καθώς και αδρεναλίνη και λιδοκαΐνη.

Τα χρωματογραφήματα που πάρθηκαν σε κάθε περίπτωση φαίνονται στα σχήματα 6.6α – 6.6δ χωρίς καμία ανεπιθύμητη αλληλεπίδραση. Παρασκευάστηκαν διαλύματα placebo που δεν περιείχαν καμία δραστική ουσία βάσει των αραιώσεων της αδρεναλίνης και αντίστοιχα βάσει των αραιώσεων της λιδοκαΐνης, ενώ στη συνέχεια παρασκευάστηκαν placebo διαλύματα που περιείχαν λιδοκαΐνη βάσει της αραιώσεως της αδρεναλίνης και placebo διαλύματα που περιείχαν αδρεναλίνη βάσει της αραιώσεως της λιδοκαΐνης.

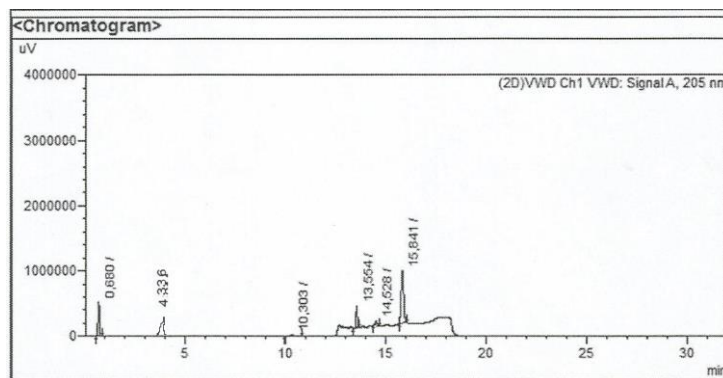


Σχήμα 6.6α : Χρωματογράφημα λευκού διαλύματος (διαλύτης αραίωσης).

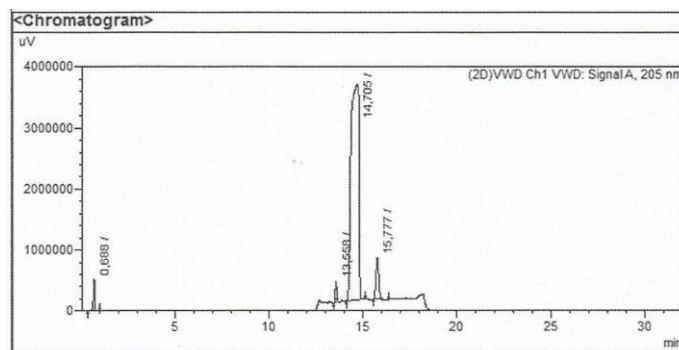
Όπως φαίνεται στο χρωματογράφημα του σχήματος 6.6α, παρατηρήθηκε μια κορυφή (με μικρό εμβαδόν) στα 16,5 min περίπου, η οποία οφείλεται στην αλλαγή του μίγματος διαλυτών λόγω του προγράμματος βαθμιδωτής έκλουσης.



Σχήμα 6.6β : Χρωματογράφημα placebo διαλύματος που περιέχει έκδοχα μεταδιθειώδες νάτριο και NaCl.



Σχήμα 6.6γ : Χρωματογράφημα placebo διαλύματος που περιέχει αδρεναλίνη και έκδοχα μεταδιθειώδες νάτριο και NaCl.



Σχήμα 6.6δ : Χρωματογράφημα placebo διαλύματος που περιέχει λιδοκαΐνη και έκδοχα μεταδιθειώδες νάτριο και NaCl.

Η κορυφή που εμφανίζεται στα 4,5 min στο σχήμα 6.6γ οφείλεται στην αδρεναλίνη, ενώ η κορυφή που εμφανίζεται στα 14,7 min στο σχήμα 6.6δ οφείλεται στην λιδοκαΐνη.

6.5.3 Ορθότητα

Παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα σε placebo εργασίας αδρεναλίνης (α-γ) και λιδοκαΐνης (δ-ζ) και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση κάθε διαλύματος 3 φορές από τον ίδιο αναλυτή. Έγινε χρήση της μέσης τιμής για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης τόσο της αδρεναλίνης, όσο και της λιδοκαΐνης σε κάθε διάλυμα. Η ορθότητα υπολογίστηκε με βάση την % ανάκτησης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους πίνακες 4 και 5.

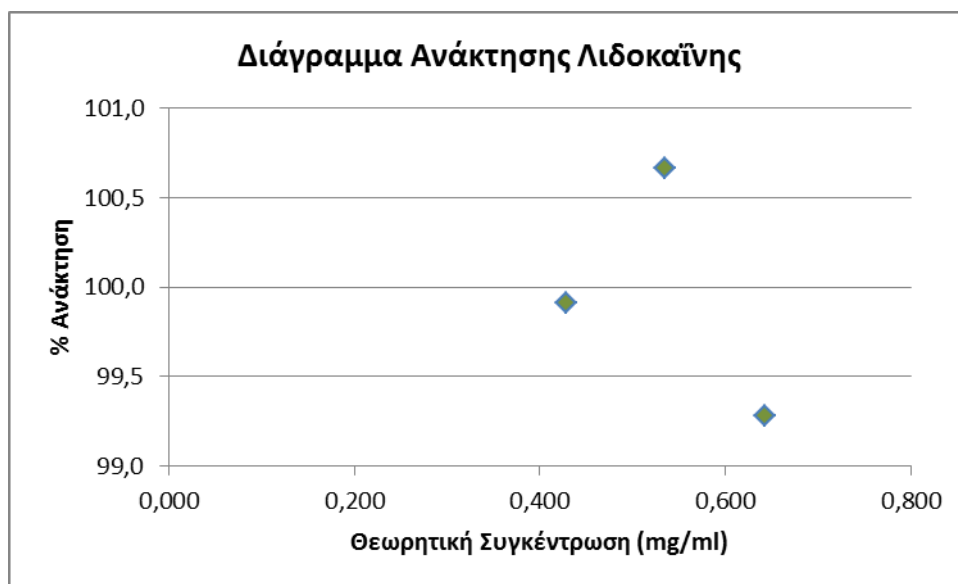
Πίνακας 4. Έλεγχος ορθότητας της μεθόδου για τις διάφορες συγκεντρώσεις της αδρεναλίνης

Διάλυμα εργασίας (θεωρητική τιμή µg/ml)	Συγκέντρωση Αδρεναλίνης (µg/ml)	Μέση τιμή (µg/ml)	SD	Ανάκτηση (%)
α (4,000)	4,0304	3,9827	±0,042	99,6
	3,9529			
	3,9648			
β (5,000)	5,0020	5,0390	±0,049	100,8
	5,0206			
	5,0945			
γ (6,000)	6,1032	6,0269	±0,12	100,4
	6,0863			
	5,8913			

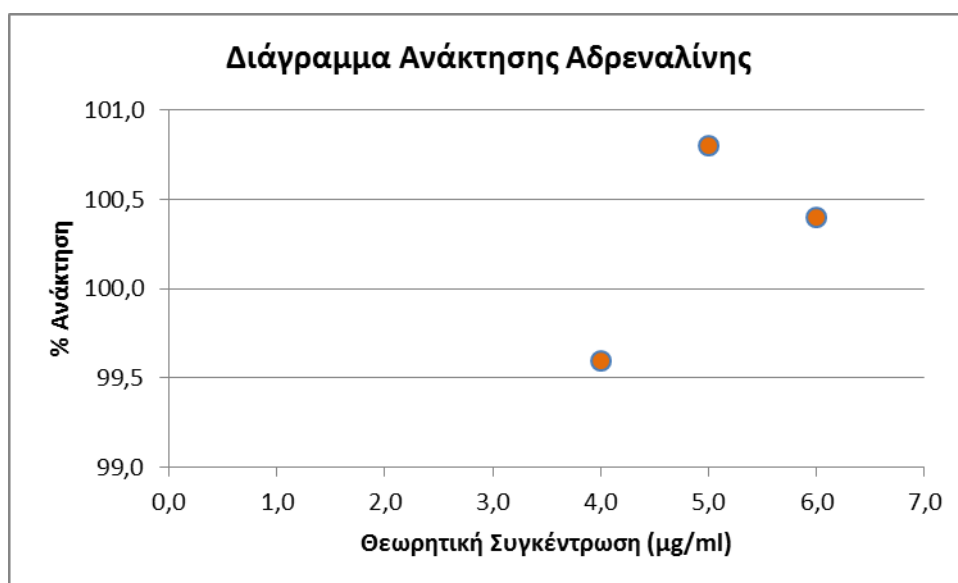
Πίνακας 5. Έλεγχος ορθότητας της μεθόδου για τις διάφορες συγκεντρώσεις της λιδοκαΐνης

Διάλυμα εργασίας (θεωρητική τιμή mg/ml)	Συγκέντρωση Λιδοκαΐνης (mg/ml)	Μέση τιμή (mg/ml)	SD	Ανάκτηση (%)
δ (0,428)	0,4310	0,4308	±0,0002	99,9
	0,4309			
	0,4306			
ε (0,535)	0,5352	0,5345	±0,0007	100,7
	0,5345			
	0,5338			
ζ (0,642)	0,6401	0,6374	±0,0026	99,3
	0,6350			
	0,6370			

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα δημιουργήθηκαν τα διαγράμματα % ανάκτησης των δυο δραστικών ουσιών συναρτήσει της θεωρητικής συγκέντρωσης των πρότυπων διαλυμάτων.



