



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



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

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

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

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου για μελέτη μετανάστευσης
ουσιών από περιέκτη φαρμακευτικού σκευάσματος
βορικοναζόλης με Υγροχρωματογραφία συζευγμένη με
Φασματομετρία Μαζών σε σειρά (LC-MS)**

**ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2020

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου για μελέτη μετανάστευσης ουσιών από περιέκτη του φαρμακευτικού σκευάσματος βορικοναζόλης με Υγροχρωματογραφία συζευγμένη με Φασματομετρία Μαζών σε σειρά (LC-MS)

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ

A.M.:151308

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Κουππάρης Μιχαήλ, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Νικόλαος Θωμαΐδης, Καθηγητής ΕΚΠΑ
2. Αναστάσιος Οικονόμου, Καθηγητής ΕΚΠΑ
3. Χρήστος Κόκκινος, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

21 ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΥ 2020

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας, αποτελεί η ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου για τον προσδιορισμό οργανικών ουσιών που μεταναστεύουν από τον τελικό περιέκτη στο περιεχόμενο φαρμακευτικού σκευάσματος βορικοναζόλης, με χρήση της τεχνικής της υγροχρωματογραφίας – φασματομετρίας μαζών (LC-MS).

Συγκεκριμένα, αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μια μέθοδος SPE-HPLC-MS για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των ουσιών μετανάστευσης. Καθορίστηκαν οι συνθήκες για τη διαδικασία της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) και υπολογίστηκαν οι ολικές ανακτήσεις των αναλυτών (%Recovery) στο δείγμα.

Κατά την επικύρωση της μεθόδου, πραγματοποιήθηκε έλεγχος των χαρακτηριστικών ποιότητάς της. Οι παράμετροι που εξετάστηκαν ήταν η δοκιμασία καταλληλότητας του συστήματος, η γραμμικότητα, η ορθότητα, η επαναληψιμότητα, η ενδιάμεση πιστότητα, η σταθερότητα και η ανθεκτικότητα της μεθόδου.

Τέλος, έγινε εφαρμογή της μεθόδου για τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό των ουσιών που μεταναστεύουν σε πραγματικό δείγμα βορικοναζόλης, το οποίο είχε έρθει σε επαφή με τον τελικό περιέκτη της τελικής συσκευασίας του φαρμάκου. Η ανάλυση του δείγματος πραγματοποιήθηκε με την τεχνική HPLC-MS σε λειτουργίες θετικού και αρνητικού ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI).

Η παρούσα μελέτη μετανάστευσης έχει στόχο να ελέγξει την ύπαρξη ενώσεων που μεταναστεύουν, σε συγκέντρωση μεγαλύτερη του αναλυτικού ορίου αξιολόγησης AET_{genotoxic}, το οποίο καθορίζει ότι μια ουσία είναι γενετοξική για τον ανθρώπινο οργανισμό.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Φαρμακευτική ανάλυση

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Βορικοναζόλη, μετανάστευση, περιέκτης, HPLC, MS, SPE, AET, Leachables, γενετοξική δράση

ABSTRACT

The purpose of this MSc thesis is the development and validation of an analytical method for the determination of the organic species that migrate from the final packaging into a voriconazole product, by using a Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (LC-MS) method.

More specifically, an analytical SPE-HPLC/MS method for the simultaneous determination of leachables species was developed and validated. The conditions for the solid phase extraction (SPE) were determined and the total recoveries of the analytes (%Recovery) in the sample were calculated.

During the method validation, the analytical characteristics of the method were evaluated. The examined parameters were the system suitability, the linearity, the trueness, the repeatability, the intermediate precision, the stability and the robustness of this method.

Finally, the method was applied for the semi-quantitation of the substances that migrate into a real drug product, which has been previous come into contact with the final packaging of the drug product. The sample was analyzed by an HPLC-MS method with electrospray ionization (ESI) in positive and negative operation modes.

This migration study aims to verify the existence of leachables species at concentrations above the analytical evaluation threshold $AET_{\text{genotoxic}}$, which defines that a substance may have genotoxic effect on human organism.

SUBJECT AREA: Pharmaceutical analysis

KEYWORDS: Voriconazole, migration, packaging, HPLC, MS, SPE, AET, Leachables, genotoxic effect

Στην οικογένειά μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	21
ΜΕΛΕΤΕΣ ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗΣ	21
1.1 Εισαγωγή.....	21
1.2 Βασικές Έννοιες και Ορισμοί	22
1.3 Οριακές Τιμές Ασφαλείας	24
1.4 Σκοπός Μελετών Μετανάστευσης	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	30
ΒΟΡΙΚΟΝΑΖΟΛΗ	30
2.1 Εισαγωγή – Χρήσεις	30
2.2 Φυσικά και Χημικά Χαρακτηριστικά	30
2.3 Προσμίξεις	32
2.4 Έκδοχα	33
2.5 Μηχανισμός Δράσης.....	33
2.5.1 Φαρμακοκινητική.....	33
2.5.2 Φαρμακοδυναμική.....	35
2.6 Χορήγηση	36
2.7 Ανεπιθύμητες Ενέργειες	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	42
ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ	42
3.1 Εισαγωγή.....	42
3.2 Αρχές τεχνικής εκχύλισης	42
3.2.1 Εκχύλιση Στερεής Φάσης (Solid phase Extraction, SPE).....	43
3.2.2 Υγρό-υγρό Εκχύλιση (Liquid liquid Extraction, LLE)	46

3.3	Αναλυτικές τεχνικές.....	48
3.3.1	Αεριοχρωματογραφία - Φασματομετρία Μαζών (GC-MS).....	48
3.3.2	Υγροχρωματογραφία - Φασματομετρία Μαζών (LC-MS).....	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4		59
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ		59
4.1	Εισαγωγή.....	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5		61
ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΟΥΝ ΑΠΟ ΠΕΡΙΕΚΤΗ ΣΤΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟΥ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΟΣ ΒΟΡΙΚΟΝΑΖΟΛΗΣ		61
5.1	Εισαγωγή - Σκοπός μελέτης	61
5.2	Σχεδιάγραμμα ανάλυσης	62
5.3	Ανάπτυξη μεθόδου	69
5.3.1	Υπολογισμός ορίου αναλυτικής αξιολόγησης (Analytical Evaluation Threshold, AET)	69
5.3.2	Πειραματική πορεία – Παρασκευή διαλυμάτων/ δειγμάτων για την επικύρωση της μεθόδου	70
5.3.2.1	Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας	70
5.3.2.2	Γενική προετοιμασία δειγμάτων – Προκατεργασία με την τεχνική της SPE	72
5.3.2.3	Παρασκευή διαλυμάτων για την επικύρωση μεθόδου.....	74
5.3.3	Ανάλυση - Προσδιορισμός “leachables” ουσιών με LC-MS (QqQ).....	78
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6		84
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....		84
6.1	Χαρακτηριστικά Ποιότητας μεθόδου	84
6.2	Έλεγχος καταλληλότητας συστήματος.....	84
6.3	Έλεγχος Ειδικότητας (Specificity)	87
6.4	Έλεγχος Γραμμικότητας (Linearity).....	89

6.5	Έλεγχος επίδρασης φαινομένου της μήτρας (Matrix Effect)	92
6.6	Έλεγχος Ακρίβειας (Accuracy).....	94
6.7	Έλεγχος Ορίου Ποσοτικοποίησης (LOQ).....	98
6.8	Έλεγχος Πιστότητας (Precision)	98
6.8.1	Έλεγχος Επαναληψιμότητας (Repeatability).....	98
6.8.2	Έλεγχος Ενδιάμεσης πιστότητας (Intermediate Precision)	100
6.9	Έλεγχος Σταθερότητας (Stability)	101
6.10	Έλεγχος Ανθεκτικότητας (Robustness)	103
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7		106
ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΕΚΧΥΛΙΖΟΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ (REAL SAMPLE)		106
7.1	Είδη δειγμάτων	106
7.2	Στάδια προκατεργασίας δείγματος	107
7.3	Ανάλυση - Προσδιορισμός “leachables” ουσιών σε άγνωστο δείγμα με LC-MS 107	
7.4	Αποτελέσματα	108
7.4.1	Δοκιμασία καταλληλότητας συστήματος (System suitability testing)	109
7.4.2	Ανάλυση διαλύματος τελικού προϊόντος	111
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8		114
ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....		114
8.1	Αποτελέσματα και Συζήτηση	114
8.2	Μελλοντική Έρευνα	115

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 5.1: Στάδια αναλυτικής μεθόδου σε δείγμα βορικοναζόλης	64
Σχήμα 7.1: Στάδια προκατεργασίας των δύο δειγμάτων «Final Product» και «Control».....	107

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: Δέντρο απόφασης για ταυτοποίηση και αξιολόγηση ουσιών μετανάστευσης.....	27
Εικόνα 2.1: Απεικόνιση χημικής δομής βορικοναζόλης.....	31
Εικόνα 2.2: Βορικοναζόλη και βασικές προσμίξεις δραστικής ουσίας.....	32
Εικόνα 3.1: Στάδια διεξαγωγής SPE	46
Εικόνα 3.2: Διάταξη οργανολογίας GC-MS.....	49
Εικόνα 3.3: Πορείες χημικού ιοντισμού (CI)	51
Εικόνα 3.4: Σχηματικό διάγραμμα πορείας ESI	54
Εικόνα 3.5: Σχηματικό διάγραμμα πορείας APCI.....	56
Εικόνα 3.6: Απεικόνιση διάταξης τριπλού τετράπολου (QqQ)	57
Εικόνα 5.1: Τριπλό τετράπολο – Λειτουργία πλήρους σάρωσης (Full-Scan) MS	82
Εικόνα 6.1: Χρωματογραφήματα ιόντος εσωτερικού προτύπου για το μη εμβολιασμένο διάλυμα (πάνω) και το εμβολιασμένο διάλυμα (κάτω), σε λειτουργία θετικού ιοντισμού (ESI(+)).....	88
Εικόνα 6.2: Χρωματογραφήματα ιόντος εσωτερικού προτύπου για το μη εμβολιασμένο διάλυμα (πάνω) και το εμβολιασμένο διάλυμα (κάτω), σε λειτουργία αρνητικού ιοντισμού (ESI(-)).....	89
Εικόνα 7.1: Κορυφές αναλυτών στόχων στο διάλυμα SST-1, για τον έλεγχο καταλληλότητας του συστήματος, σε λειτουργία θετικού ιοντισμού(ESI (+)).....	110
Εικόνα 7.2: Κορυφές αναλυτών στόχων στο διάλυμα SST-1, για τον έλεγχο καταλληλότητας του συστήματος, σε λειτουργία αρνητικού ιοντισμού(ESI (-))	111

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1: Πηγές απελευθέρωσης ουσιών μετανάστευσης.....	21
Πίνακας 1.2: Παραδείγματα βαθμού ανησυχίας για κοινές κατηγορίες φαρμακευτικών προϊόντων	29
Πίνακας 2.1: Χαρακτηριστικά βορικοναζόλης	31
Πίνακας 2.2: Σύνθεση τελικού προϊόντος και ρόλος εκδόχων που προστίθενται.....	33
Πίνακας 3.1: Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα τεχνικής LC-MS	52
Πίνακας 3.2: Πηγές ιοντισμού στο MS και λειτουργία τους	53
Πίνακας 3.3: Λειτουργίες σάρωσης τριπλού τετράπολου (QqQ).....	58
Πίνακας 5.1: Σύνθεση διαλύματος προϊόντος στην προ-λυοφιλοποιημένη μορφή	64
Πίνακας 5.2: Σύνθεση τελικού προϊόντος Voriconazole 200 mg / φιαλίδιο σκόνη προς έγχυση	65
Πίνακας 5.3: Μέρη συσκευασίας τελικού προϊόντος	65
Πίνακας 5.4: Χημικές ουσίες αναφοράς (CRS) (Πλαστικοποιητές) που θα χρησιμοποιηθούν ως αναλύτες στόχοι για την επικύρωση της LC-MS μεθόδου	67
Πίνακας 5.5: Συντακτικοί τύποι πλαστικοποιητών	68
Πίνακας 6.1: Ανίχνευση αναλυτών (πλαστικοποιητών) με βάση το λόγο m/z.....	86
Πίνακας 6.2: Δεδομένα από τον έλεγχο γραμμικότητας σε καθαρά διαλύματα	90
Πίνακας 6.3: Δεδομένα από τον έλεγχο γραμμικότητας σε διαλύματα που προσομοιάζουν τη μήτρα του τελικού προϊόντος	91
Πίνακας 6.4: Επίδραση μήτρας στον προσδιορισμό ουσιών μετανάστευσης	93
Πίνακας 6.5: Δεδομένα από τον έλεγχο ακρίβειας της μεθόδου σε λειτουργία θετικού ιοντισμού	95
Πίνακας 6.6: Δεδομένα από τον έλεγχο ακρίβειας της μεθόδου σε λειτουργία αρνητικού ιοντισμού	97
Πίνακας 6.7: Δεδομένα από τον έλεγχο επαναληψιμότητας της μεθόδου.....	99

Πίνακας 6.8: Δεδομένα από τον έλεγχο ενδιάμεσης πιστότητας της μεθόδου	101
Πίνακας 6.9: Δεδομένα από τον έλεγχο σταθερότητας της μεθόδου	102
Πίνακας 7.1: Ουσίες («leachable») που ανιχνεύτηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν σε συγκεντρώσεις κοντά ή άνω του ορίου ΑΕΤ, στη λειτουργία θετικού ιοντισμού, ESI(+), όσον αφορά στα δύο είδη δειγμάτων	112

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή ειδίκευσης εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Χημική Ανάλυση – Έλεγχος Ποιότητας».

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Κουππάρη Μιχαήλ, Καθηγητή Αναλυτικής Χημείας–Φαρμακευτικής Ανάλυσης και επιβλέποντα της ερευνητικής εργασίας, για όλη την επιστημονική καθοδήγηση, και την συνεχή εμπιστοσύνη που μου παρείχε κατά τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής.