Σχήμα 6.7: Διάγραμμα % ανάκτησης λιδοκαΐνης ως προς την θεωρητική συγκέντρωση των ενισχυμένων δειγμάτων.



Σχήμα 6.8: Διάγραμμα % ανάκτησης αδρεναλίνης ως προς την θεωρητική συγκέντρωση των ενισχυμένων δειγμάτων.

Όπως διαπιστώθηκε, η ορθότητα της μεθόδου κυμαίνεται εντός των αποδεκτών ορίων ανάκτησης 99,0% - 101,0%.

6.5.4 Γραμμικότητα - Εύρος

Παρασκευάστηκαν πέντε (5) διαλύματα εργασίας αδρεναλίνης (SA1-SA5) και πέντε (5) διαλύματα εργασίας λιδοκαΐνης (SL1 – SL5) διαφόρων συγκεντρώσεων και αναλύθηκαν από τον ίδιο αναλυτή. Η γραμμικότητα υπολογίστηκε με τη βοήθεια της μέσης τιμής των εμβαδών των κορυφών της αδρεναλίνης και της λιδοκαΐνης αντίστοιχα σε καθένα από τα διαλύματα εργασίας καθώς και της θεωρητικής συγκέντρωσης αυτών, στα διαλύματα εργασίας.

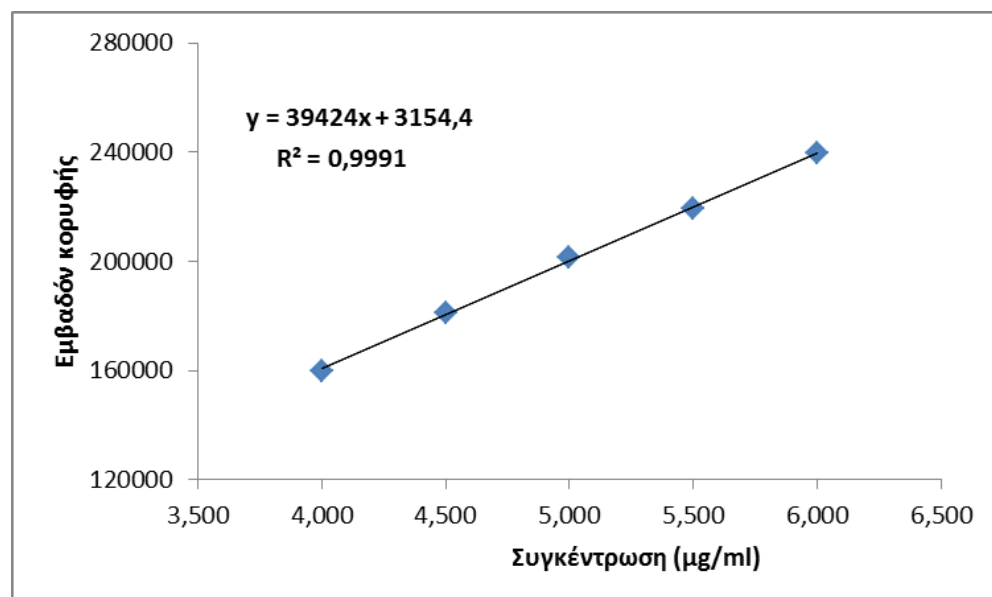
Πίνακας 6. Αποτελέσματα γραμμικότητας και εύρους μεθόδου κατόπιν εξέτασης διαλυμάτων εργασίας αδρεναλίνης

Διάλυμα εργασίας Αδρεναλίνης	Επίπεδο εργασίας $\mu\text{g/ml}$	Μέση τιμή εμβαδού κορυφής ($\pm\text{SD}$) (N=3)	Πραγματική Συγκέντρωση $\mu\text{g/ml}$
SA1	4,00	159961 (± 467)	4,0184
SA2	4,50	181180 (± 868)	4,5207
SA3	5,00	201549 (± 1193)	5,0230
SA4	5,50	219121 (± 147)	5,5253
SA5	6,00	239549 (± 1247)	6,0276

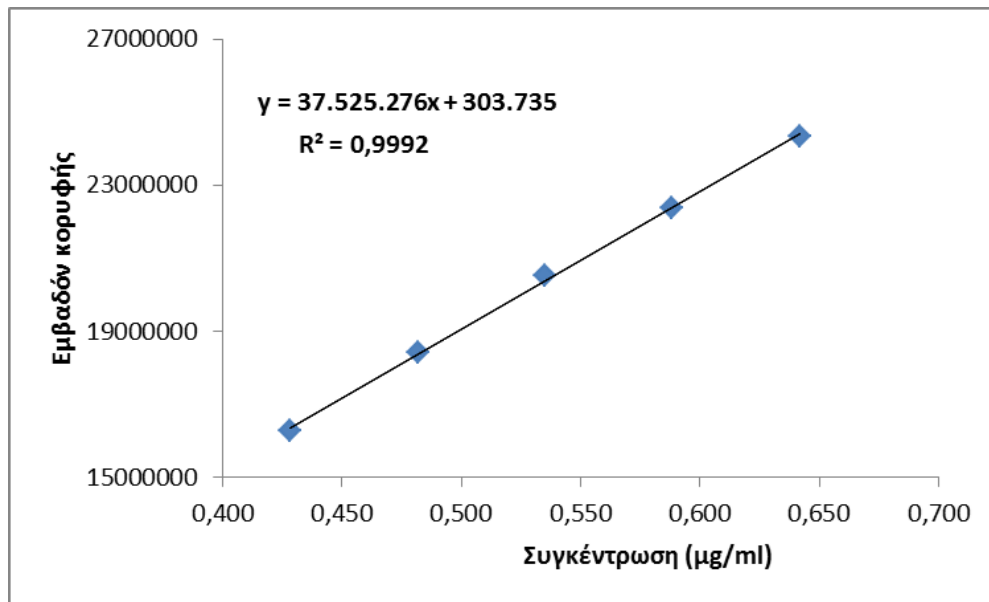
Πίνακας 7. Αποτελέσματα γραμμικότητας και εύρους μεθόδου κατόπιν εξέτασης διαλυμάτων εργασίας λιδοκαΐνης

Διάλυμα εργασίας Λιδοκαΐνης	Επίπεδο εργασίας $\mu\text{g/ml}$	Μέση τιμή εμβαδού κορυφής ($\pm\text{SD}$) (N=3)	Πραγματική Συγκέντρωση mg/ml
SL1	0,4280	16282586 (± 11683)	0,42802
SL2	0,4820	18404388 (± 34267)	0,48153
SL3	0,5350	20528470 (± 4691)	0,53503
SL4	0,5880	22358852 (± 22288)	0,58853
SL5	0,6420	24324494 (± 25368)	0,64204

Με βάση τα δεδομένα των παραπάνω πινάκων σχεδιάστηκαν τα παρακάτω διαγράμματα χρησιμοποιώντας τη μέθοδο παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων.



Σχήμα 6.9. Γραμμικότητα μεθόδου – Διάγραμμα εμβαδού κορυφής της Αδρεναλίνης σε συνάρτηση της συγκέντρωσης.



Σχήμα 6.10. Γραμμικότητα μεθόδου – Διάγραμμα εμβαδού κορυφής της Λιδοκαΐνης σε συνάρτηση της συγκέντρωσης

Από το Σχήμα 6.9 που αφορά την αδρεναλίνη, διαπιστώνεται ότι η γραφική παράσταση είναι μια ευθεία γραμμή με εύρος συγκεντρώσεων 4,02 - 6,03 μg/ml, με συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 0,991$ και εξίσωση παλινδρόμησης $y = 39424x + 3154,4$. Ομοίως από το Σχήμα 6.11 που αφορά τη λιδοκαΐνη προκύπτει ότι η γραφική παράσταση είναι μια ευθεία γραμμή με εύρος συγκεντρώσεων 0,428 – 0,642 mg/ml, με συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 0,9992$ και εξίσωση παλινδρόμησης $y = 37.525.276x + 303.735$. Κριτήριο αποδοχής είχε ορισθεί ο συντελεστής συσχέτισης R^2 (correlation coefficient) να είναι μεγαλύτερος από την τιμή 0,9930 γεγονός που επιβεβαιώθηκε τόσο για την αδρεναλίνη ($R^2 = 0,9991$) όσο και για την λιδοκαΐνη ($R^2 = 0,9992$).

6.5.5. Ανθεκτικότητα

Πραγματοποιήθηκε μελέτη ανθεκτικότητας της μεθόδου εξετάζοντας την επίδραση διαφόρων παραμέτρων στο τελικό αναλυτικό αποτέλεσμα. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση 4 παραμέτρων στον προσδιορισμό αδρεναλίνης / λιδοκαΐνης, όπως φαίνεται παρακάτω:

Συνθήκη 1: Επίδραση θερμοκρασίας στήλης

Συνθήκη 1.1 : Η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 30 °C αντί για τους 25 °C.

Συνθήκη 2: Επίδραση του όγκου έγχυσης

Συνθήκη 2.1 : Στη χρωματογραφική στήλη εγχύθηκαν 30 μ L δείγματος αντί για 20 μ L δείγματος.

Συνθήκη 2.2 : Στη χρωματογραφική στήλη εγχύθηκαν 10 μ L δείγματος αντί για 20 μ L δείγματος.

Συνθήκη 3 : Επίδραση του μήκους κύματος λειτουργίας του ανιχνευτή

Συνθήκη 3.1 : Το μήκος κύματος λειτουργίας του ανιχνευτή ρυθμίστηκε στα 200 nm αντί 205 nm.

Συνθήκη 3.2 : Το μήκος κύματος λειτουργίας του ανιχνευτή ρυθμίστηκε στα 210 nm αντί 205 nm.

Συνθήκη 4 : Επίδραση στήλης

Συνθήκη 4.1 : Χρήση στήλης ίδιας μάρκας, διαφορετικής παρτίδας.

Συνθήκη 4.2 : Χρήση στήλης διαφορετικής μάρκας.

Πίνακας 8. Συνθήκη 1 - Επίδραση θερμοκρασίας στήλης (έλεγχος αδρεναλίνης)

Εφαρμοζόμενη Θερμοκρασία Στήλης	Εμβαδόν κορυφής αδρεναλίνης στο διάλυμα ελέγχου	C _{adrenaline} διαλύματος ελέγχου (μg/ml)	Μέση τιμή συγκέντρωσης αδρεναλίνης στο διάλυμα ελέγχου	%RSD
25 °C	212247	5,041	5,045 ± 0,004	0,07
	212393	5,045		
	212558	5,049		
30 °C	175049	4,931	4,960 ± 0,055	1,11
	174832	4,925		
	178321	5,023		
Συνολικά			5,002 ± 0,058	1,16

Πίνακας 9. Συνθήκη 1 - Επίδραση θερμοκρασίας στήλης (έλεγχος λιδοκαΐνης)

Εφαρμοζόμενη Θερμοκρασία Στήλης	Εμβαδόν κορυφής λιδοκαΐνης στο διάλυμα ελέγχου	C _{lidocaine} διαλύματος ελέγχου (mg/ml)	Μέση τιμή συγκέντρωσης λιδοκαΐνης στο διάλυμα ελέγχου	%RSD
25 °C	22000726	11,139	11,118 ± 0,019	0,17
	21944697	11,111		
	21929884	11,104		
30 °C	22000726	11,052	11,050 ± 0,002	0,02
	21944697	11,048		
	21929884	11,051		
Συνολικά			11,084 ± 0,039	0,35

Σημειώνεται ότι λόγω αδυναμίας του οργάνου, το οποίο δεν ήταν σε θέση να ψύξει τον χώρο της στήλης σε θερμοκρασία μικρότερη των 25 °C, δεν έγινε δυνατή η πραγματοποίηση μετρήσεων σε θερμοκρασία στήλης 20 °C. Για τον λόγο αυτόν έγινε αλλαγή μόνο στους +5 °C από την αρχική συνθήκη.

Πίνακας 10. Συνθήκη 2 - Επίδραση όγκου έγχυσης (έλεγχος αδρεναλίνης)

Όγκος έγχυσης	Εμβαδόν κορυφής αδρεναλίνης στο διάλυμα ελέγχου	C _{adrenaline} διαλύματος ελέγχου (µg/ml)	Μέση τιμή συγκέντρωσης αδρεναλίνης στο διάλυμα ελέγχου	%RSD
20 µL	212247	5,041	5,045 ± 0,004	0,07
	212393	5,045		
	212558	5,049		
30 µL	266042	5,008	4,984 ± 0,021	0,42
	264141	4,973		
	264061	4,971		
Συνολικά			5,015 ± 0,036	0,71

Πίνακας 11. Συνθήκη 2 - Επίδραση όγκου έγχυσης (έλεγχος λιδοκαΐνης)

Όγκος έγχυσης	Εμβαδόν κορυφής λιδοκαΐνης στο διάλυμα ελέγχου	C _{lidocaine} διαλύματος ελέγχου (mg/ml)	Μέση τιμή συγκέντρωσης λιδοκαΐνης στο διάλυμα ελέγχου	%RSD
20 µL	22000726	11,139	11,118 ± 0,019	0,17
	21944697	11,111		
	21929884	11,104		
30 µL	31846999	10,945	10,960 ± 0,013	0,12
	31902923	10,964		
	31919323	10,970		
Συνολικά			11,039 ± 0,088	0,80

Σημειώνεται ότι έγινε προσπάθεια να γίνουν μετρήσεις και με ρύθμιση του όγκου έγχυσης στα 10 µL, αλλά τόσο η μορφή των κορυφών της αδρεναλίνης όσο και των αντίστοιχων της λιδοκαΐνης στα χρωματογραφήματα που πάρθηκαν δεν ήταν η αναμενόμενη. Εξαιτίας αυτού του γεγονότος υπάρχουν δεδομένα μόνο για όγκο έγχυσης μόνο 10 µL περισσότερα από την αρχική συνθήκη.

Πίνακας 12. Συνθήκη 3 - Επίδραση μήκους κύματος ανιχνευτή (έλεγχος αδρεναλίνης)

Μήκος κύματος ανιχνευτή	Εμβαδόν κορυφής αδρεναλίνης στο διάλυμα ελέγχου	C _{adrenaline} διαλύματος ελέγχου (µg/ml)	Μέση τιμή συγκέντρωσης αδρεναλίνης στο διάλυμα ελέγχου	%RSD
205 nm	212247	5,041	5,045 ± 0,004	0,07
	212393	5,045		
	212558	5,049		
200 nm	327280	4,995	4,947 ± 0,043	0,87
	323251	4,934		
	321813	4,912		
210 nm	71109	5,027	5,033 ± 0,009	0,18
	71124	5,028		
	71332	5,043		
Συνολικά			5,008 ± 0,051	1,02

Πίνακας 13. Συνθήκη 3 - Επίδραση μήκους κύματος ανιχνευτή (έλεγχος λιδοκαΐνης)

Μήκος κύματος ανιχνευτή	Εμβαδόν κορυφής λιδοκαΐνης στο διάλυμα ελέγχου	C _{lidocaine} διαλύματος ελέγχου (µg/ml)	Μέση τιμή συγκέντρωσης λιδοκαΐνης στο διάλυμα ελέγχου	%RSD
205 nm	22000726	11,139	11,118 ± 0,019	0,17
	21944697	11,111		
	21929884	11,104		
200 nm	26356289	10,867	10,867 ± 0,004	0,04
	26344398	10,863		
	26364529	10,871		
210 nm	16148481	10,987	10,994 ± 0,020	0,19
	16193586	11,017		
	16135792	10,978		
Συνολικά			10,993 ± 0,110	1,00

Πίνακας 14. Συνθήκη 4 - Επίδραση μάρκας στήλης (έλεγχος αδρεναλίνης)