Ιδιαίτερα σημαντική για την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής, ήταν και η υποστήριξη που μου παρείχε σε όλα τα στάδια ο κ. Νικόλαος Κρητικός, καθοδηγώντας με ανά πάσα στιγμή και ώρα, με επιστημονικές και όχι μόνο συμβουλές. Ευχαριστώ πολύ από καρδιάς όλους τους ερευνητές του εργαστηρίου, για τη βοήθειά τους και το ευχάριστο κλίμα που δημιουργούσαν καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, που ήταν κοντά μου ανεξαρτήτως συνθηκών, παρέχοντάς μου συνεχή και ηθική υποστήριξη σε αυτή μου την προσπάθεια.

Αθήνα, Φεβρουάριος 2020

Χριστίνα Σ. Κωνσταντίνου

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΜΕΛΕΤΕΣ ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗΣ

1.1 Εισαγωγή

Οι μελέτες μετανάστευσης (migration studies) είναι εργαστηριακές μελέτες που πραγματοποιούνται για τη διερεύνηση της ποιοτικής και ποσοτικής φύσης μιας ουσίας που μεταναστεύει από υλικό συσκευασίας/παραγωγής στο περιεχόμενο ενός φαρμακευτικού προϊόντος, με σκοπό την εύρεση ενός συγκεκριμένου προφίλ αυτής, στο τέλος της διάρκειας ζωής του εκάστοτε φαρμακευτικού προϊόντος. [1]

Μια επιστημονικά βάσιμη αξιολόγηση των ουσιών που μεταναστεύουν είναι σημαντική για τους κατασκευαστές, όσο και για τους διάφορους προμηθευτές τους, κυρίως ως μέσο για τον καθορισμό της καταλληλότητας των συστημάτων συσκευασίας/διανομής που προορίζονται για χρήση, λαμβάνοντας πάντα υπόψιν τις ισχύουσες νομικές και κανονιστικές απαιτήσεις που διέπουν την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία. Οι ουσίες που μεταναστεύουν μπορούν δυνητικά να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα του φαρμακευτικού προϊόντος, την ασφάλεια και την ποιότητά του. Οι πηγές από τις οποίες απελευθερώνονται είναι πολλές και αναφέρονται στον Πίνακα 1.1.

Πίνακας 1.1: Πηγές απελευθέρωσης ουσιών μετανάστευσης [2]

α/α	Πηγές
1	Πλαστικά συστήματα συσκευασίας & Υλικά κατασκευής
2	Πλαστικά συστήματα συσκευασίας (αφορά την τελική συσκευασία)
3	Πλαστικά συστήματα παραγωγής (Σωληνώσεις, Φίλτρο παραγωγής)
4	Πλαστικές Ιατρικές συσκευασίες για μεταφορά και διαχείριση των φαρμακευτικών προϊόντων

1.2 Βασικές Έννοιες και Ορισμοί

Leachables: είναι οργανικές και ανόργανες χημικές ενώσεις που μεταναστεύουν από ένα σύστημα τελικής συσκευασίας/διανομής, από ένα συστατικό/ εξάρτημα της τελικής συσκευασίας ή από ένα υλικό κατασκευής της τελικής συσκευασίας σε ένα φαρμακευτικό προϊόν υπό κανονικές συνθήκες αποθήκευσης και χρήσης ή κατά τη διάρκεια επιταχυνόμενων μελετών σταθερότητας του φαρμακευτικού προϊόντος (accelerated stability studies). Οι ουσίες αυτές μεταναστεύουν μετά το πέρας της διάρκειας ζωής του φαρμακευτικού σκεύασματος. Επιπλέον, οι χημικές ουσίες μπορούν να απελευθερωθούν από τα συστήματα συσκευασίας/διανομής σε ασθενείς μέσω της άμεσης επαφής. [1-3]

Οι μελέτες μετανάστευσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο πλαίσιο μιας ολικής αξιολόγησης των ουσιών που μπορεί να μεταναστεύσουν («leachables»), με στόχο να διευκολύνουν τον προσδιορισμό των ουσιών, των οποίων η παρουσία προκαλεί αποτελέσματα εκτός προδιαγραφών (OOS) για ένα προϊόν, να καθιερώσουν τη χειρότερη περίπτωση (worst-case scenario) στο προφίλ μιας «leachable» ουσίας, και να εντοπίσουν τις τάσεις στα επίπεδα συσσώρευσης των χημικών ουσιών που απελευθερώνονται.

Extractables: Είναι οργανικές και ανόργανες χημικές οντότητες που μπορούν να απελευθερωθούν από ένα σύστημα συσκευασίας/διανομής, εξάρτημα της συσκευασίας ή υλικό συσκευασίας κατά την παραγωγή της, σε ένα φαρμακευτικό προϊόν υπό εξαναγκασμένες εργαστηριακές συνθήκες. Ανάλογα με τον ειδικό σκοπό της μελέτης της εκχύλισης, αυτές οι εργαστηριακές συνθήκες (π.χ. διαλύτης, θερμοκρασία, στοιχειομετρία, κ.λπ.) μπορούν να επιταχύνουν ή να επιδεινώσουν τις κανονικές συνθήκες αποθήκευσης και χρήσης για ένα φαρμακευτικό σκεύασμα. Οι ουσίες που εκχυλίζονται ή οι ενώσεις που προέρχονται από αυτές, έχουν τη δυνατότητα να εισέλθουν σε ένα φαρμακευτικό προϊόν κάτω από κανονικές συνθήκες αποθήκευσης και χρήσης. [3]

Extraction Studies: Είναι οι συνολικές εργαστηριακές διεργασίες εκχύλισης από τα συστατικά μιας συσκευασίας, ή από τα υλικά κατασκευής που απαιτούνται, προκειμένου να δημιουργηθεί το προφίλ των ουσιών αυτών. Οι μελέτες εκχύλισης αναφέρονται συχνά ως «Ελεγχόμενες Μελέτες Εκχύλισης».
[2]

Characterization (Χαρακτηρισμός): είναι η ανακάλυψη, ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση της κάθε οργανικής και ανόργανης ουσίας που μεταναστεύει, η οποία βρίσκεται σε ένα φαρμακευτικό σκεύασμα πάνω από ένα προκαθορισμένο επίπεδο ή όριο. Τα όρια βασίζονται κυρίως σε ζητήματα ασφάλειας των ασθενών, και δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στις δυνατότητες της αναλυτικής τεχνολογίας, και σε άλλα συναφή θέματα. [3]

Identification (Ταυτοποίηση): είναι η διαδικασία για την εύρεση μιας μοριακής δομής της οργανικής ουσίας που μεταναστεύει ή την εύρεση των συστατικών στοιχείων της, σε περίπτωση που είναι ανόργανη χημική ένωση.
[3]

Quantitation (Ποσοτικοποίηση): είναι η διαδικασία για τη μέτρηση του επιπέδου, ή της συγκέντρωσης, μιας οργανικής ή ανόργανης ουσίας που μεταναστεύει και εμπεριέχεται σε ένα φαρμακευτικό σκεύασμα. [3]

Leachables Profiles: είναι το ποιοτικό ή/και ποσοτικό αναλυτικό προφίλ του περιεχομένου της ουσίας που μεταναστεύει και εμπεριέχεται σε ένα συγκεκριμένο φαρμακευτικό σκεύασμα. [3]

Οι πιθανές αυτές ουσίες έχουν μια σημαντική χημική ποικιλία, και ως εκ τούτου, μια ποικιλία φυσικών και χημικών ιδιοτήτων, συμπεριλαμβανομένης της πολικότητας, της πτητικότητας και της διαλυτότητας. Ενώ, σχετικά πτητικές ενώσεις μπορούν να μεταναστεύσουν πιο εύκολα σε οποιοδήποτε τύπο σκευάσματος μέσω έμμεσης επαφής, μη πτητικές ενώσεις απαιτούν

γενικά άμεση επαφή. Οι πτυχές που πρέπει να εξεταστούν ως προς την επαφή είναι δύο: Η φύση της επαφής με το σκεύασμα (δηλαδή, άμεση ή έμμεση) και η διάρκεια της επαφής (παροδική ή συνεχής). [4]

1.3 Οριακές Τιμές Ασφαλείας

Τα όρια που έχουν προταθεί ειδικά για τις χημικές ουσίες που απελευθερώνονται σε ένα φαρμακευτικό προϊόν, βασίζονται, είτε σε θεωρίες για την ασφάλεια των ασθενών, είτε στις τρέχουσες δυνατότητες της αναλυτικής τεχνολογίας. Τα όρια ασφαλείας είναι ιδιαίτερα σημαντικά, επειδή οι σύγχρονες αναλυτικές τεχνικές επιτρέπουν την ανίχνευση ιχνών οργανικών και ανόργανων χημικών οντοτήτων σε εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα (δηλαδή, ng/mL, ng/g). Τα όρια ασφαλείας επιτρέπουν έναν επιστημονικό προσδιορισμό των αποδεκτών επιπέδων των ουσιών και μπορούν να βασιστούν σχετικά με την αξιολόγηση κινδύνου, σε αποτελέσματα από προκλινικές μελέτες έκθεσης, όπως επίσης και σε πρόσθετους παράγοντες κινδύνου για την ασφάλεια, όπως η οδός χορήγησης, η καθημερινή έκθεση, και η διάρκεια της θεραπείας. Επειδή τα όρια ασφαλείας προκύπτουν από τα στοιχεία της έκθεσης, θεωρούνται ως μονάδες έκθεσης, όπως η συνολική ημερήσια πρόσληψη (TDI). Έτσι, οποιοδήποτε όριο πρέπει να μετατραπεί σε μονάδες συγκέντρωσης (π.χ., μg/mL), ώστε να μπορεί να εφαρμοστεί ως ένα αναλυτικό όριο στο εργαστήριο. [5]

Τα όρια ασφαλείας που εφαρμόζονται στις μελέτες μετανάστευσης είναι τα εξής:

Threshold of Toxicological Concern (TTC): είναι ένα επίπεδο της ανθρώπινης πρόσληψης ή έκθεσης που θεωρείται ότι είναι αμελητέου κινδύνου, παρά την απουσία των ειδικών χημικών δεδομένων τοξικότητας. [3, 6]

Safety Concern Threshold (SCT): είναι το όριο κάτω από το οποίο μια ουσία που μεταναστεύει θα είχε μια δόση τόσο χαμηλή, ώστε να παρουσιάζει αμελητέες ανησυχίες για την ασφάλεια από καρκινογόνες και μη καρκινογόνες τοξικές επιδράσεις. [3,5]

Για γενotoξικές ουσίες (genotoxic) οφθαλμικών ή παρεντερικών φαρμακευτικών σκευασμάτων, το SCT ανέρχεται στα 1,5 μg/ημέρα, ενώ για ερεθιστικές (irritant) ή ευαισθησιογόνες ουσίες (sensitizer) οφθαλμικών ή παρεντερικών φαρμακευτικών σκευασμάτων, το SCT ανέρχεται στα 5,0 μg/ημέρα. [3]

Qualification Threshold (QT): είναι το όριο κάτω από το οποίο μια δεδομένη μη καρκινογόνος ουσία μετανάστευσης δεν εξετάζεται ως προς την πιστοποίηση ασφάλειας (τοξικολογικές εκτιμήσεις), εκτός και αν η ουσία παρουσιάζει ανησυχίες ως προς τη σχέση δομής-δράσης (SAR). [3, 5]

Analytical Evaluation Threshold (AET): είναι το όριο στο ή πάνω από το οποίο μια ουσία μετανάστευσης θα πρέπει να χαρακτηρίζεται και να αναφέρεται για τοξικολογική αξιολόγηση. Το AET μπορεί να υπολογιστεί με μαθηματικό τρόπο από το SCT (ή άλλα όρια) με βάση παράγοντες που περιλαμβάνουν τις παραμέτρους δοσολογίας του φαρμακευτικού προϊόντος. [3, 7]

Ένας γενικός τύπος για τη μετατροπή του SCT μιας γενotoξικής ουσίας (1,5 μg/ημέρα) στο όριο AET δίνεται παρακάτω:

$$\text{AET} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{container}} \right) = \left(\frac{1,5 \mu\text{g/day}}{\text{doses/day}} \right) \times \left(\frac{\text{labeled doses}}{\text{container}} \right) \quad (1.1)$$

Για υγρές μορφές δοσολογίας:

$$\text{AET} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = \frac{\mu\text{g}}{\text{container}} \div \frac{\text{mL}}{\text{container}} \quad (1.2)$$