Μάρκα και Κωδικός Στήλης	Εμβαδόν κορυφής αδρεναλίνης στο διάλυμα ελέγχου	C _{adrenaline} διαλύματος ελέγχου (μg/ml)	Μέση τιμή συγκέντρωσης αδρεναλίνης στο διάλυμα ελέγχου	%RSD
Thermo 41019701	212247	5,041	5,045 ± 0,004	0,07
	212393	5,045		
	212558	5,049		
Thermo 41013908	177935	4,932	4,986 ± 0,060	1,19
	182197	5,050		
	179588	4,977		
MZ 40810507	191166	4,898	4,877 ± 0,019	0,39
	189708	4,861		
	190207	4,873		
Συνολικά			4,970 ± 0,080	1,61

Πίνακας 15. Συνθήκη 4 - Επίδραση μάρκας στήλης (έλεγχος λιδοκαΐνης)

Μάρκα και Κωδικός Στήλης	Εμβαδόν κορυφής λιδοκαΐνης στο διάλυμα ελέγχου	C _{lidocaine} διαλύματος ελέγχου (μg/ml)	Μέση τιμή συγκέντρωσης λιδοκαΐνης στο διάλυμα ελέγχου	%RSD
Thermo 41019701	22000726	11,139	11,118 ± 0,019	0,17
	21944697	11,111		
	21929884	11,104		
Thermo 41013908	22085077	10,984	10,989 ± 0,007	0,06
	22109742	10,997		
	22087665	10,986		
MZ 40810507	22190130	10,918	10,993 ± 0,013	0,12
	22236921	10,941		
	22231200	10,939		
Συνολικά			11,013 ± 0,083	0,75

Αξίζει να σημειωθεί ότι δοκιμάστηκε η παρασκευή κινητής φάσης χρησιμοποιώντας 1,0 g και 1,2 g επτανοσουλφονικού νατρίου αντί 1,1 g της αρχικής συνθήκης. Και στις δυο περιπτώσεις τα %RSD που λάβαμε ήταν μικρότερα του 2%. Ένα σημαντικό αποτέλεσμα που μπορέσαμε να εξάγουμε από τις δοκιμές ανθεκτικότητας με τις εφαρμοζόμενες 4 συνθήκες είναι ότι η

σχετική τυπική απόκλιση (%RSD), των μετρήσεων για κάθε συνθήκη ήταν μικρότερη του 2% και για τις δυο δραστικές ουσίες.

Επίσης η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) όλων των μετρήσεων και των τεσσάρων συνθηκών μαζί, δεν ξεπερνάει το 2% όπως φαίνεται και στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 16. Συγκεντρωτικός πίνακα ελέγχου αδρεναλίνης για τις συνθήκες 1-4

Συνθήκη	Μέση τιμή συγκέντρωσης αδρεναλίνης στο διάλυμα ελέγχου	%RSD
Αρχική Συνθήκη	5,045 ± 0,004	0,07
Συνθήκη 1.1	4,960 ± 0,055	1,11
Συνθήκη 2.1	4,984 ± 0,021	0,42
Συνθήκη 3.1	4,947 ± 0,043	0,87
Συνθήκη 3.2	5,033 ± 0,009	0,18
Συνθήκη 4.1	4,986 ± 0,060	1,19
Συνθήκη 4.2	4,877 ± 0,019	0,39
Σύνολο	4,976 ± 0,056	1,13

Πίνακας 17. Συγκεντρωτικός πίνακα ελέγχου λιδοκαΐνης για τις συνθήκες 1-4

Συνθήκη	Μέση τιμή συγκέντρωσης λιδοκαΐνης στο διάλυμα ελέγχου	%RSD
Αρχική Συνθήκη	11,118 ± 0,019	0,17
Συνθήκη 1.1	11,050 ± 0,002	0,02
Συνθήκη 2.1	10,960 ± 0,013	0,12
Συνθήκη 3.1	10,867 ± 0,004	0,04
Συνθήκη 3.2	10,994 ± 0,020	0,19
Συνθήκη 4.1	10,989 ± 0,007	0,06
Συνθήκη 4.2	10,993 ± 0,013	0,12
Σύνολο	10,996 ± 0,077	0,70

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μελέτη της σταθερότητας των πρότυπων διαλυμάτων και των δειγμάτων ελέγχου καθώς και μελέτη σταθερότητας της κινητής φάσης που χρησιμοποιήθηκε. Συγκεκριμένα, η μελέτη για τα διαλύματα ελέγχου έγινε για χρόνο $t=0h$, $t=24h$ και $t=48h$, ενώ η μελέτη για την κινητή φάση έγινε για χρόνο $t=0h$, $t=24h$ και $t=96h$.

Κριτήριο της μελέτης αποτέλεσε, η σχετική τυπική απόκλιση των λαμβανομένων εμβαδών των κορυφών όλων των επαναλήψεων των μετρήσεων για τις διάφορες χρονικές περιόδους να μην υπερβαίνει το 2%.

Παρασκευάστηκε κινητή φάση όπως έχει περιγραφεί στο εδάφιο 6.1 και ελέγχθηκε η σταθερότητά της, λαμβάνοντας κάθε φορά πέντε διαδοχικές μετρήσεις πρότυπου διαλύματος. Διαπιστώθηκε ότι η κινητή φάση παραμένει σταθερή και αξιόπιστη σε διάστημα συνολικά 96 ωρών, αφού το %RSD του εμβαδού των κορυφών που πάρθηκε δεν ξεπέρασε το 2%. Σημειώνεται ότι και το %RSD του χρόνου έκλουσης των δυο κορυφών (για την αδρεναλίνη βρέθηκε στο 0,7%, ενώ για τη λιδοκαΐνη στο 0,4%) δεν ήταν μεγαλύτερο του 2%.

Για τη μελέτη της σταθερότητας των διαλυμάτων ελέγχου, αρχικά παρασκευάστηκαν (η διαδικασία παρασκευής αναφέρθηκε στο εδάφιο 6.2) συνολικά πέντε διαλύματα:

Ένα διάλυμα αδρεναλίνης (Adrenaline Standard Stock Solution, SA) , ένα διάλυμα λιδοκαΐνης (Lidocaine Standard Stock Solution, SL), ένα πρότυπο διάλυμα αδρεναλίνης / λιδοκαΐνης (Standard Solution, STD), ένα διάλυμα ελέγχου δείγματος αδρεναλίνης (Test Solution for Adrenaline, TA) και ένα διάλυμα ελέγχου δείγματος λιδοκαΐνης (Test Solution for Lidocaine, TL).

Κριτήριο της μελέτης ήταν τα υπό εξέταση διαλύματα ελέγχου ($t=24h$ και $t=48h$) να μην εμφανίσουν διαφορά στις συγκεντρώσεις των δραστικών ουσιών μεγαλύτερη του 2% σε σχέση με τις αρχικές τους συγκεντρώσεις ($t=0h$). Σημειώνεται ότι όλα τα διαλύματα μετά την παρασκευή χωρίζονταν σε δυο ίσα μέρη. Το πρώτο μέρος φυλάσσονταν στους 5 °C ενώ το δεύτερο στους 25 °C. Το γεγονός αυτό μας έδωσε τη δυνατότητα να εξαγάγουμε συμπεράσματα για την επιρροή της θερμοκρασίας φύλαξης στην σταθερότητα των διαλυμάτων παράλληλα με την επίδραση του χρόνου φύλαξής τους.

Πίνακας 18. Αποτελέσματα μελέτης σταθερότητας της κινητής φάσης με εξεταζόμενη δραστική ουσία την αδρεναλίνη

Χρόνος	Εμβαδόν κορυφής αδρεναλίνης στο πρότυπο διάλυμα	Μέσος Όρος Εμβαδού	%RSD
t=0h	391621 394434 395152 395979 391790	393795	0,50
t=24h	392949 391357 391872 391465 392442	392017	0,17
t=96h	396033 393579 393436 395149 395199	394679	0,29
Σύνολο		393497	0,44

Πίνακας 19. Αποτελέσματα μελέτης σταθερότητας της κινητής φάσης με εξεταζόμενη δραστική ουσία την λιδοκαΐνη

Χρόνος	Εμβαδόν κορυφής λιδοκαΐνης στο πρότυπο διάλυμα	Μέσος Όρος Εμβαδού	%RSD
t=0h	19519617 19602829 19603080 19559984 19451018	19547306	0,33
t=24h	19286033 19285469 19308667 19322627 19338084	19308176	0,12
t=96h	19227917 19250187 19214515 19258132 19237085	19237567	0,09
Σύνολο		19364350	0,73

Συνθήκη S1

S1.1 Έλεγχος σταθερότητας STD (θερμοκρασία φύλαξης 5 °C)