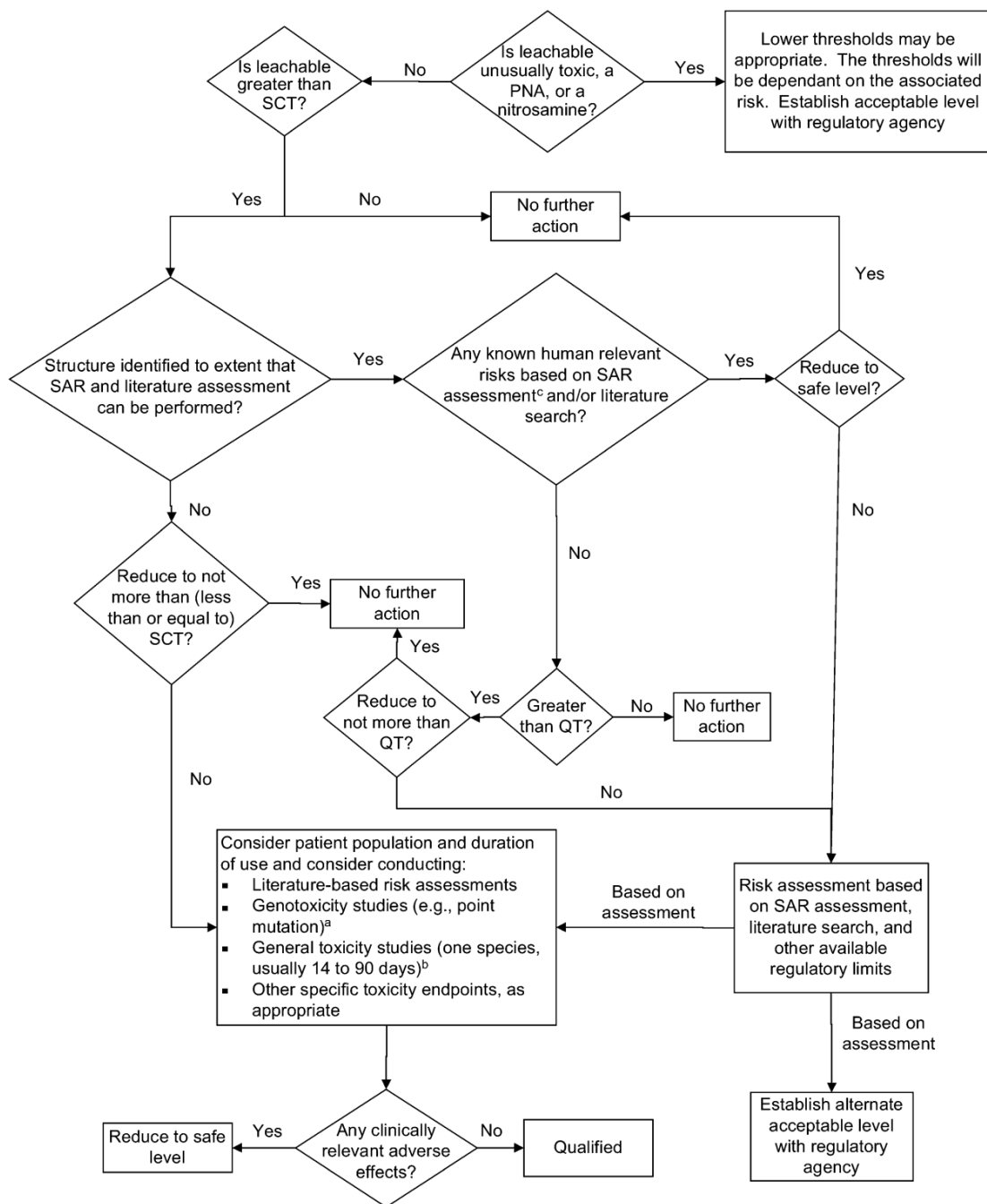
Για στερεές μορφές δοσολογίας:

$$\text{AET} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right) = \frac{\mu\text{g}}{\text{container}} \div \frac{\text{g}}{\text{container}} \quad (1.3)$$

Το όριο ΑΕΤ καθορίζει αφενός το επίπεδο στο οποίο οι άγνωστες ουσίες της μετανάστευσης, θα πρέπει να προσδιοριστούν και να ποσοτικοποιηθούν σε ένα συγκεκριμένο φαρμακευτικό προϊόν, και αφετέρου το επίπεδο που θα χρησιμοποιηθεί ως βάση για την ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου.

Ένα παράδειγμα ορίου ασφαλείας που έχει ουσιαστικά εφαρμοστεί στην ανάπτυξη φαρμακευτικών προϊόντων είναι το όριο TTC. Η προσέγγιση TTC εγκρίθηκε από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (EMA) για να αξιολογήσει γενotoξικές προσμίξεις, χρησιμοποιώντας έναν παράγοντα κινδύνου καρκίνου 10^{-5} (1 στις 100.000). Το προτεινόμενο όριο ασφαλείας του EMA για γενotoξικές προσμίξεις με τη χρήση του TTC, είναι 1,5 μg/ημέρα.

Ο οργανισμός PQRI (Product Quality Research Institute) πρότεινε ένα «δέντρο απόφασης» (Εικόνα 1.1) για την αξιολόγηση των ουσιών της μετανάστευσης. [8]



Εικόνα 1.1: Δέντρο απόφασης για ταυτοποίηση και αξιολόγηση ουσιών μετανάστευσης [7]

1.4 Σκοπός Μελετών Μετανάστευσης

Η διαχείριση των ουσιών μετανάστευσης είναι σημαντική για τους παραγωγούς των φαρμακευτικών και βιοτεχνολογικών/βιολογικών προϊόντων και τις κανονιστικές αρχές, επειδή ορισμένες από αυτές που βρίσκονται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες, μπορούν να παρουσιάσουν ανησυχίες για την ασφάλεια των ασθενών ή και θέματα συμβατότητας στα φαρμακευτικά σκευάσματα. Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1980, ο Αμερικανικός Οργανισμός Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων (FDA) άρχισε επισήμως και διεξοδικά να καταγράφει τις ουσίες που απελευθερώνονται στα φαρμακευτικά προϊόντα ύστερα από ευρήματα ευαισθησίας των ασθενών, που προκλήθηκαν από χημικές ουσίες, σχετικές με την μετανάστευση. [9, 10] Από τότε, η διαχείριση των ουσιών αυτών για τα συστήματα συσκευασίας και τα τελικά προϊόντα φαρμάκων, έχει γίνει ένα σημαντικό μέρος της ανάπτυξης φαρμακευτικών προϊόντων και των κανονιστικών προδιαγραφών για πολλούς τύπους δοσολογίας, ιδιαίτερα για εκείνους του υψηλού κινδύνου, ως προς την αλληλεπίδραση με το σύστημα συσκευασίας, αλλά και ως προς την οδό χορήγησης. [11, 12] Τα είδη των φαρμακευτικών σκευασμάτων υψηλού και χαμηλού κινδύνου παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.2.

Δοσομετρικές μορφές υψηλού κινδύνου περιλαμβάνουν: εισπνεόμενα αερολύματα και διαλύματα, ενέσιμα και ενέσιμα εναιωρήματα, οφθαλμικά και διαδερμικά επιθέματα και αλοιφές. Είναι σημαντικό να σημειωθεί, ωστόσο, ότι ακόμη και οι χαμηλού κινδύνου δοσομετρικές μορφές παρουσιάζουν κάποιο κίνδυνο και ότι οι κατάλληλες και αυστηρές αξιολογήσεις των ουσιών μπορούν να αποβούν σημαντικές σε συγκεκριμένα φαρμακευτικά προϊόντα σε κατηγορίες δοσολογίας χαμηλότερου κινδύνου (π.χ. τοπικές και δια του στόματος μορφές). [13]

Πίνακας 1.2: Παραδείγματα βαθμού ανησυχίας για κοινές κατηγορίες φαρμακευτικών προϊόντων [13]

Βαθμός ανησυχίας σχετικά με την οδό χορήγησης	Πιθανότητα αλληλεπίδρασης της συσκευασίας με το σκεύασμα		
	Υψηλή	Μέτρια	Χαμηλή
Υψηλός	Εισπνεόμενα αερολύματα και Σπρέι	Ενέσιμα και Ενέσιμα εναιωρήματα Εισπνεόμενα διαλύματα	Αποστειρωμένες κόνεις και κόνεις για ένεση Εισπνεόμενες κόνεις
Μέτριος	Διαδερμικά Επιθέματα Αλοιφές	Οφθαλμικά διαλύματα και εναιωρήματα Ρινικά αερολύματα και Σπρέι	-
Χαμηλός	Τοπικά διαλύματα και εναιωρήματα Τοπικά και γλωσσικά αερολύματα Στοματικά διαλύματα και εναιωρήματα	-	Στοματικά δισκία και κάψουλες (σκληρής/μαλακής ζελατίνης) Τοπικές κόνεις Δια του στόματος κόνεις

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

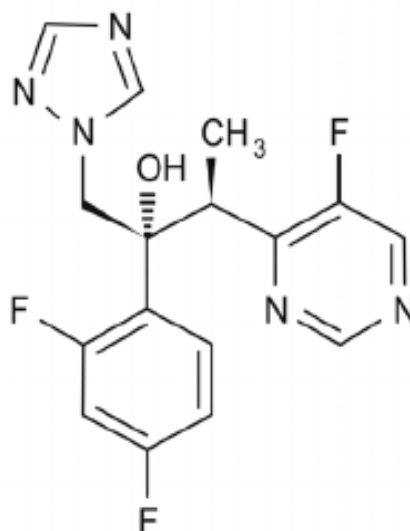
ΒΟΡΙΚΟΝΑΖΟΛΗ

2.1 Εισαγωγή – Χρήσεις

Η βορικοναζόλη είναι ένα αντιμυκητιασικό φάρμακο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία ορισμένων μυκητιασικών λοιμώξεων, όπως η ασπεργίλλωση, η καντιντίαση, ο έλεγχος της κοκκιδιοειδομυκητίασης, η ιστοπλάσμωση, η πενικιλίωση και λοιμώξεις από τα είδη μυκήτων *Scedosporium* και *Fusarium*, τα οποία μπορεί να εμφανιστούν σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων που υποβάλλονται σε αλλογενή μεταμόσχευση μυελού των οστών (BMT), οι οποίοι έχουν αιματολογικούς καρκίνους ή υποβάλλονται σε μεταμοσχεύσεις οργάνων. Μπορεί να λαμβάνεται από το στόμα ή να χορηγείται με ενδοφλέβια έγχυση. [14]

2.2 Φυσικά και Χημικά Χαρακτηριστικά

Η βορικοναζόλη (voriconazole) είναι μία λευκή σκόνη, η οποία ανήκει στα τριαζολικά αντιμυκητιασικά δεύτερης γενιάς και αποτελεί συνθετικό παράγωγο της φλουκοναζόλης. Αποτελείται από μία βουτανόλη συνδεδεμένη με τρεις αρωματικούς δακτυλίους. Η βορικοναζόλη είναι τριαζολικό αντιμυκητιασικό, λόγω του ότι ο πρώτος άνθρακας της βουτανόλης συνδέεται με μία τριαζόλη. Στον δεύτερο άνθρακα της βουτανόλης υπάρχει μια υποκατάσταση με έναν βενζολικό πυρήνα, στις θέσεις 2 και 4 του οποίου υπάρχει φθόριο. Τέλος, ο τρίτος άνθρακας της βουτανόλης συνδέεται με έναν εξαμελή ετεροκυκλικό δακτύλιο υποκατεστημένο με φθόριο, τον 5-φθοροπυριμιδινο-4-υλο-δακτύλιο. Ως προς τη διαλυτότητα, είναι λογικό η βορικοναζόλη, όντας άπολη, να διαλύεται σε άπολους οργανικούς διαλύτες, όπως η αιθανόλη, η ακετόνη, το μεθυλενοχλωρίδιο και το διμεθυλοσουλφοξειδιο (dimethylsulfoxide, DMSO). [14, 15]



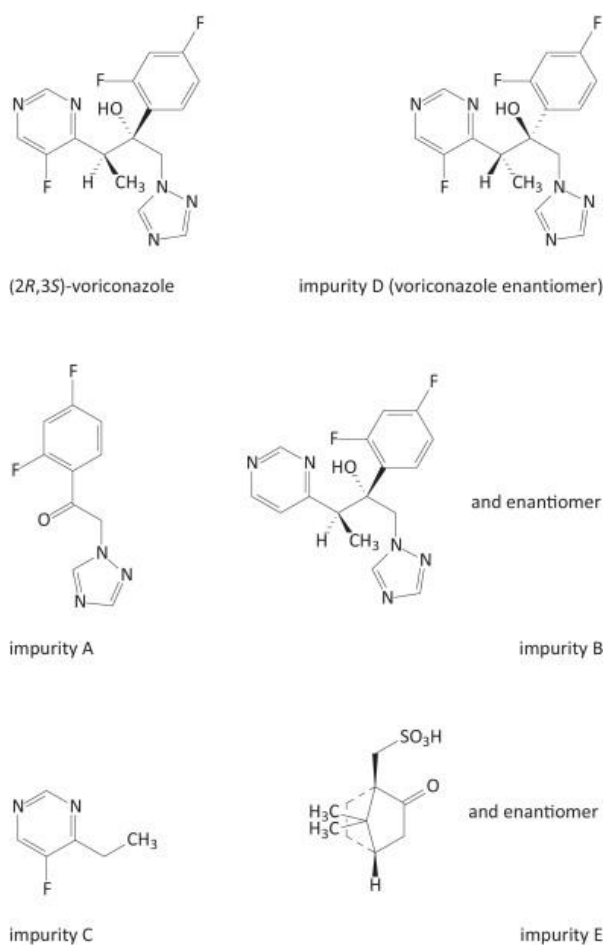
Εικόνα 2.1: Απεικόνιση χημικής δομής βορικοναζόλης [16, 17]

Πίνακας 2.1: Χαρακτηριστικά βορικοναζόλης [14,15]

Γενικά Χαρακτηριστικά και Φυσικοχημικές Ιδιότητες	
Όνομα κατά IUPAC	(2R,3S)-2-(2,4-difluorophenyl)-3-(5-fluoropyrimidin-4-yl)-1-(1,2,4-triazol-1-yl)butan-2-ol
CAS number	137234-62-9
Μοριακός Τύπος	C ₁₆ H ₁₄ F ₃ N ₅ O
Σχετική Μοριακή μάζα	349,317
Ακριβής Μάζα	349,115
Εμφάνιση	Λευκή έως υπόλευκη σκόνη
Σημείο τήξης	127 – 130 °C
Σημείο βρασμού	508,6 °C
Διαλυτότητα	9,78 × 10 ⁻² g/L στο νερό Διαλυτή σε αιθανόλη, ακετόνη, μεθυλενοχλωρίδιο και DMSO
LogP	1,0
Θερμοκρασία αποθήκευσης του προϊόντος	15 – 30 °C για το μη ανασυσταθέν προϊόν, ενώ 5 ± 3 °C για το ανασυσταθέν προϊόν (για 24 ώρες)