S1.2 Έλεγχος σταθερότητας STD (θερμοκρασία φύλαξης 25 °C)

Συνθήκη S2

S2.1 Έλεγχος σταθερότητας STD – Παρασκευή από Stock δ/τα (θερμοκρασία φύλαξης 5 °C)

S2.2 Έλεγχος σταθερότητας STD – Παρασκευή από Stock δ/τα (θερμοκρασία φύλαξης 25 °C)

Συνθήκη S3

S3.1 Έλεγχος σταθερότητας TA (θερμοκρασία φύλαξης 5 °C)

S3.2 Έλεγχος σταθερότητας TA (θερμοκρασία φύλαξης 25 °C)

Συνθήκη S4

S4.1 Έλεγχος σταθερότητας TL (θερμοκρασία φύλαξης 5 °C)

S4.2 Έλεγχος σταθερότητας TL (θερμοκρασία φύλαξης 25 °C)

Για να πραγματοποιηθεί ο υπολογισμός της διαφοράς από την αρχική συγκέντρωση για όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιούμε τον τύπο :

$$\frac{C_t}{C_0} \times 100 - 100 = \% \text{ Διαφορά από την αρχική συγκέντρωση}$$

Όπου C_0 είναι η συγκέντρωση της εξεταζόμενης δραστικής ουσίας και C_t είναι η συγκέντρωση που λαμβάνεται σε κάθε μια από τις διάφορες συνθήκες που εξετάζουμε

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους πίνακες που ακολουθούν (Πίνακας 20 - Πίνακας 26)

Πίνακας 20. Έλεγχος σταθερότητας πρότυπων διαλυμάτων, σύμφωνα με την Συνθήκη S1

Πρότυπο Διάλυμα	Συνθήκες	Διαφορά από αρχική συγκέντρωση
STD ADR	24h 5°C	+ 0,4 %
	24h 25°C	+ 0,4 %
	48h 5°C	- 0,4 %
	48h 25°C	- 0,6 %
STD LID	24h 5°C	+ 0,5 %
	24h 25°C	+ 0,4 %
	48h 5°C	+ 0,9 %
	48h 25°C	+ 0,9 %

Πίνακας 21. Έλεγχος σταθερότητας πρότυπων διαλυμάτων σύμφωνα με την Συνθήκη S2

Πρότυπο Διάλυμα	Συνθήκες	Διαφορά από αρχική συγκέντρωση
Stock Solution ADRENALINE	24h 5°C	+ 0,3 %
	24h 25°C	+ 0,5 %
	48h 5°C	- 0,2 %
	48h 25°C	+ 0,4 %
Stock Solution LIDOCAINE	24h 5°C	+ 0,5 %
	24h 25°C	+ 0,5 %
	48h 5°C	+ 1,1 %
	48h 25°C	+ 1,7 %

Πίνακας 22: Αρχικές συγκεντρώσεις αδρεναλίνης και λιδοκαΐνης στα προς εξέταση διαλύματα ελέγχου

Διάλυμα Ελέγχου	C (μg/ml)	Αρχική συγκέντρωση Αδρεναλίνης στο δείγμα (μg/ml)
Test Solution ADRENALINE	4,965	4,909 ± 0,049
	4,890	
	4,873	
Διάλυμα Ελέγχου	C (mg/ml)	Αρχική συγκέντρωση Λιδοκαΐνης στο δείγμα (mg/ml)
Test Solution LIDOCAINE	11,008	11,008 ± 0,004
	11,012	
	11,003	

Πίνακας 23: Μελέτη σταθερότητας διαλυμάτων ελέγχου σύμφωνα με την Συνθήκη S3.1 και S4.1 για 24h

24h 5°C	C	MO	Διαφορά από αρχική συγκέντρωση
Test Solution ADRENALINE	4,908 µg/ml	4,891 ± 0,018	- 0,4%
	4,893 µg/ml		
	4,872 µg/ml		
Test Solution LIDOCAINE	11,095 mg/ml	11,099 ± 0,005	+0,8%
	11,097 mg/ml		
	11,104 mg/ml		

Πίνακας 24: Μελέτη σταθερότητας διαλυμάτων ελέγχου σύμφωνα με την Συνθήκη S3.2 και S4.2 για 24h

24h 25°C	C	MO	Διαφορά από αρχική συγκέντρωση
Test Solution ADRENALINE	4,924 µg/ml	4,921 ± 0,039	+0,2%
	4,880 µg/ml		
	4,958 µg/ml		
Test Solution LIDOCAINE	11,099 mg/ml	11,103 ± 0,004	+0,9%
	11,106 mg/ml		
	11,102 mg/ml		

Δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεγαλύτερη του 2% σε σχέση με τις αρχικές συγκεντρώσεις αδρεναλίνης και λιδοκαΐνης κατά τη διάρκεια των πρώτων 24 ωρών της μελέτης. Με οδηγό τα παραπάνω θετικά αποτελέσματα η μελέτη συνεχίστηκε για ακόμα ένα εικοσιτετράωρο, για να διαπιστωθεί αν τα διαλύματα παραμένουν σταθερά μετά από συνολικά 48 ώρες.

Πίνακας 25: Μελέτη σταθερότητας διαλυμάτων ελέγχου σύμφωνα με την Συνθήκη S3.1 και S4.1 για 48h

48h 5°C	C	MO	Διαφορά από αρχική συγκέντρωση
Test Solution ADRENALINE	4,857 µg/ml	4,902 ± 0,045 µg/ml	- 0,2%
	4,901 µg/ml		
	4,947 µg/ml		
Test Solution LIDOCAINE	11,109 mg/ml	11,124 ± 0,018 mg/ml	+1,1%
	11,119 mg/ml		
	11,144 mg/ml		

Πίνακας 26: Μελέτη σταθερότητας διαλυμάτων ελέγχου σύμφωνα με την Συνθήκη S3.2 και S4.2 για 48h

48h 25°C	C	MO	Διαφορά από αρχική συγκέντρωση
Test Solution ADRENALINE	4,899 µg/ml	4,910 ± 0,023	+0,0%
	4,937 µg/ml		
	4,894 µg/ml		
Test Solution LIDOCAINE	11,118 mg/ml	11,121 ± 0,006	+1,0%
	11,117 mg/ml		
	11,128 mg/ml		

Όπως βλέπουμε από τους παραπάνω πίνακες, δεν εμφανίστηκε διαφορά μεγαλύτερη του 2% σε σχέση με τις αρχικές συγκεντρώσεις, ούτε μετά την πάροδο 48 ωρών, γεγονός που καταδεικνύει την υψηλή σταθερότητα των διαλυμάτων σε θερμοκρασία φύλαξης 5 °C και 25 °C.

6.5.6 Πιστότητα

Η μελέτη της πιστότητας πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα αδρεναλίνης και λιδοκαΐνης, τα οποία αναλύθηκαν από τρεις διαφορετικούς αναλυτές Α, Β, Γ και σε τρεις διαφορετικές ημέρες. Κάθε αναλυτής πραγματοποίησε τρεις επαναλήψεις. Τα αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται στους πίνακες που ακολουθούν.

Πίνακας 27: Έλεγχος πιστότητας για την αδρεναλίνη με χρησιμοποίηση τριών αναλυτών.

ΑΝΑΛΥΤΗΣ	Συγκέντρωση Αδρεναλίνης ($\mu\text{g/ml}$)	% Ανάκτηση	RSD%
Α	5,014	100,8	0,07
	5,045	100,9	
	5,049	101,0	
Β	5,028	100,6	0,88
	4,945	98,9	
	4,962	99,2	
Γ	5,126	102,5	1,39
	5,015	100,3	
	5,147	102,9	

Πίνακας 28: Έλεγχος πιστότητας για την λιδοκαΐνη με χρησιμοποίηση τριών αναλυτών.

ΑΝΑΛΥΤΗΣ	Συγκέντρωση Αδρεναλίνης (mg/ml)	% Ανάκτηση	RSD%
Α	11,139	104,1	0,17
	11,111	103,8	
	11,104	103,8	
Β	10,862	101,5	0,06
	10,874	101,6	
	10,873	101,6	
Γ	10,944	102,3	0,60
	10,953	102,4	
	11,062	103,5	

Όλα τα αποτελέσματα κυμαίνονται εντός ορίων των προδιαγραφών που έχουν τεθεί, καθώς βλέπουμε ότι η σχετική τυπική απόκλιση των μετρήσεων και των τριών αναλυτών είναι μικρότερη από 2.