2.3 Προσμίξεις

Κατά την ανάλυση δείγματος βορικοναζόλης, είναι δυνατόν να ανιχνευτούν αρκετές προσμίξεις (impurities). Αυτές μπορεί να προέρχονται από υπολείμματα πρώτων υλών, από προσμίξεις κατά την παραγωγική διαδικασία και από προϊόντα αποικοδόμησης. Στην Εικόνα 2.2, φαίνονται οι γνωστές προσμίξεις (A, B, C, D και E) που έχουν ανιχνευτεί σε σκευάσματα βορικοναζόλης. Σύμφωνα με την ευρωπαϊκή φαρμακοποιία, οι προσμίξεις A, B και C, στην πρώτη ύλη, δεν πρέπει να υπερβαίνουν έκαστη το 0,15%, ενώ η πρόσμιξη D, αντίστοιχα, το 0,2%. Όσον αφορά στην πρόσμιξη E, το όριο είναι 0,1%, ενώ το άθροισμα των πέντε γνωστών και των άγνωστων προσμίξεων της βορικοναζόλης στην πρώτη ύλη δεν πρέπει να ξεπερνάει το 0,5%. Οι διαδικασίες ελέγχου ποιότητας (QC) για την ανίχνευση προσμίξεων σε ένα φαρμακευτικό σκεύασμα, είναι υποχρεωτικές και διεξάγονται με HPLC. [16, 18, 19]



Εικόνα 2.2: Βορικοναζόλη και βασικές προσμίξεις δραστικής ουσίας [16, 20]

2.4 Έκδοχα

Η σύνθεση του τελικού προϊόντος με δραστική τη βορικοναζόλη, καθώς επίσης και ο ρόλος των εκδόχων που εμπεριέχονται, παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2: Σύνθεση τελικού προϊόντος και ρόλος εκδόχων που προστίθενται [21]

Συστατικό	Ρόλος
Βορικοναζόλη	Δραστική ουσία
Υδροξυπροπυλο-βητα-κυκλοδεξτρίνη	Παράγοντας συμπλοκοποίησης και διαλυτοποίησης
Χλωριούχο νάτριο	Παράγοντας τονικότητας
Υδροχλωρικό οξύ (1N)	Παράγοντας ρύθμισης pH πριν τη λυοφιλοποίηση (pH 5,4-5,8)

2.5 Μηχανισμός Δράσης

2.5.1 Φαρμακοκινητική

Η φαρμακοκινητική της βορικοναζόλης έχει μελετηθεί κυρίως σε υγιείς εθελοντές και σε ορισμένους ασθενείς με κίνδυνο εμφάνισης μυκητιασικών λοιμώξεων, μετά από του στόματος, ενδοφλέβια και σε μετάβαση από ενδοφλέβια σε από του στόματος χορήγηση. [22]

Απορρόφηση

Η βορικοναζόλη απορροφάται ταχέως μετά από την από του στόματος χορήγηση και οι μέγιστες συγκεντρώσεις αυτής στο πλάσμα (C_{max}) επιτυγχάνονται μέσα σε 2 ώρες από τη χορήγηση. [23] Συγκεκριμένα το T_{max} (χρόνος επίτευξης της μέγιστης συγκέντρωσης) της κυμαίνεται από 1,43 έως 1,81 ώρες. [24, 25] Η συγκέντρωση της βορικοναζόλης στο πλάσμα σταθεροποιείται μέσα σε 5 με 7 ημέρες μετά από πολλαπλές δόσεις του φαρμάκου από του στόματος και για αυτό τον λόγο το φάρμακο χορηγείται και ως δόση εφόδου ενδοφλεβίως την πρώτη ημέρα θεραπείας με αποτέλεσμα να

μειώνεται ο χρόνος επίτευξης της σταθεροποιημένης κατάστασης (Steady State). Η βιοδιαθεσιμότητά της υπολογίζεται να είναι >90% (90%-96%) και δε φαίνεται να επηρεάζεται από τη δόση, όπως επίσης και από το γαστρικό pH, όπως παρατηρείται με άλλες αζόλες. [5, 22, 24]

Κατανομή

Η βορικοναζόλη χαρακτηρίζεται από μεγάλο όγκο κατανομής (Vd), οι τιμές του οποίου σε σταθεροποιημένη κατάσταση κυμαίνονται από 2 έως 4,6L/Kg. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την εκτεταμένη κατανομή της στα εξωκυτάρια, αλλά και ενδοκυτάρια διαμερίσματα του οργανισμού. Εξάλλου, ο μεγάλος όγκος κατανομής που εμφανίζει δικαιολογείται και από την υψηλή λιποφιλικότητά της. [26] Παρ' όλα αυτά, όσον αφορά στη κατανομή της βορικοναζόλης σε συγκεκριμένους ιστούς, οι πληροφορίες είναι λιγοστές δεδομένου ότι ελάχιστες είναι και οι πληροφορίες σχετικά με την εναπόθεση των μυκήτων στα διάφορα σημεία των λοιμώξεων. [22] Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν πολλά στοιχεία που αποδεικνύουν πως η βορικοναζόλη κατανέμεται επαρκώς στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY), στο υαλοειδές και υδατοειδές υγρό των οφθαλμών, σημεία τα οποία έχουν μελετηθεί εκτενώς λόγω της σοβαρότητας και της συχνότητας των μυκητιασικών λοιμώξεων που τα προσβάλλουν, αλλά και στα οστά, στους πνεύμονες και σε άλλα διαμερίσματα του οργανισμού.

Βιομετατροπή

Η βορικοναζόλη απομακρύνεται από τον οργανισμό κυρίως μέσω της μεταβολικής κάθαρσης, με λιγότερο από 2% της χορηγούμενης δόσης να απεκκρίνεται αμετάβλητη με τα ούρα, γεγονός που υποδηλώνει τον εκτεταμένο μεταβολισμό της. Η βιομετατροπή της βορικοναζόλης πραγματοποιείται κυρίως από το ισοένζυμο CYP2C19 και σε μικρότερο βαθμό από τα ισοένζυμα CYP3A4 και CYP2C9 του κυτοχρώματος P450 και χαρακτηρίζεται από μη γραμμική φαρμακοκινητική λόγω κορεσμού του συστήματος του ηπατικού μεταβολισμού της. [22, 24, 25] Πρέπει να τονιστεί πως η ουσία δεν αποτελεί μόνο υπόστρωμα των παραπάνω ισοενζύμων

αλλά δρά και ως αναστολέας τους. [22, 27, 28] Όπως αναφέρεται σε έγγραφο της παρασκευάστριας εταιρείας κατά την υποβολή της αίτησης για τη κυκλοφορία του φαρμάκου το 2001, η βορικοναζόλη βιομετατρέπεται στο ήπαρ σε τουλάχιστον 8 διαφορετικούς μεταβολίτες. [29]

Απομάκρυνση

Όπως προαναφέρθηκε, λιγότερο από 2% της χορηγούμενης δόσης της βορικοναζόλης απεκκρίνεται αμετάβλητη με τα ούρα. [5] Από το 98% που αποτελείται από τους μεταβολίτες της, το 80% απομακρύνεται και αυτό με τα ούρα και το υπόλοιπο 20% με τα κόπρανα. [22, 24, 25] Η βορικοναζόλη είναι ένα φάρμακο που χαρακτηρίζεται από μικρή έως μέτρια τιμή ολικής κάθαρσης και η οποία ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων μελετών και κυμαίνεται από 15 έως 35,25L/h. [26] Η ολική δόση του φαρμάκου, είτε μετά από ενδοφλέβια, είτε μετά από per os χορήγηση, αποβάλλεται μέσα σε 48 ώρες ενώ ο χρόνος ημίσειας ζωής της υπολογίζεται περίπου στις 6 ώρες μετά από μία μονή ή πολλαπλές δόσεις βορικοναζόλης από του στόματος ή ενδοφλεβίως. Γενικά, οι μέσες τιμές του χρόνου ημιζωής είναι μεγαλύτερες μετά από πολλαπλές δόσεις του φαρμάκου και σχετίζονται με μεγαλύτερη συσσώρευση του στον οργανισμό σε σύγκριση με τις μονοδόσεις. [22]

2.5.2 Φαρμακοδυναμική

Οι αντιμυκητιασικοί παράγοντες, όπως η βορικοναζόλη είναι ουσίες που καταστρέφουν τους μύκητες, καταστέλλοντας την ικανότητά τους να αναπτύσσονται ή να αναπαράγονται. Οι μύκητες παράγουν τα συστατικά της κυτταρικής τους μεμβράνης χρησιμοποιώντας την εργοστερόλη. Η σύνθεση της εργοστερόλης λαμβάνει χώρα με τη βοήθεια του ενζύμου απομεθυλάση της 14-αλφα-λανοστερόλης και του συμπλέγματος ενζύμων CYP450. Η βορικοναζόλη αναστέλλει τη σύνθεση της εργοστερόλης εμποδίζοντας τη σύνδεση της απομεθυλάσης της 14-αλφα-λανοστερόλης με το σύμπλεγμα ενζύμων CYP450. Η αναστολή της απομεθυλάσης της 14-αλφα-λανοστερόλης έχει ως αποτέλεσμα την εξάντληση της εργοστερόλης στην

κυτταρική μεμβράνη των μυκήτων, τη λύση των κυττάρων του μύκητα και επομένως την παρεμπόδιση της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού του. [15,21, 30]

2.6 Χορήγηση

Η βορικοναζόλη χορηγείται από του στόματος και ενδοφλέβια. Από του στόματος χορηγείται με τη μορφή δισκίων και με τη μορφή κόνεως για πόσιμο εναιώρημα και ενδοφλέβια υπό τη μορφή λυοφιλοποιημένης σκόνης, η οποία πρέπει να αναμιχθεί με ένα υγρό (αραιωτικό) πριν χρησιμοποιηθεί ως διάλυμα προς έγχυση.

Οι φαρμακοτεχνικές μορφές της βορικοναζόλης σε συνδυασμό με την ποσοτική σύνθεση αυτών που κυκλοφορούν επί του παρόντος είναι οι εξής:

- Βορικοναζόλη 50mg επικαλυμμένα με λεπτό υμένιο δισκία
- Βορικοναζόλη 200mg επικαλυμμένα με λεπτό υμένιο δισκία
- Βορικοναζόλη 200mg κόνις για διάλυμα προς έγχυση
- Βορικοναζόλη 40mg/mL κόνις για πόσιμο εναιώρημα [31]

Δοσολογία ενηλίκων και ασθενών >15 ετών

Σύμφωνα με τον EMA και τον FDA, η θεραπεία με βορικοναζόλη πρέπει να ξεκινά με την κατάλληλη δόση εφόδου, είτε ενδοφλέβια, είτε από του στόματος έτσι, ώστε να επιτευχθούν συγκεντρώσεις στο πλάσμα την πρώτη ημέρα, παραπλήσιες με αυτές στη σταθεροποιημένη κατάσταση. Στα πλαίσια λοιπόν του δοσολογικού σχήματος εφόδου, δηλαδή τις πρώτες 24 ώρες μετά τη διαπίστωση της λοίμωξης, προτείνεται η χορήγηση 6mg/kg/12ωρο ενδοφλέβια ή 400mg/12ωρο από του στόματος σε ασθενείς >40kg και 200mg/12ωρο από του στόματος σε ασθενείς <40kg και ασθενείς >15 ετών. Η δόση συντήρησης (μετά τις 24 ώρες) περιλαμβάνει τη χορήγηση 4mg/kg/12ωρο ενδοφλέβια ή 200mg/12ωρο από του στόματος σε ασθενείς >40kg και 100mg/12ωρο από του στόματος σε ασθενείς <40kg και ασθενείς >15 ετών.

Δοσολογία παιδιών (2 έως <12 ετών) και νεαρών εφήβων με χαμηλό σωματικό βάρος (12 έως 14 ετών και <50kg)

Το δοσολογικό σχήμα εφόδου για αυτούς τους ασθενείς περιλαμβάνει την ενδοφλέβια χορήγηση 9mg/kg βορικοναζόλης κάθε 12 ώρες, ενώ η λήψη του φαρμάκου από του στόματος στα πλαίσια του σχήματος αυτού δε συνιστάται. Ως δόση συντήρησης ορίζονται τα 8mg/kg ανά 12ωρο ενδοφλέβια ή τα 9mg/kg από του στόματος ανά 12ωρο με μέγιστη δόση τα 350mg δύο φορές ημερησίως. Όσον αφορά στους νεαρούς εφήβους που ζυγίζουν λιγότερο από 50kg, θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως παιδιατρικοί ασθενείς κατά τη χορήγηση της βορικοναζόλης διότι μπορεί να τη μεταβολίζουν με τρόπο που ομοιάζει με αυτόν των παιδιών παρά με των ενηλίκων. Προσαρμογή της δοσολογίας συνιστάται σε περίπτωση μη ανταπόκρισης στη θεραπεία ή μη ανοχής αυτής.

Η βορικοναζόλη δεν εγκρίνεται για χρήση από παιδιά κάτω των 2 ετών, ενώ δεν απαιτείται προσαρμογή της δόσης σε ηλικιωμένους ασθενείς. [32]

Διάρκεια Θεραπείας

Δεδομένης της υψηλής νοσηρότητας και θνησιμότητας που σχετίζεται με τις διηθητικές μυκητιάσεις και της εγγενούς δυσκολίας εκρίζωσης των συγκεκριμένων παθογόνων, η θεραπεία των λοιμώξεων αυτών μπορεί να διαρκέσει από εβδομάδες μέχρι μήνες και η διάρκεια αυτή εξαρτάται από τον τύπο του παθογόνου, το σημείο και την έκταση της λοίμωξης και τη κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος του ασθενούς. [24] Κατ' επέκταση δεν υπάρχουν ακριβείς κατευθυντήριες οδηγίες για τη διάρκεια χορήγησης της βορικοναζόλης σε κάθε περίπτωση μυκητιασικής λοίμωξης, αλλά οι κλινικές δοκιμές υποδεικνύουν ορισμένα διαστήματα χορήγησης στα πλαίσια των οποίων γίνεται εμφανής η κλινική ανταπόκριση των ασθενών.

Σε γενικές γραμμές η θεραπεία με βορικοναζόλη, καλό είναι, να είναι όσο το δυνατόν πιο βραχεία και να βασίζεται στη σοβαρότητα της υποκείμενης νόσου του ασθενούς και στην κλινική ανταπόκριση στο φάρμακο, ενώ για μακροχρόνια θεραπεία μεγαλύτερη των 6 μηνών, θα πρέπει να λαμβάνεται

υπόψη μία προσεκτική εκτίμηση του οφέλους έναντι του κινδύνου. Ειδικότερα, όσον αφορά στην ενδοφλέβια φαρμακοτεχνική μορφή της βορικοναζόλης, η διάρκεια χορήγησής της δε πρέπει να ξεπερνά τους 6 μήνες, αφού ο χρησιμοποιούμενος φορέας του φαρμάκου που υπάρχει στο σκεύασμα (sulfobutyl ether β -cyclodextrin sodium, SBE β CD) δύναται να καταστεί τοξικός ή και μεταλλαξιογόνος μετά από μακροχρόνια χορήγηση. [33]

Η ανασύσταση της λυοφιλοποιημένης σκόνης μπορεί να γίνει με 10 mL από τα παρακάτω:

- Ενέσιμο Διάλυμα Χλωριούχου νατρίου 9 mg/mL(0,9%)
- Διάλυμα «Compound Sodium Lactate» για ενδοφλέβια έγχυση
- Διάλυμα Γλυκόζης 5% και «Lactated Ringer» για ενδοφλέβια έγχυση
- Διάλυμα Γλυκόζης 5% και Χλωριούχου νατρίου 0,45% για ενδοφλέβια έγχυση
- Διάλυμα Γλυκόζης 5% για ενδοφλέβια έγχυση
- Διάλυμα Γλυκόζης 5% σε 20 meq Χλωριούχου καλίου για ενδοφλέβια έγχυση
- Διάλυμα Χλωριούχου νατρίου 0,45% για ενδοφλέβια έγχυση
- Διάλυμα Γλυκόζης 5% και Χλωριούχου νατρίου 0,9% για ενδοφλέβια έγχυση [32]

2.7 Ανεπιθύμητες Ενέργειες

Σύμφωνα με τον EMA, η ασφάλεια της χρήσης της βορικοναζόλης βασίζεται σε μια ολοκληρωμένη βάση δεδομένων ασφαλείας που προήλθαν από πάνω από 2000 άτομα εκ των οποίων οι 1655 ασθενείς συμμετείχαν σε κλινικές μελέτες. Η βάση αυτή, αντιπροσωπεύει έναν ετερογενή πληθυσμό, ο οποίος περιλαμβάνει:

- Ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες
- Ασθενείς προσβεβλημένους από HIV με οισοφαγική καντιντίαση και ανθεκτικές μυκητιασικές λοιμώξεις
- Μη ουδετεροπενικούς ασθενείς με καντινταιμία ή ασπεργίλλωση

- Υγιείς εθελοντές

Από αυτούς τους ασθενείς, 561 έλαβαν τη βορικοναζόλη για περισσότερο από 12 εβδομάδες, ενώ 136 για πάνω από 6 μήνες. Στη συνέχεια περιγράφονται μερικές από τις κυριότερες ανεπιθύμητες ενέργειες (ΑΕ) που μπορεί να εμφανιστούν κατά τη διάρκεια της θεραπείας με βορικοναζόλη, καθώς και η εμφάνιση των ΑΕ στον παιδιατρικό πληθυσμό.

Οπτικές διαταραχές

Η συχνότητα εμφάνισης των οπτικών διαταραχών κατά τη διάρκεια της θεραπείας με βορικοναζόλη είναι υψηλή. Στις περισσότερες κλινικές μελέτες, αλλά και σε μελέτες φαρμακοκινητικής, αποτελούν τη βασική Ανεπιθύμητη Ενέργεια και μπορεί να εμφανιστεί ως εξής: διαφοροποιημένη/ενισχυμένη οπτική αντίληψη, θάμβος όρασης, διαταραχή στην αντίληψη των χρωμάτων και φωτοφοβία. Αυτές οι διαταραχές, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων είναι παροδικές και πλήρως αναστρέψιμες, ειδικά με τη διακοπή της θεραπείας, ενώ υπάρχουν και δεδομένα εξασθένησης των εκδηλώσεων με επαναλαμβανόμενες δόσεις βορικοναζόλης. Τα βασικά συμπεράσματα όσον αφορά στις οφθαλμικές ΑΕ είναι πως αυτές είναι σε γενικές γραμμές ήπιες, σπάνια οδηγούν σε διακοπή της θεραπείας, δε σχετίζονται με μακροχρόνιες συνέπειες και συνήθως εκδηλώνονται στην περίπτωση που οι συγκεντρώσεις της βορικοναζόλης στο πλάσμα είναι υψηλές. Ο μηχανισμός πρόκλησης των οπτικών διαταραχών δεν είναι πλήρως γνωστός, αλλά το σημείο δράσης φαίνεται να βρίσκεται μέσα στον αμφιβληστροειδή.

Δερματολογικές Αντιδράσεις

Σύμφωνα με δεδομένα από κλινικές μελέτες, οι δερματολογικές αντιδράσεις εμφανίζονται συχνότερα σε ασθενείς με σοβαρά υποκείμενα νοσήματα που λαμβάνουν ταυτόχρονα πολλαπλά φαρμακευτικά προϊόντα. Η πλειονότητα των εξανθημάτων που μπορεί να εμφανιστούν είναι ήπιες έως μέτριας βαρύτητας, ενώ σπάνια είναι η εκδήλωση πολύ σοβαρών δερματικών αντιδράσεων, όπως το σύνδρομο Stevens-Johnson, η τοξική επιδερμική

νεκρόλυση και το πολύμορφο ερύθημα. Η φωτοευαισθησία έχει αναφερθεί σε περιπτώσεις μακροχρόνιας θεραπείας ενώ για την ανάπτυξη του καρκινώματος εκ πλακώδους επιθηλίου ο μηχανισμός δεν έχει εξακριβωθεί. Σε περίπτωση που ο ασθενής αναπτύξει εξάνθημα, θα πρέπει να παρακολουθείται στενά και αν οι βλάβες επιδεινωθούν, να διακόπτεται η χορήγηση της βορικοναζόλης.

Διαταραχές ηπατικής λειτουργίας

Οι διαταραχές της ηπατικής λειτουργίας και τα αυξημένα επίπεδα των ηπατικών ενζύμων συσχετίζονται με την αυξημένη συγκέντρωση της βορικοναζόλης στο πλάσμα. Κατά τη διάρκεια του κλινικού προγράμματος για τη βορικοναζόλη, διαπιστώθηκε πως η πλειονότητα των περιπτώσεων μη φυσιολογικής ηπατικής λειτουργίας ανατάχθηκε χωρίς να γίνει προσαρμογή της δόσης, είτε μετά από προσαρμογή της δόσης, συμπεριλαμβανομένης και της διακοπής της θεραπείας.

Άλλες ανεπιθύμητες ενέργειες

Επιπρόσθετα, έχουν παρατηρηθεί αντιδράσεις σχετιζόμενες με την έγχυση, κατά κύριο λόγο έξαψη και ναυτία, κατά τη διάρκεια της χορήγησης της ενδοφλέβιας φαρμακοτεχνικής μορφής βορικοναζόλης. [5] Επιπλέον, πολύ συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες, οι οποίες εμφανίζονται σε περισσότερο από το 10% των ανθρώπων, περιλαμβάνουν περιφερικό οίδημα, πονοκέφαλο, δυσκολία στην αναπνοή, διάρροια, έμετο, κοιλιακό άλγος, ναυτία, εξανθήματα και πυρετό. [14, 21]

Συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες που εμφανίζονται στο 1 έως 10% των ανθρώπων περιλαμβάνουν λοιμώξεις του κόλπου, χαμηλό αριθμό λευκών και ερυθρών αιμοσφαιρίων, χαμηλά επίπεδα σακχάρου στο αίμα, μειωμένη ποσότητα καλίου και νατρίου, κατάθλιψη, παραισθήσεις, άγχος, αδυναμία, λιποθυμία, τρόμος, αδυναμία, μυρμήγκιασμα, υπνηλία, ζάλη, αμφιβληστροειδής αιμορραγία, ακανόνιστοι καρδιακοί ρυθμοί, αργοί ή γρήγοροι καρδιακοί παλμοί, χαμηλή αρτηριακή πίεση, φλεγμονώδεις φλέβες,

σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας, πνευμονικό οίδημα, φλεγμονή των χεριών, πρήξιμο του προσώπου, στομαχικές διαταραχές, δυσκοιλιότητα, ουλίτιδα, ίκτερος, τριχόπτωση, λεπιοειδές δέρμα, φαγούρα, ερυθρό δέρμα, πόνος στην πλάτη, πόνος στο στήθος και ρίγη. [14, 21]

Τέλος, η βορικοναζόλη έχει συσχετιστεί με φωτοτοξικότητα και ψευδοπορφυρία. Συνιστάται όλοι οι ασθενείς, συμπεριλαμβανομένων των παιδιών, να αποφεύγουν την έκθεση σε άμεσο ηλιακό φως κατά τη διάρκεια της θεραπείας και να χρησιμοποιούν μέτρα, όπως προστατευτικό ρουχισμό και αντηλιακό με υψηλό παράγοντα προστασίας από τον ήλιο (SPF). [21]

Ανεπιθύμητες ενέργειες στον παιδιατρικό πληθυσμό

Πριν τη κυκλοφορία του σκευάσματος της βορικοναζόλης, η ασφάλειά της μελετήθηκε σε 285 παιδιατρικούς ασθενείς ηλικίας 2 έως 12 ετών. Οι ασθενείς αυτοί είχαν πάρει μέρος, είτε σε φαρμακοκινητικές μελέτες, είτε σε προγράμματα παρηγορητικής θεραπείας. Σε γενικές γραμμές, το προφίλ των ΑΕ των παιδιατρικών ασθενών ομοιάζει με αυτό των ενηλίκων αν και στους πρώτους είναι υψηλότερη η συχνότητα εμφάνισης δερματικών αντιδράσεων. [34] Όσον αφορά στις ΑΕ σε παιδιά μικρότερα των 2 ετών, σε μια μελέτη με 22 ασθενείς που έλαβαν βορικοναζόλη στα πλαίσια παρηγορητικής θεραπείας αναφέρθηκαν οι εξής ΑΕ χωρίς να υπάρχει εξακριβωμένη συσχέτιση με τη χορήγηση της βορικοναζόλης: αντίδραση φωτοευαισθησίας, αρρυθμία, παγκρεατίτιδα, αυξημένα επίπεδα χολερυθρίνης αίματος, αυξημένα ηπατικά ένζυμα, εξάνθημα και οίδημα της οπτικής θηλής.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

3.1 Εισαγωγή

Οι αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των ουσιών μετανάστευσης αναπτύσσονται με βάση τη φύση της μήτρας του δείγματος του φαρμάκου, τις ιδιότητες και τα πιθανά επίπεδα συσσώρευσης των ουσιών, και η απαιτούμενη ευαισθησία εξαρτάται από το όριο αξιολόγησης (AET, SCT) και τις δυνατότητες των αναλυτικών τεχνικών που εφαρμόζονται. Επομένως, οι ουσίες μετανάστευσης που μελετώνται παρουσιάζουν μια σημαντική πρόκληση για την ανάλυση ιχνών, ειδικά στην περίπτωση προσδιορισμού οργανικών αναλυτών. Είναι σκόπιμο να αναφερθεί ότι ο απώτερος στόχος, που είναι η ταυτοποίηση των ουσιών μετανάστευσης που ανιχνεύτηκαν, είναι ένα πολύ δύσκολο εγχείρημα που εξαρτάται και από τις δυνατότητες της εκάστοτε αναλυτικής τεχνικής. Οι πρότυπες ενώσεις αναφοράς των οργανικών ουσιών, μπορεί να μην είναι διαθέσιμες σε όλες τις περιπτώσεις για την επιβεβαίωση της ταυτοποίησης ή της ποσοτικοποίησης της εκάστοτε ουσίας που μεταναστεύει. Λαμβάνοντας αυτά τα δεδομένα, ο πρακτικός στόχος για τον χαρακτηρισμό του προφίλ μετανάστευσης ενός φαρμακευτικού σκευάσματος, πρέπει να είναι η ανίχνευση, ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση κάθε ξεχωριστής ουσίας πάνω από ένα προκαθορισμένο επίπεδο, με ένα δεδομένο βαθμό εμπιστοσύνης. [3]

3.2 Αρχές τεχνικής εκχύλισης

Η προκατεργασία των δειγμάτων για τον χαρακτηρισμό των ουσιών μετανάστευσης είναι συνάρτηση της χημικής τους φύσης, της σύστασης της μήτρας του δείγματος του φαρμακευτικού προϊόντος και των αναλυτικών τεχνικών που εφαρμόζονται. Σε πολλές περιπτώσεις, η μήτρα του δείγματος είναι πολύπλοκη και περιέχει τη δραστική φαρμακευτική ουσία και τα έκδοχα,

τα οποία βρίσκονται τυπικά σε υψηλά επίπεδα σε σχέση με τις ουσίες που απελευθερώνονται. Οι αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των ουσιών αυτών ενσωματώνουν συνήθως τις διαδικασίες προκατεργασίας του δείγματος, με σκοπό τον διαχωρισμό τους από τη μήτρα του φαρμακευτικού προϊόντος και τη συμπύκνωσή τους στη μέγιστη δυνατή συγκέντρωση πριν την ανάλυση. Με βάση το είδος του φαρμακευτικού σκευάσματος καθορίζεται η μέθοδος κατεργασίας και η αναλυτική τεχνική που θα προτείνεται. [3]