Πίνακας 29: Έλεγχος πιστότητας - 3 διαφορετικές ημέρες ελέγχου για την αδρεναλίνη.

ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	Συγκέντρωση Αδρεναλίνης ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	% Ανάκτηση	RSD%
1	5,041	100,8	0,07
	5,045	100,9	
	5,049	101,0	
2	5,111	102,2	1,42
	4,990	99,8	
	4,986	99,7	
3	4,955	99,1	1,05
	5,033	100,7	
	5,056	101,1	

Πίνακας 30: Έλεγχος πιστότητας - 3 διαφορετικές ημέρες ελέγχου για την λιδοκαΐνη.

ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	Συγκέντρωση Αδρεναλίνης (mg/ml)	% Ανάκτηση	RSD%
1	11,139	104,1	0,17
	11,111	103,8	
	11,104	103,8	
2	10,962	102,4	0,39
	11,047	103,2	
	10,991	102,7	
3	10,863	101,5	0,13
	10,835	101,3	
	10,853	101,4	

Ο έλεγχος της πιστότητας της μεθόδου έγινε και για τρεις διαφορετικές ημέρες ανάλυσης, με τα αποτελέσματα όπως παρουσιάζονται στους Πίνακες 29 και 30, να φανερώνουν τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης των μετρήσεων και για τις τρεις ημέρες αναλύσεων μικρότερες από 2.

Ενδιάμεση πιστότητα

Για τον προσδιορισμό της ενδιάμεσης πιστότητας χρησιμοποιήθηκαν τα παραπάνω αποτελέσματα και συγκεκριμένα η μέση τιμή της περιεκτικότητας κάθε δραστικής ουσίας για τους τρεις αναλυτές.

Πίνακας 31: Αποτελέσματα ενδιάμεσης πιστότητας για την αδρεναλίνη

Δραστική Ουσία	ΑΝΑΛΥΤΗΣ Α	ΑΝΑΛΥΤΗΣ Β	ΑΝΑΛΥΤΗΣ Γ	%RSD
Αδρεναλίνη (μg/ml)	5,045	4,978	5,096	1,32

Πίνακας 32: Αποτελέσματα ενδιάμεσης πιστότητας για την λιδοκαΐνη

Δραστική Ουσία	ΑΝΑΛΥΤΗΣ Α	ΑΝΑΛΥΤΗΣ Β	ΑΝΑΛΥΤΗΣ Γ	%RSD
Λιδοκαΐνη (mg/ml)	11,118	10,870	10,986	1,05

Όπως φαίνεται από τα δεδομένα των πινάκων, τα αποτελέσματα συμφωνούν με τα κριτήρια που έχουν θεσπιστεί για την αξιολόγηση της μεθόδου.

Όπως είναι προφανές η χημική σταθερότητα των φαρμακευτικών μορίων αποτελεί σημαντικό παράγοντα, καθώς επηρεάζει τόσο την ασφάλεια όσο και την αποτελεσματικότητα του φαρμακευτικού προϊόντος. Οι οδηγίες του FDA αναφέρουν την απαίτηση για λήψη δεδομένων δοκιμών σταθερότητας για να κατανοηθεί πώς η ποιότητα μιας φαρμακευτικής ουσίας και ενός φαρμακευτικού προϊόντος αλλάζει με το χρόνο υπό την επίδραση διαφόρων περιβαλλοντικών παραγόντων. Η γνώση της σταθερότητας του μορίου βοηθά στην επιλογή κατάλληλης σύνθεσης και συσκευασίας, καθώς και στην παροχή κατάλληλων συνθηκών αποθήκευσης και διάρκειας ζωής.

Ένα ζήτημα που απασχολεί και είναι το θέμα πολλών συζητήσεων μεταξύ των επιστημόνων φαρμακευτικών προϊόντων, είναι πόσος βαθμός υποβάθμισης μπορεί να θεωρηθεί αρκετός σε μια μελέτη ελέγχου ειδικότητας της μεθόδου. Οι περισσότερες εκτιμήσεις καταδεικνύουν ότι η αποικοδόμηση των ουσιών φαρμάκων μεταξύ 5% και 20% μπορεί να γίνει αποδεκτή ως λογική για την επικύρωση των διαφόρων χρωματογραφικών μεθόδων¹¹. Ορισμένοι

επιστήμονες θεωρούν ότι η 10% υποβάθμιση είναι βέλτιστη για χρήση στην αναλυτική επικύρωση για μικρά φαρμακευτικά μόρια για τα οποία είναι αποδεκτά όρια σταθερότητας της τάξης του 90% της δήλωσης της ετικέτας.

Με τις δοκιμές εξαναγκασμένης αποικοδόμησης (stress tests) εξετάζεται ο βαθμός αποικοδόμησης μιας φαρμακευτικής ουσίας και του φαρμακευτικού προϊόντος υπό συνθήκες πιο ακραίες από τις προκαθορισμένες. Οι δοκιμές αυτές παρέχουν επίσης μια εικόνα για τις οδούς αποικοδόμησης και τα προϊόντα αποικοδόμησης της φαρμακευτικής ουσίας και βοηθούν στην αποσαφήνιση της δομής των προϊόντων.

Δεν είναι απαραίτητο οι δοκιμές αποικοδόμησης να οδηγήσουν σε προϊόν αποικοδόμησης. Η μελέτη μπορεί να τερματιστεί εάν δεν παρατηρηθεί αποικοδόμηση ή η παρατηρούμενη αποικοδόμηση βρίσκεται εντός των επιτρεπόμενων ορίων, μετά την έκθεση της φαρμακευτικής ουσίας ή του φαρμακευτικού προϊόντος σε πιο ακραίες συνθήκες από αυτές που αναφέρονται στο πρωτόκολλο. Η μελέτη εξαναγκασμένης αποικοδόμησης είναι απαραίτητη για να αποδειχθεί ότι η αναλυτική μέθοδος έχει τις απαιτούμενες προδιαγραφές για να χρησιμοποιηθεί σε πραγματική μελέτη σταθερότητας.

6.6 Συνθήκες αποικοδόμησης

Υδρολυτικές συνθήκες

Η υδρόλυση είναι μία από τις πιο κοινές χημικές αντιδράσεις αποικοδόμησης σε ένα ευρύ φάσμα pH και περιλαμβάνει αποσύνθεση χημικής ένωσης με αντίδραση με νερό. Η υδρολυτική μελέτη υπό όξινες και βασικές συνθήκες (acid degradation – base degradation) περιλαμβάνει την κατάλυση λειτουργικών ομάδων που υπάρχουν στο μόριο. Η επιλογή του τύπου και των συγκεντρώσεων οξέος ή βάσης εξαρτάται από τη σταθερότητα της φαρμακευτικής ουσίας. Το υδροχλωρικό οξύ ή θειικό οξύ (0,1-1 M) για όξινη υδρόλυση και το υδροξείδιο του νατρίου ή υδροξείδιο του καλίου (0,1-1 M) για υδρόλυση βάσης προτείνονται ως κατάλληλα αντιδραστήρια¹².

Οι δοκιμασίες αρχίζουν κανονικά σε θερμοκρασία δωματίου και εάν δεν υπάρχει υποβάθμιση, εφαρμόζεται αυξημένη θερμοκρασία (50-70 °C). Η διάρκεια της μελέτης καθορίζεται ανάλογα με τις προδιαγραφές και δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 7 ημέρες. Το αποικοδομημένο εξεταζόμενο δείγμα κατόπιν εξουδετερώνεται χρησιμοποιώντας κατάλληλο οξύ, βάση ή ρυθμιστικό διάλυμα, για να αποφευχθεί περαιτέρω αποσύνθεση.

Συνθήκες οξειδωσης

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου χρησιμοποιείται ευρέως για την οξειδωση των φαρμακευτικών ουσιών σε μελέτες αναγκαστικής αποικοδόμησης (oxidative degradation), αλλά μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν και άλλοι οξειδωτικοί παράγοντες, όπως ιόντα μετάλλων και οξυγόνο. Η επιλογή ενός οξειδωτικού παράγοντα, η συγκέντρωσή του και οι συνθήκες εξαρτώνται από την φαρμακευτική ουσία.