3.2.1 Εκχύλιση Στερεής Φάσης (Solid Phase Extraction, SPE)

Η εκχύλιση στερεάς φάσης είναι μια πολύ δημοφιλής τεχνική, διαθέσιμη σήμερα για την ταχεία και επιλεκτική προκατεργασία του δείγματος. Η ευελιξία της SPE επιτρέπει τη χρήση αυτής της τεχνικής για πολλούς σκοπούς, όπως ο καθαρισμός, ο εμπλουτισμός ιχνών αναλυτών, η αφαλάτωση, η παραγοντοποίηση και η κλασματοποίηση σε τάξεις. Το ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την τεχνική αυτή, ξεκίνησε με την εντατική ανάπτυξη των διαδικασιών έρευνας για τα νέα είδη των προσροφητικών υλικών και διήρκεσε από τα τέλη της δεκαετίας του 1960 μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του 1980, δίνοντας μια νέα ώθηση στην ανάπτυξη της μεθοδολογίας SPE. [35]

Η αρχή της SPE μοιάζει με εκείνη της υγρό υγρό εκχύλισης (LLE), καθώς αναφέρεται στη συγκράτηση των διαλυμένων ουσιών μεταξύ δύο φάσεων. Ωστόσο, αντί για δύο μη αναμίξιμες υγρές φάσεις, όπως στην LLE, η SPE περιλαμβάνει τη διασπορά μιας ουσίας μεταξύ ενός υγρού (μήτρα του δείγματος ή διαλύτη με αναλύτες) και ενός στερεού προσροφητικού υλικού. Η γενική πορεία είναι η φόρτωση του δείγματος πάνω στη στερεά φάση της SPE, η απομάκρυνση των ανεπιθύμητων συστατικών, και η παραλαβή των επιθυμητών αναλυτών μέσω έκλουσης με κατάλληλο διαλύτη σε ένα σωλήνα συλλογής. [36, 37]

Μηχανισμός διαδικασίας SPE

Η επιλογή ενός κατάλληλου προσροφητικού υλικού εξαρτάται από την κατανόηση του μηχανισμού της αλληλεπίδρασης μεταξύ του προσροφητή και του αναλύτη ενδιαφέροντος. Οι πιο κοινοί μηχανισμοί συγκράτησης στην SPE βασίζονται σε δυνάμεις Van der Waals (μη-πολικές αλληλεπιδράσεις), δεσμούς υδρογόνου, δυνάμεις διπόλου-διπόλου (πολικές αλληλεπιδράσεις) και σε αλληλεπιδράσεις κατιόντος-ανιόντος (ιοντικές αλληλεπιδράσεις). Κάθε προσροφητικό υλικό προσφέρει ένα μοναδικό συνδυασμό αυτών των ιδιοτήτων, ο οποίος μπορεί να εφαρμοστεί σε μια ευρεία ποικιλία των προβλημάτων εκχύλισης. Οι αλληλεπιδράσεις που συναντώνται είναι οι εξής: [37]

1. Αντίστροφης φάσης (reversed phase): περιλαμβάνει μια πολική ή μετρίως πολική μήτρα δείγματος (ως κινητή φάση) και μια μη πολική στατική φάση (προσροφητικό υλικό). Ο αναλύτης ενδιαφέροντος είναι συνήθως μια μετρίως έως μη πολική ένωση. Η συγκράτηση των οργανικών αναλυτών από πολικά διαλύματα (π.χ. νερό) πάνω στο προσροφητικό υλικό της SPE, οφείλεται κυρίως στις ελκτικές δυνάμεις των δεσμών άνθρακα-υδρογόνου μεταξύ του αναλύτη και των χαρακτηριστικών ομάδων της επιφάνειας του προσροφητή. Αυτές οι μη πολικές - μη πολικές ελκτικές δυνάμεις ονομάζονται συνήθως δυνάμεις Van der Waals ή δυνάμεις διασποράς.
2. Κανονικής φάσης (normal phase): περιλαμβάνει έναν πολικό αναλύτη, μια μετρίως έως μη πολική μήτρα (π.χ. ακετόνη, χλωριωμένοι διαλύτες και εξάνιο) και μια πολική στατική φάση. Η συγκράτηση ενός αναλύτη υπό συνθήκες κανονικής φάσης οφείλεται κυρίως σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πολικών χαρακτηριστικών ομάδων του αναλύτη και πολικών ομάδων της επιφάνειας του προσροφητή. Αυτές αναφέρονται σε δεσμούς υδρογόνου καθώς και σε αλληλεπιδράσεις π-π. Μια ένωση που προσροφάται με αυτούς τους μηχανισμούς, εκλούεται με τη διέλευση ενός διαλύτη που

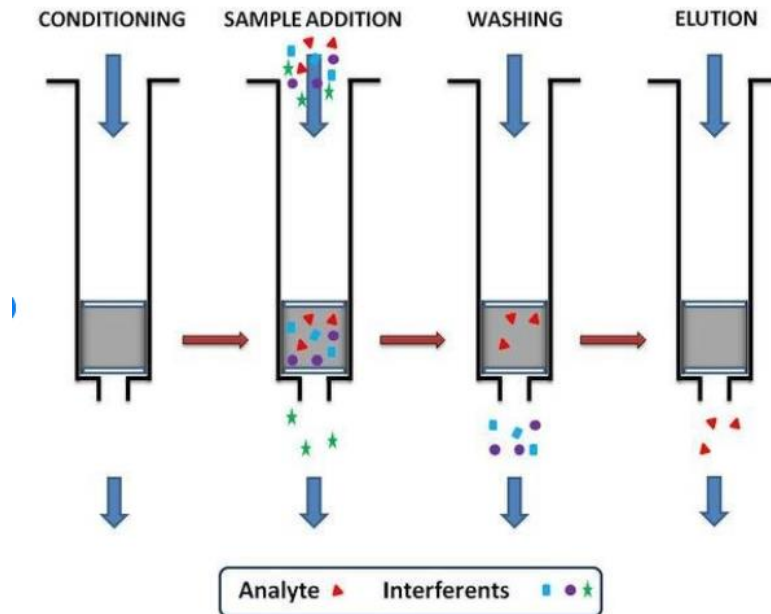
διαταράσσει τον μηχανισμό πρόσδεσης, συνήθως ενός διαλύτη ο οποίος είναι περισσότερο πολικός από τη μήτρα του δείγματος.

3. Ανταλλαγής ιόντων (Ion exchange): μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ενώσεις που συνυπάρχουν σε ένα διάλυμα. Ανιοντικές (αρνητικά φορτισμένες) ενώσεις μπορούν να απομονωθούν πάνω σε μια αλειφατική ομάδα τεταρτοταγούς αμίνης συνδεδεμένης στην επιφάνεια του πυριτίου. Οι κατιονικές (θετικά φορτισμένες) ενώσεις απομονώνονται με την παρουσία αλειφατικών ομάδων σουλφονικού οξέος πάνω στην επιφάνεια της πυριτίας. Ο πρωταρχικός μηχανισμός συγκράτησης μιας ένωσης βασίζεται κυρίως στην ηλεκτροστατική έλξη της φορτισμένης λειτουργικής ομάδας αυτής με τη φορτισμένη ομάδα η οποία είναι συνδεδεμένη στην επιφάνεια της πυριτίας.

Στάδια διεξαγωγής SPE

Τα στάδια που ακολουθούνται κατά την προκατεργασία δείγματος με SPE παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.2 και είναι τα εξής: [38]

1. Εξισορρόπηση (precondition) με διαβίβαση ενός διαλύτη, ώστε να ενεργοποιηθούν οι δραστικές ομάδες του προσροφητικού υλικού.
2. Διαβίβαση του διαλύματος του δείγματος (loading/sample addition), οπότε η επιθυμητή ουσία και ενδεχομένως και άλλες ουσίες του δείγματος κατακρατούνται στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού.
3. Έκπλυση με διαλύτη (washing), για την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων ουσιών, που έχουν κατακρατηθεί στο υλικό προσρόφησης.
4. Εκλεκτική έκλυση (elution) της επιθυμητής ουσίας με κατάλληλο διαλύτη, που δεν εκλύει τις άλλες ουσίες, που ενδεχομένως έχουν προσροφηθεί στο υλικό. Το έκλουσμα που λαμβάνεται περιέχει καθαρή την επιθυμητή ουσία, συνήθως σε πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση από το αρχικό δείγμα, εάν επιλεγούν κατάλληλα οι όγκοι των διαλυμάτων του δείγματος και του υγρού εκλούσεως. Αυτός είναι και ο λόγος που η SPE είναι μια τεχνική προσυγκέντρωσης ενός δείγματος. [39]



Εικόνα 3.1: Στάδια διεξαγωγής SPE [39]

3.2.2 Υγρό-υγρό Εκχύλιση (Liquid liquid Extraction, LLE)

Στην τεχνική αυτή, φέρεται καθορισμένος όγκος του διαλύματος προς εκχύλιση σε διαχωριστική χοάνη και αναταράσσεται μέχρις ότου αποκατασταθεί ισορροπία. Στη συνέχεια, οι δυο μη αναμειγμένες φάσεις διαχωρίζονται με την εκροή της κάτω στιβάδας (με την μεγαλύτερη πυκνότητα) από το κάτω μέρος της χοάνης. Αυτή η διαφορετική κατανομή προκαλείται από τις διαφορές διαλυτότητας των ουσιών μεταξύ των δύο μη αναμειγμένων φάσεων, συνήθως μιας υδατικής φάσης και μιας οργανικής φάσης. [38]

Πλεονεκτήματα / Μειονεκτήματα

Ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα της LLE είναι η ιδιότητά της να επιτρέπει συνεχείς διαδοχικές εκχυλίσεις, δίνοντας υψηλούς συντελεστές διαχωρισμού και, ως εκ τούτου, προϊόντα υψηλής καθαρότητας. Η χρήση συσκευής Soxhlet επιτρέπει τη διεξαγωγή μεγάλου αριθμού διαδοχικών εκχυλίσεων. Η τεχνική προσφέρει επίσης μεγάλη ευελιξία στις διαφορετικές συνθήκες που μπορούν να εφαρμοστούν στην περίπτωση πολύπλοκων δειγμάτων όπως διαφορετικές

τιμές pH, διαφορετικοί διαλύτες. Η LLE μπορεί να λειτουργήσει σε διαφορετικές κλίμακες από μικρόλιτρα μέχρι και τόνους, παρέχοντας ευστάθεια και σχετικά χαμηλό λειτουργικό κόστος. Ωστόσο, η LLE έχει το μειονέκτημα ότι απαιτεί μεγάλους όγκους διαλύτη και ότι οι εκχυλίσεις είναι αργές και επίπονες. Μεγάλη δυσκολία κατά τον διαχωρισμό παρουσιάζεται και στην εκχύλιση αναλυτών χαμηλής συγκέντρωσης. Τέλος, είναι πολύ δύσκολος ο χειρισμός προβληματικών δειγμάτων, όπως εκείνα που σχηματίζουν γαλακτώματα πριν ή και κατά τη διάρκεια της εκχύλισης. [40]

Διαλύτες Εκχύλισης

Αποφασιστικός παράγοντας για την πληρότητα και εκλεκτικότητα της εκχυλίσεως είναι η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη, ως εκχυλιστικού μέσου. Η επιλογή του διαλύτη γίνεται με βάση τα εξής κριτήρια:

1. Δεν πρέπει να αντιδρά με την εκχυλιζόμενη ουσία έτσι, ώστε να αποφευχθούν μη αναστρέψιμες χημικές μεταβολές.
2. Να έχει καλή ικανότητα διάλυσης για τις ενώσεις-στόχους με σκοπό την επίτευξη υψηλών ποσοστών κατανομής.
3. Να έχει χαμηλό σημείο ζέσης, ώστε να αφαιρείται και να προσυγκεντρώνεται εύκολα.
4. Να μην αναμιγνύεται με το νερό ή να έχει πολύ περιορισμένη διαλυτότητα ώστε να παρέχει δύο φάσεις.
5. Να υπάρχει διαφορά πυκνότητας μεταξύ του διαλύτη και του νερού για εύκολο διαχωρισμό των φάσεων.
6. Να είναι φθηνός και άμεσα διαθέσιμος σε υψηλή καθαρότητα, χωρίς να είναι τοξικός ή εύφλεκτος.

Σε υγρά σκευάσματα (π.χ., εισπνεόμενα διαλύματα, μικρού και μεγάλου όγκου παρεντερικά, οφθαλμικά διαλύματα), οι ουσίες μετανάστευσης μπορούν να παραληφθούν χρησιμοποιώντας την υγρό-υγρό εκχύλιση (LLE) με μη-αναμίξιμους με το νερό οργανικούς διαλύτες, όπως διχλωρομεθάνιο, εξάνιο ή πετρελαϊκό αιθέρα. Το pH του υδατικού διαλύματος μπορεί να ρυθμιστεί

προκειμένου να ενισχυθεί η εκχύλιση των ασθενώς όξινων ή βασικών ουσιών, ή να μειωθούν τα προβλήματα εκχύλισης που προκαλούνται από τη σχετικά υψηλή συγκέντρωση της δραστικής φαρμακευτικής ουσίας και των εκδόχων.

Σε στερεά σκευάσματα (π.χ., δισκία, καψάκια, εισπνεόμενες κόνεις), οι ουσίες που μεταναστεύουν μπορούν να ανακτηθούν με διάλυση του δείγματος σε κατάλληλο διαλύτη και εφαρμόζοντας την υγρό-στερεό εκχύλιση.

Σε αλοιφές και κρέμες, ακολουθείται η ίδια προκατεργασία δείγματος με τα στερεά σκευάσματα.

3.3 Αναλυτικές τεχνικές

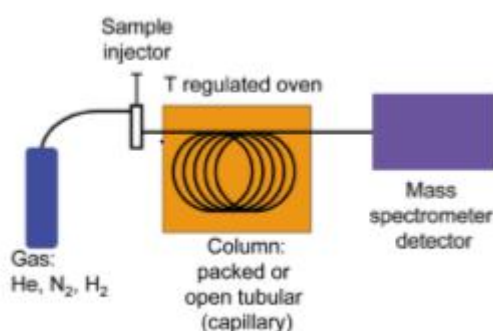
3.3.1 Αεριοχρωματογραφία - Φασματομετρία Μαζών (GC-MS)

Η τεχνική GC-MS πρακτικά συνδυάζει τα χαρακτηριστικά της αεριοχρωματογραφίας και της φασματομετρίας μαζών για τον προσδιορισμό διαφορετικών ουσιών σε ένα δείγμα. Από τις αρχές της δεκαετίας του 1970 άρχισε η εμφάνιση των φασματομέτρων μαζών, ειδικά κατασκευασμένων για να χρησιμοποιηθούν ως αναλυτές μάζας της αεριοχρωματογραφίας. [41]

A) Οργανολογία

Η οργανολογία GC-MS αποτελείται από δύο κύρια δομικά στοιχεία: τον αεριοχρωματογράφο και το φασματόμετρο μαζών. Ο αεριοχρωματογράφος χρησιμοποιεί μια τριχοειδή στήλη η οποία χαρακτηρίζεται από τις διαστάσεις της (μήκος, διάμετρος, πάχος), καθώς και τις ιδιότητες της στατικής φάσης. Η διαφορά μεταξύ των χημικών ιδιοτήτων των διαφορετικών μορίων σε ένα μίγμα, θα διαχωρίσει τα πτητικά μόρια καθώς το δείγμα ταξιδεύει κατά μήκος της στήλης, παρασυρόμενο από την αέρια κινητή φάση (φέρων αέριο). Τα μόρια εμφανίζουν διαφορετικούς χρόνους κατακράτησης (Retentiontime, Rt) πάνω στη στήλη ανάλογα με το μέγεθος της αλληλεπίδρασής τους με αυτή. Ο

χρόνος R_t είναι ο χρόνος που χρειάζεται μια ουσία για να εκλουστεί από τη στήλη και να φτάσει στον αναλυτή μαζών, MS. Το φασματόμετρο μαζών συλλέγει, ιοντίζει, επιταχύνει, εκτρέπει και ανιχνεύει τα ιοντισμένα μόρια ξεχωριστά. Αυτό το επιτυγχάνει σπάζοντας κάθε μόριο σε θραύσματα ιόντων και ανιχνεύοντάς τα χρησιμοποιώντας το λόγο μάζα/φορτίο (m/z ratio). Απαραίτητη όμως προϋπόθεση είναι να υπάρχει συμβατότητα μεταξύ των δυο δομικών στοιχείων, ώστε να μην υποβαθμίζεται η απόδοση κάθε μέρους. Ενώ, ο αεριοχρωματογράφος λειτουργεί σε υψηλές πιέσεις με την προσθήκη φέροντος αερίου (He, N_2, H_2) ως κινητή φάση, το φασματόμετρο μαζών είναι σχεδιασμένο να λειτουργεί υπό υψηλό κενό. Ως εκ τούτου, το φέρον αέριο πρέπει να αφαιρεθεί αποτελεσματικά πριν την εισαγωγή ιόντων στο MS. [42]



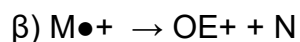
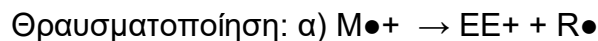
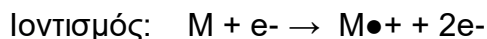
Εικόνα 3.2: Διάταξη οργανολογίας GC-MS [42]

B) Πηγές Ιοντισμού στο MS

Αφού τα μόρια ταξιδέψουν κατά μήκος της στήλης, περνούν μέσω της γραμμής μεταφοράς και εισέρχονται στο φασματόμετρο μαζών που ιονίζονται με διάφορες μεθόδους, με μία όμως μέθοδο να χρησιμοποιείται σε κάθε δεδομένη στιγμή. Οι πηγές ιοντισμού που χρησιμοποιούνται στην τεχνική GC-MS είναι οι εξής:

1. Ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (EI): αποτελεί μια σκληρή πηγή ιοντισμού αέριας φάσης, όπου e^- παράγονται από ένα θερμαινόμενο νήμα (W ή Re) και επιταχύνονται με μια τάση 70 V (σταθερή ενέργεια επιτάχυνσης). Τα επιταχυνόμενα e^- προσκρούουν επάνω στα μόρια των αναλυτών και τα

ιοντίζουν ή τα θραυσματοποιούν. Οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται είναι οι εξής.



όπου

$M^{\bullet+}$ = μοριακό ιόν,

EE^+ = θυγατρικό ιόν με άρτιο αριθμό ηλεκτρονίων,

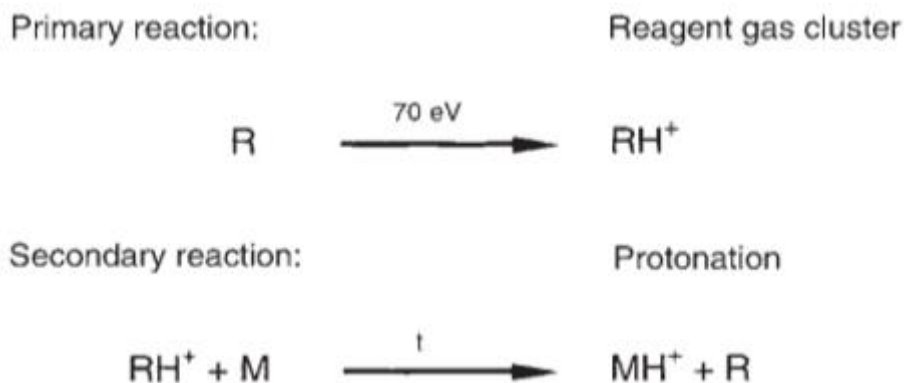
OE^+ = θυγατρικό ιόν με περιττό αριθμό ηλεκτρονίων,

R^{\bullet} = ρίζα και

N = ουδέτερο μόριο.

Το MS ανιχνεύει μόνο ιόντα και επομένως τα $M^{\bullet+}$, EE^+ , OE^+ , ουδέτερα μόρια και ρίζες δεν ανιχνεύονται από το φασματόμετρο μαζών. Τα πλεονεκτήματα αυτής της τεχνικής είναι ότι είναι επαρκώς μελετημένη, μπορεί να εφαρμοστεί σε όλα τα πτητικά μόρια και έχει επαρκώς επαναλήψιμο φάσμα μαζών. Επίσης λόγω σκληρής θραυσματοποίησης, είναι δυνατή η ταυτοποίηση της δομής διαφόρων ενώσεων και η ανάπτυξη βιβλιοθηκών. Παρόλο αυτά, το μοριακό ιόν μπορεί να απουσιάζει ή να έχει χαμηλή αφθονία. [43, 44]

2. Χημικός Ιοντισμός (CI): αποτελεί μια μαλακή πηγή ιοντισμού αέριας φάσης, που πραγματοποιείται μέσω δύο βασικών αντιδράσεων. [45] Στην πρωτογενή αντίδραση ένα σταθερό σύμπλεγμα ιόντων του αντιδραστήριου (συνήθως CH_4 , NH_3 , N_2) παράγεται μέσω βομβαρδισμού με ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας. Στη δευτερογενή αντίδραση το μόριο "M" που βρίσκεται στο έκλουσμα του αεριοχρωματογράφου, αντιδρά με τα ιόντα του αντιδραστήριου και ιοντίζεται με αντιδράσεις μεταφοράς πρωτονίων ή φορτίου, προσθήκης, ή και πυρηνόφιλης υποκατάστασης. Στην Εικόνα 3.3. παρουσιάζονται οι αντιδράσεις του χημικού ιοντισμού. [46]



Εικόνα 3.3: Πορείες χημικού ιοντισμού (CI) [46]

Γ) Αναλυτές Μαζών

Ο πιο κοινός ανιχνευτής μαζών που συνδέεται με ένα αεριοχρωματογράφο (GC) είναι το απλό τετράπολο που μερικές φορές αναφέρεται και ως "Mass Selective Detector» (MSD). Για θραυσματοποιήσεις MS², χρησιμοποιείται ως αναλυτής μαζών το τριπλό τετράπολο (triple quadrupole) και η τεχνική ονομάζεται διαδοχική φασματομετρία μαζών (tandem MS ή GC-MS/MS). Η τεχνική αυτή είναι σημαντική για την ποσοτικοποίηση χαμηλών συγκεντρώσεων αναλυτών-στόχων παρουσία πολύπλοκης μήτρας. Η ανάλυση σε μια οργανολογία GC-MS γίνεται, είτε με πλήρη σάρωση (full-scan MS), είτε με παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος (SIM). Ένα όργανο GC-MS όμως είναι σε θέση να εκτελέσει και τις δύο λειτουργίες, είτε μεμονωμένα, είτε ταυτόχρονα, ανάλογα με τη ρύθμιση που γίνεται από το χειριστή του. [46]

3.3.2 Υγροχρωματογραφία - Φασματομετρία Μαζών (LC-MS)

Η υγροχρωματογραφία φασματομετρία μαζών (LC-MS) είναι ο συνδυασμός των δύο επιμέρους τεχνικών που επιτρέπει την απομόνωση και τη μέτρηση των αναλυτών σε εξαιρετικά σύνθετα μίγματα. Η υγροχρωματογραφία είναι σημαντική για τον διαχωρισμό των ενώσεων με βάση τις φυσικοχημικές τους

ιδιότητες, ενώ το MS διαφοροποιεί τις ενώσεις με βάση το λόγο μάζα/φορτίο που έχουν (m/z ratio). Η οργανολογία LC-MS παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα, αλλά και κάποια μειονεκτήματα. [41] Αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1: Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα τεχνικής LC-MS

Πλεονεκτήματα	
Εκλεκτικότητα	Ο αναλύτης προσδιορίζεται με ακρίβεια και αξιοπιστία παρουσία πολύπλοκης μήτρας στο δείγμα.
Ταχύτητα	Δεδομένου ότι το MS διακρίνει ενώσεις με βάση τη μάζα, η ανάλυση στο LC είναι πιο γρήγορη.
Ευσθησία	Η καλή ευαισθησία οδηγεί σε μείωση του θορύβου, αύξηση του λόγου S/N, επιτρέποντας τον προσδιορισμό αναλυτών σε χαμηλά επίπεδα (fg/mL).
Μειονεκτήματα	
Κόστος	Οι οργανολογίες LC-MS είναι δαπανηρές κατά την αγορά, αλλά και κατά την καθημερινή τους συντήρηση.
Πολυπλοκότητα	Τόσο οι λειτουργίες LC όσο και MS είναι δύσκολο να βελτιστοποιηθούν. Ιδιαίτερη πολυπλοκότητα παρουσιάζει ο μηχανισμός ιοντισμού.
Περιορισμένη Δυναμική Περιοχή	Η περιοχή στην οποία η ευαισθησία έχει μια σαφή τιμή είναι περιορισμένη σε σχέση με άλλες αναλυτικές τεχνικές.

A) Οργανολογία

Τα βασικά στοιχεία μιας οργανολογίας LC-MS είναι: η επιφάνεια σύνδεσης της υδροχρωματογραφίας με την πηγή ιοντισμού του MS και ο αναλυτής μαζών. Η πηγή ιόντων χρησιμοποιείται για την εξάτμιση / ιοντισμό των μορίων-στόχων και ο αναλυτής μαζών για το διαχωρισμό των ιόντων αέριας φάσης με βάση το λόγο τους m/z . Ο αναλυτής μάζας, MS, ανιχνεύει τις μάζες των ιόντων που διαχωρίστηκαν κιέπειτα ο ανιχνευτής μετρά τη σχετική αφθονία τους. Σε μία οργανολογία LC-MS, ο πιο συνηθισμένος αναλυτής μαζών για την ποσοτικοποίηση αναλυτών είναι το τριπλό τετράπολο (QqQ).