Θερμικές συνθήκες

Η θερμική αποικοδόμηση (thermal degradation) θα πρέπει να διεξάγεται σε πιο έντονες συνθήκες από τις συνιστώμενες. Η μελέτη θερμικής αποικοδόμησης πραγματοποιείται στους 40-80 °C ή και σε ακόμα υψηλότερες

θερμοκρασίες για μικρότερη χρονική περίοδο. Η επίδραση της θερμοκρασίας στη θερμική αποικοδόμηση μιας ουσίας μελετάται μέσω της εξίσωσης Arrhenius:

$$k = Ae^{-E_a/RT}$$

Όπου k είναι ο συγκεκριμένος παράγοντας αντίδρασης, A είναι συντελεστής συχνότητας, E_a είναι ενέργεια ενεργοποίησης, R είναι σταθερά αερίων και T είναι θερμοκρασία¹³.

Φωτολυτικές συνθήκες

Ο έλεγχος της σταθερότητας φαρμάκων κάτω από διάφορες φωτολυτικές συνθήκες (photolytic degradation) αξιολογείται για να αποδειχθεί ότι η έκθεση σε φως δεν έχει ως αποτέλεσμα σημαντικές αλλαγές στη δομή και τη σύσταση. Οι μελέτες σταθερότητας εκτελούνται με έκθεση σε συνθήκες UV.

Κατά τη διάρκεια την μελέτης που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο, εξετάστηκε την συμπεριφορά των δυο δραστικών ουσιών του φαρμάκου στις παρακάτω συνθήκες :

Συνθήκη ST1. Επίδραση HCl 1M

Συνθήκη ST2. Επίδραση NaOH 0,01M

Συνθήκη ST3. Επίδραση H₂O₂ 10% w/v

Συνθήκη ST4. Επίδραση θερμοκρασίας 105 °C

Συνθήκη ST5. Επίδραση ακτινοβολίας UV

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους πίνακες που ακολουθούν (Πίνακας 33 - Πίνακας 34)

Πίνακας 33. Μελέτη επίδρασης διαλυμάτων HCl 1M, NaOH 0.01M και H₂O₂ 10% σε διαλύματα ελέγχου για χρόνο 15 min και 5 ωρών αντίστοιχα

	Χωρίς Επίδραση	HCl 1M 15 min	HCl 1M 5 h	NaOH 0,01M 15 min	NaOH 0,01M 5 h	H ₂ O ₂ 10% 15 min	H ₂ O ₂ 10% 5 h
Adrenaline (mg/ml)	4,904	4,759	4,602	4,870	4,670	4,841	4,550
Μεταβολή (%)		-2,9%	-6,2%	-0,7%	-4,8%	-1,3%	-7,1%
Lidocaine (mg/ml)	11,095	11,048	10,750	11,058	10,776	11,147	11,055
Μεταβολή (%)		-0,4%	-3,1%	-0,4%	-2,9%	+0,5%	-0,4%

Πίνακας 34. Μελέτη επίδρασης UV ακτινοβολίας και θέρμανσης στους 105°C των διαλυμάτων ελέγχου για χρόνο 60 λεπτών και 24 ωρών αντίστοιχα

	Χωρίς Επίδραση	UV 60 min	UV 24 h	105°C 60 min	105°C 24 h
Adrenaline (mg/ml)	4,904	4,690	4,641	4,493	4,425
Μεταβολή (%)		-4,4%	-5,3%	-8,2%	-9,8%
Lidocaine (mg/ml)	11,095	10,869	10,710	11,176	10,445
Μεταβολή (%)		-2,1%	-3,5%	+0,7%	-5,9%

Όπως φαίνεται στους παραπάνω πίνακες, τα αποτελέσματα των δοκιμασιών είναι αρκετά ικανοποιητικά. Οι δυο δραστικές ουσίες που περιέχονται στο υπό εξέταση φάρμακο – αδρεναλίνη και λιδοκαΐνη – αποδείχτηκαν αρκετά

σταθερές, καθώς μετά από όλες τις δοκιμασίες δεν έδειξαν μεταβολή στην συγκέντρωσή τους σε σχέση με τις αρχικές μετρήσεις μεγαλύτερη του 10%. Επίσης για κάθε μια από τις συνθήκες ST1 - ST5 τα διαλύματα μελετήθηκαν και με PDA ανιχνευτή για να αποκλείσουμε την πιθανότητα να μην είναι καθарές οι κορυφές μετά τις δοκιμασίες. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήσαμε στα χρωματογραφήματα Purity Plot που λάβαμε, τιμές Purity Angle μικρότερες από τις τιμές Purity Threshold γεγονός που επιβεβαιώνει την καθαρότητα των κορυφών.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Μετά τη ολοκλήρωση όλων των δοκιμασιών και τη συγκέντρωση και επεξεργασία όλων των δεδομένων, συμπεράθηκε ότι τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατά την επικύρωση της μεθόδου του ταυτόχρονου ποσοτικού προσδιορισμού των δραστικών ουσιών αδρεναλίνης και λιδοκαΐνης των φαρμακευτικών σκευασμάτων Lidocaine 1% w/v and Adrenaline (1:200,000) Injection, Lidocaine 2% w/v and Adrenaline (1:200,000) Injection, και Lidocaine 1% w/v and Adrenaline (1:100,000) Injection, δείχνουν ότι η μέθοδος είναι ακριβής και αξιόπιστη. Το γεγονός αυτό επιτρέπει στην μέθοδο να χρησιμοποιηθεί για τις αναλύσεις ρουτίνας στο εργαστήριο, αλλά και για μελλοντικές μελέτες σταθερότητας.

Για την επικύρωση της μεθόδου πραγματοποιήθηκαν πειράματα :

- ❖ *Καταλληλότητας συστήματος* : Ο λόγος κορυφή προς κοιλάδα ανάμεσα στην κορυφή της λιδοκαΐνης και της γειτονικής, σε αυτή, κορυφής στο διάλυμα καταλληλότητας του συστήματος ήταν μεγαλύτερος του δυο, ενώ η σχετική τυπική απόκλιση για 6 επαναλήψεις των διαλυμάτων αναφοράς ήταν 1,5% για την αδρεναλίνη και 0,2% για την λιδοκαΐνη.
- ❖ *Ειδικότητας μεθόδου* : Έγινε χρήση ενός διαλύματος λευκού δείγματος ώστε να διαπιστωθούν τυχόν ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις. Το χρωματογράφημα του λευκού δείγματος έδειξε μηδενική απόκριση.
- ❖ *Ορθότητας μεθόδου* : Τα ποσοστά ανάκτησης που πάρθηκαν κυμαίνονται εντός των αποδεκτών ορίων ανάκτησης 99,0% - 101,0%.
- ❖ *Πιστότητας μεθόδου* : Η σχετική τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων τριών αναλυτών και για τρεις διαφορετικές ημέρες ανάλυσης δεν ήταν μεγαλύτερη από 2%
- ❖ *Γραμμικότητας μεθόδου* : Για την αδρεναλίνη, διαπιστώθηκε γραμμική περιοχή συγκεντρώσεων 4,02 - 6,03 $\mu\text{g/ml}$, συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 1,000$ και εξίσωση παλινδρόμησης $y = 1,0046x$. Για την λιδοκαΐνη προέκυψε γραμμική περιοχή συγκεντρώσεων 0,428 – 0,642 mg/ml , με

συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 1,000$ και εξίσωση παλινδρόμησης $y = 1,0019x - 0,001$.

- ❖ *Ανθεκτικότητας μεθόδου:* Οι μικρές μεταβολές που προκλήθηκαν στις πειραματικές συνθήκες της μεθόδου, όπως η θερμοκρασία της στήλης, ο όγκος έγχυσης και το μήκος κύματος λειτουργίας του ανιχνευτή, δεν επηρέασαν το αποτέλεσμα. Ακόμα διαπιστώθηκε ότι με χρήση διαφορετικής παρτίδας στήλης της ίδιας εταιρίας, αλλά και διαφορετικής εταιρίας τα αποτελέσματα δεν επηρεάστηκαν. Εκτεταμένη μεταβολή της θερμοκρασίας της στήλης ή του όγκου έγχυσης επηρεάζουν το αποτέλεσμα της ανάλυσης. Από τα αποτελέσματα της ανθεκτικότητας συμπεραίνεται ότι δεν απαιτείται επαναξιολόγηση της μεθόδου σε περίπτωση που κάποια από τις παραμέτρους υποστεί μικρές μεταβολές. Προφανώς και μεγάλη μεταβολή στην θερμοκρασία στήλης ή στον όγκο έγχυσης απαιτούν άμεση επαναξιολόγηση της μεθόδου.
- ❖ *Σταθερότητας διαλυμάτων:* Εξετάστηκε η σταθερότητα της κινητής φάσης, η οποία κρίθηκε σταθερή για τουλάχιστον 96 ώρες και των πρότυπων διαλυμάτων και των διαλυμάτων ελέγχου που όπως αποδείχθηκε παραμένουν σταθερά για τουλάχιστον 48 ώρες από την ώρα παρασκευής τους.
- ❖ *Δοκιμασιών εξαναγκασμένης αποικοδόμησης (Stress Tests) :* Μετά τη διενέργεια μιας σειράς δοκιμασιών (επίδραση HCl 1M, NaOH 0.01M, H₂O₂ 10%, θερμοκρασίας 105°C και ακτινοβολίας UV) παρατηρήθηκε ότι η αναλυτική μέθοδος δεν επηρεάζεται από τα προϊόντα αποικοδόμησης.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΩΝ

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
Relative Standard Deviation (RSD)	Σχετική τυπική απόκλιση
Ultra Violet (UV)	Υπεριώδες
High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	Υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης
Retention Time (Rt)	Χρόνος έκλουσης
European Pharmacopoeia (EP)	Ευρωπαϊκή Φαρμακοποία
British Pharmacopoeia (BP)	Βρετανική Φαρμακοποία
United States Pharmacopoeia (USP)	Αμερικάνικη Φαρμακοποία
Photodiode Array (PDA)	Συστοιχία φωτοδιόδων
Thin layer chromatography (TLC)	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας
Isocratic elution	Ισοκρατική έκλουση
Gradient elution	Βαθμιδωτή έκλουση

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Μ. Κουππάρης, Έλεγχος Ποιότητας Φαρμάκων, Σημειώσεις Μεταπτυχιακών Μαθημάτων, Αθήνα, 1999.
2. Π. Α. Σίσκος και Δ. Π. Νικολέλης, Αναλυτικές Μέθοδοι Διαχωρισμού, ΕΚΠΑ, Αθήνα 1991.
3. V.R Meyer, Practical High Performance Liquid Chromatography, 2nd Edition, John Wiley and sons, Inc, NY, 1997.
4. Θ.Π. Χατζηγιάννου και Μ.Α. Κουππάρη, Ενόργανη Ανάλυση, Αθήνα, 1997.
5. Skoog – Holler – Nieman, Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης, έκδοση 5^η, 2005 .
6. W.J. Lough, I.W. Wainer, High Performance Liquid Chromatography, Fundamental Principles and Practice, Blackie Academic and Professional, 1997.
7. V.M. Shinde, H. Davies, Encyclopedia of Analytical Science, A. Townshend, Editor, Academic Press Ltd, London, 1995.
8. Ε.Α. Αρχοντάκη, Χημεία της στατικής φάσης, εξέλιξη των στηλών στην HPLC, Σημειώσεις μεταπτυχιακού μαθήματος «Χρωματογραφικές μέθοδοι ανάλυσης»
9. European Pharmacopoeia 9.0 p.1650-1653.
10. European Pharmacopoeia 9.6 p.6150-6151.
11. G.Szepesi Selection of high-performance liquid chromatographic methods in pharmaceutical analysis. III. Method validation J. Chromatogr., 464, pp. 265-278, 1989.
12. S. Singh, M. Bakshi, Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs Pharm. Tech, 2000.

13. K.M. Alsante, A. Ando, R. Brown, *et al.* The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 59 (1), pp. 29-37, 2007.
14. World Health Organization WHO Technical Report Series, No. 957, Annex 1 WHO good practices for pharmaceutical quality control laboratories, 2010.
15. Θ. Π. Χατζηιωάννου, Χημική Ισορροπία και Ανόργανη Ποιοτική Ημιμικροανάλυση, Αθήνα, 2003.
16. Θ. Π. Χατζηιωάννου, Α. Κ. Καλοκαιρινού, Μ. Τιμοθέου – Ποταμιά, Ποσοτική Ανάλυση, Αθήνα, 2003.
17. Π. Ν. Κουρουνάκης, Ε. Α. Ρέκκα, Γνωριμία με την συναρπαστική επιστήμη των φαρμάκων, Αθήνα, 2014.
18. Rager T, Geoffroy A', Hilfiker R, Storey JMD. The crystalline state of methylene blue: a zoo of hydrates. *Phys Chem Chem Phys*, 14:8074–8082, 2012.
19. www.pef.gr/farmaka/genosima (Πανελλήνια Ένωση Φαρμακοβιομηχανίας)
20. Γ. Κυριόπουλος, Μ. Γείτονα, Η αγορά του φαρμάκου στην Ελλάδα: Πολιτικές, Οικονομικές και Υγειονομικές Συνιστώσες, στο βιβλίο Πολιτική και Οικονομία του Φαρμάκου στην Ελλάδα, Εκδόσεις: Θεμέλιο, Αθήνα, 2014.
21. Generic Drug Facts, Center for Drug Evaluation and Research, U.S. Food and Drug Administration, 2017.
22. Μ. Γεωργαράκης, Μέθοδοι ελέγχου φαρμάκων, Θεσσαλονίκη, 2009.
23. L. R. Snyder, J. J. Kirkland, Introduction to Modern Liquid Chromatography, J Wiley, 1974.
24. D. G. Watson, Φαρμακευτική Ανάλυση, Εκδόσεις Παρισιάνου, 2η έκδοση, Αθήνα, 2011.

25. P. J. Schoemakers, Optimization of Chromatographic Selectivity, A guide to method development, Elsevier, Amsterdam, 1986.
26. IUPAC, Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book") 1997.
27. (a) EpiPen.com: "About EpiPen Auto-injector". (b) MedicineNet.com: "Epinephrine auto-injector, Epi E-Z Pen, EpiPen Glossary of Terms, (c) MedLine Plus (NIH): "Epinephrine injection". (d) Drugs.com: "Epinephrine injection".
28. (a) Pihel K, Schroeder TJ, Wightman RM: "Rapid and selective cyclic voltammetric measurements of epinephrine and norepinephrine as a method to measure secretion from single bovine adrenal medullary cells", Analytical Chemistry, 66(24):4532-4536, 1994 (Abstract). (b) Schroeder TJ, Jankowski JA, Senyshyn J, Holz RW, Wightman RM: "Zones of exocytotic release on bovine adrenal medullary cells in culture", J Biol Chem., 269(25):17215-17220, 1994 (PubMed). (c) Suaud-Chagny M.-F, Steinberg R, Mermet C, Biziere K, Gonon F: "In Vivo Voltammetric Monitoring of Catecholamine Metabolism in the A1 and A2 Regions of the Rat Medulla Oblongata", Journal of Neurochemistry, 47(4):1141-1147, 2006 (αρχείο PDF, 707 KB). (d) Mermet C, Gonon F: "In vivo voltammetric monitoring of noradrenaline release and catecholamine metabolism in the hypothalamic paraventricular nucleus", Neuroscience, 19(3):829-838, 1986 (PubMed).
29. (a) Wikipedia: "William Bates". (b) Bates WH (www.central-fixation.com): "The use of extract of suprarenal capsule in the eye", Medical Journal: 647-650, 1896. (c) Sneader W: "The discovery and synthesis of epinephrine", Drug News Perspect. 14(8):491-494, 2001 (Pubmed).
30. Α. Κελεπούρη-Παρλαπάνη, Τοπικά αναισθητικά. Εκδότης: Γκιάλα, Αναισθησιολογία, 2η έκδοση, University Studio Press, Θεσσαλονίκη 2006, (167-188).

31. Γ. Χορταριά, Τοπικά Αναισθητικά. Εκδότης: Μπαλαμούτσος, Στοιχεία Περιεγχειρητικής Ιατρικής, 1η έκδοση, University Studio Press, Θεσσαλονίκη 2002, (223-232).
32. (a) Stoelting R. Local anesthetics in Pharmacology and Physiology in Anesthetic Practice Philadelphia J.B. Lippincott Company, 1987. (b) Scott D Bruce. Local anaesthetic drugs in Techniques of Regional Anaesthesia Mediglobe S.A. 1989. (c) Strichartz GR, Covino BG. Local anesthetics in Ronald D. Miller Anesthesia Churchill Livingstone, 1990.
33. Flatmark T: "Catecholamines biosynthesis and physiological regulation in neuroendocrine cells", Acta Physiol, 2000 (PubMed).
34. World Intellectual Property Organization (WIPO): "Processes for the preparation of epinephrine" (WO/2009/004593).
35. T. J. Reilly "The Preparation of Lidocaine". J. Chem. Ed. 76 (11): 1557, 1999.
36. L.R. Snyder, J.J. Kirkland and J.L. Glajch, Practical HPLC Method Development, (John Wiley & Sons, New York, USA, 2nd ed., 1997.