Ως προς την αρχή λειτουργίας, το δείγμα εισάγεται στον εισαγωγέα δείγματος του υγροχρωματογράφου για να προωθηθεί μέσω της κινητής φάσης στη στήλη της HPLC. Η διαφορά μεταξύ των χημικών ιδιοτήτων των μορίων στο μίγμα, θα διαχωρίσει τα μόρια καθώς το δείγμα ταξιδεύει κατά μήκος της στήλης. Έτσι, τα μόρια λαμβάνουν διαφορετικούς χρόνους κατακράτησης (R_t) πάνω στη στήλη ανάλογα με το μέγεθος της αλληλεπίδρασής τους με αυτή. Κατά την έκλυση των μορίων από το σύστημα LC, αυτά εισέρχονται στην πηγή ιοντισμού του MS όπου και μετατρέπονται σε ιόντα αέριας φάσης (gas ions). Στη συνέχεια επιταχύνονται με την εφαρμογή δυναμικών και εισέρχονται στον αναλυτή μάζας. Λόγω των ηλεκτροστατικών πεδίων μέσα στο τριπλό τετράπολο, τα ιόντα αρχίζουν να εκτρέπονται ανάλογα με τη μάζα τους και το φορτίο τους. Στο τέλος, ο ανιχνευτής μετατρέπει την ενέργεια των ιόντων σε ηλεκτρικά σήματα, τα οποία στη συνέχεια μεταδίδονται σε έναν υπολογιστή για τη διαχείριση των δεδομένων και των υπολογισμών που απαιτούνται. [47]

B) Πηγές Ιοντισμού στο MS

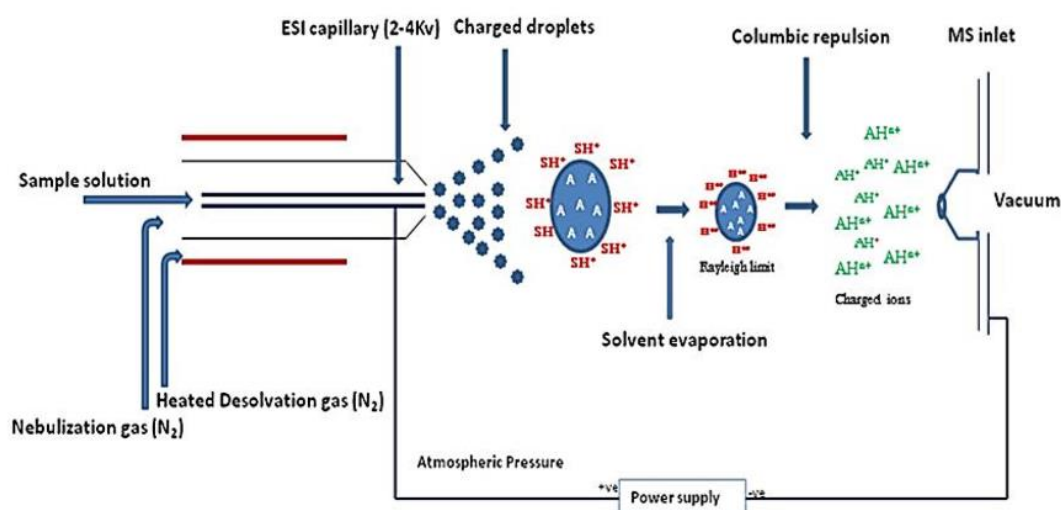
Το κύριο επίτευγμα ήταν η επίλυση της ασυμβατότητας της εισαγωγής της κινητής φάσης από τη στήλη LC στο φασματόμετρο μαζών, ο οποίος βρίσκεται υπό κενό. Οι πηγές ιοντισμού σε μια οργανολογία LC-MS παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2: Πηγές ιοντισμού στο MS και λειτουργία τους

Πηγή Ιοντισμού	Λειτουργία
Electrospray ionization (ESI)	Εξάτμιση φορτισμένων σταγονιδίων
Nanoelectrospray ionization (nanoESI)	Εξάτμιση φορτισμένων σταγονιδίων
Atmospheric pressure chemical ionization (APCI)	Εκκένωση κορώνας και μεταφορά πρωτονίων
Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI)	Απορρόφηση φωτονίου/μεταφορά πρωτονίου
Desorption/ionization on silicon (DIOS)	Απορρόφηση φωτονίου/μεταφορά πρωτονίου
Fast atom/ion bombardment (FAB)	Εκρόφηση ιόντων/μεταφορά πρωτονίου

Σήμερα, η πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI) και ο χημικός ιοντισμός ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI) είναι οι πιο κοινές τεχνικές API (atmospheric pressure ionization) σε χρήση ρουτίνας για την ποσοτικοποίηση μικρών μορίων. Παρόλο αυτά, το ESI και η MALDI είναι δύο τεχνικές που χρησιμοποιούνται συχνά σε υγρά και στερεά βιολογικά δείγματα, προσφέροντας εξαιρετική ευαισθησία και πολλές εφαρμογές στη βιομοριακή ανάλυση (κυρίως “proteomics”). [48]

1. Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI): αποτελεί μια μαλακή πηγή ιοντισμού για μόρια αναλυτών που εξέρχονται από έναν υδροχρωματογράφο. [49, 50] Η υγρή κινητή φάση εξερχόμενη από το LC, ψεκάζεται μέσα από τριχοειδή σωλήνα στον οποίο εφαρμόζεται υψηλή τάση (3-4 kV), με διαγώνια ροή αερίου N₂. Έτσι σχηματίζεται αερόλυμα φορτισμένων σταγονιδίων, δηλαδή μεγάλη παραγωγή θετικών και αρνητικών ιόντων. Όταν το φορτισμένο αερόλυμα φτάσει στην έξοδο του τριχοειδούς, γίνεται ψεκασμός υπό ατμοσφαιρική πίεση και κατά την πορεία των σταγονιδίων, ο όγκος τους μειώνεται και τα ιόντα συρρικνώνονται. [49, 50] Εφόσον η μόνη δύναμη που κρατάει τα ιόντα είναι η επιφανειακή τάση, δημιουργούνται ηλεκτροστατικές απώσεις που οδηγούν στην έκρηξη κάθε σταγόνας και στο σχηματισμό ιόντων στην αέρια φάση (ζώνη αποδιαλύτωσης). Τα ιόντα αέριας φάσης (θετικά και αρνητικά) μπαίνουν στην είσοδο του MS (MS inlet), το οποίο λειτουργεί υπό κενό (Εικόνα 3.4).

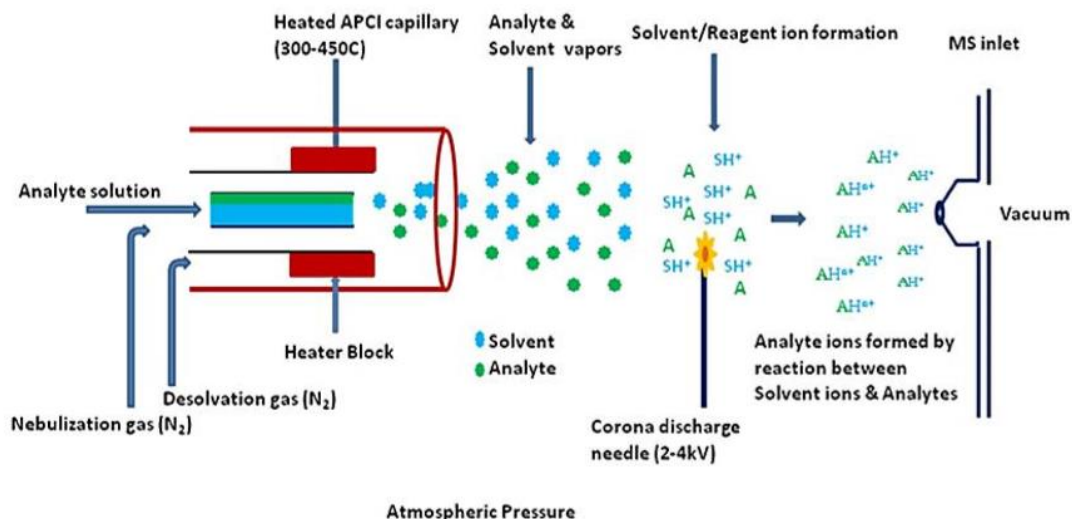


Εικόνα 3.4: Σχηματικό διάγραμμα πορείας ESI [51]

Ο ιοντισμός ESI μπορεί να λειτουργήσει με εφαρμογή κατάλληλων δυναμικών ως ESI(+) ή ESI(-), επιτρέποντας την είσοδο θετικών ή αρνητικών ιόντων αντίστοιχα στην είσοδο του MS και δημιουργώντας τα ψευδομοριακά ιόντα $[M+H]^+$ και $[M-H]^-$.

Το κύριο πλεονέκτημα της χρήσης του ESI είναι η καλή ευαισθησία και ο σχηματισμός πρωτονιωμένων ή αποπρωτονιωμένων μορίων με μικρή θραυσματοποίηση, ιδανικό για ποικιλία αναλυτών (μετρίως πολικών και απολίπων). Κάποια όμως από τα μειονεκτήματά του είναι ο σχηματισμός ιόντων προσθήκης (adduct ions) και η απόσβεση σήματος σε διαλύματα με άλατα και ανταγωνιστική μήτρα. Επιπλέον, η απόκριση του σήματος μπορεί να είναι μη γραμμική σε υψηλές συγκεντρώσεις των αναλυτών. [43, 52]

2. Χημικός Ιοντισμός σε Ατμοσφαιρική Πίεση (APCI): αποτελεί μια μαλακή πηγή ιοντισμού αέριας φάσης που είναι πιο κατάλληλη για την ανάλυση σχετικά μη πολικών μορίων σε συνδυασμό με μια οργανολογία LC. Αρχικά, το έκλουσμα κινητής φάσης από το LC ρέει μέσω ενός τριχοειδούς και σταγονίδια παράγονται με εκνέφωση της υγρής φάσης σε σπρέι. Στην πηγή APCI υπάρχει ένας θερμαινόμενος μανδύας ($\theta > 350 \text{ }^\circ\text{C}$) που εξατμίζει τον διαλύτη της κινητής φάσης, παράγοντας μόρια στην αέρια φάση. Με εκκένωση κορώνας παράγονται ηλεκτρόνια που ιοντίζουν τον αέρα και τα μόρια του αερίου, σχηματίζοντας τις ενώσεις (N_2^+ , H_2O^+ , O_2^+), οι οποίες αντιδρούν ταχέως προς σχηματισμό ιόντων H_3O^+ (Εικόνα 3.5). Η μεταφορά πρωτονίου από τον ιοντισμένο διαλύτη έχει ως αποτέλεσμα τον θετικό και αρνητικό χημικό ιοντισμό του αναλύτη και τη δημιουργία των $[M+H]^+$ και $[M-H]^-$ αντίστοιχα. [53, 54]



Εικόνα 3.5: Σχηματικό διάγραμμα πορείας APCI [51]

Το APCI δεν υποφέρει τόσο από σημαντική απόσβεση σήματος όπως το ESI. Ωστόσο, σημαντική προσοχή χρειάζεται στην επιλογή του διαλύτη και των πρόσθετων αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται στην κινητή φάση, ώστε να αποφευχθεί ο ανταγωνιστικός ιοντισμός σωματιδίων της μήτρας. [51]

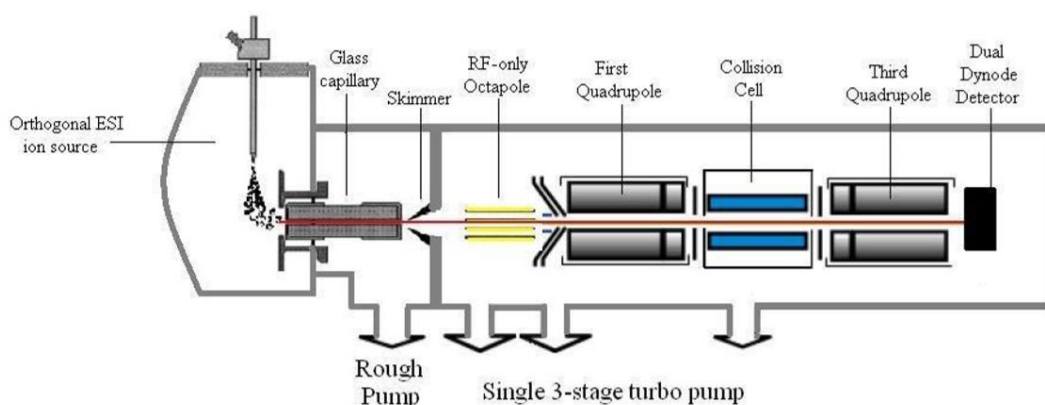
Γ) Αναλυτές Μαζών

Οι αναλυτές μαζών μπορούν να διακριθούν σε χαμηλής διακριτικής ικανότητας, όπως είναι το απλό τετράπολο (single quadrupole), το τριπλό τετράπολο (triple quadrupole) ή η ιοντική παγίδα (ion trap) με δυνατότητα θραυσματοποίησης MSⁿ, και σε υψηλής διακριτικής ικανότητας, όπως είναι ο αναλυτής χρόνου πτήσης (TOF) και το «orbitrap». Ωστόσο, ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος τύπος αναλυτή για ποσοτικοποίηση είναι το τριπλό τετράπολο (QqQ), λόγω υψηλών ταχυτήτων σάρωσης, μικρότερου μεγέθους και κόστους, σε σύγκριση με άλλους αναλυτές μαζών.

Σε πολλά εργαστήρια χρησιμοποιείται εξοπλισμός UPLC-QqQ-MS/MS, όπου χρησιμοποιούνται στήλες στενές και μικρού μήκους που εξασφαλίζουν μικρές ροές στο MS. Οι στήλες αποτελούνται από συμπαγή πυρήνα μικρών πληρωμένων σωματιδίων (2,5-3,0 μm). Οι αντλίες UPLC (Ultra-Performance

Liquid Chromatography) αναπτύσσουν υψηλές πιέσεις και συμβάλλουν στην αύξηση της ταχύτητας και της ευαισθησίας των αναλύσεων. [55, 56]

Καρδιά ενός τετραπολικού φασματομέτρου είναι οι τέσσερις παράλληλες ράβδοι οι οποίες δρουν ως ηλεκτρόδια. Οι διαγώνιες ράβδοι συνδέονται ηλεκτρικά μεταξύ τους. Το ένα ζεύγος συνδέεται με τον θετικό πόλο μιας πηγής μεταβλητής τάσης DC, ενώ το άλλο με τον αρνητικό πόλο της πηγής. Ωστόσο, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.6, το τριπλό τετράπολο (QqQ) είναι ένα διαδοχικό φασματομέτρο μαζών που αποτελείται από δύο τετράπολα - αναλυτές μαζών σε σειρά και μια παγίδα συγκρούσεων που βρίσκεται μεταξύ τους. Το ενδιάμεσο τετράπολο δεν διαχωρίζει τις μάζες των ιόντων, αλλά αποτελεί μια κυψελίδα συγκρούσεων (CID), όπου θραυσατοποιεί με περίσσεια αδρανούς αερίου (Ar ή He) τα ιόντα σε μικρότερα θραύσματα. Σε κάποιες περιπτώσεις, το ενδιάμεσο τετράπολο μπορεί να αντικατασταθεί από ένα εξάπολο ή οκτάπολο για βελτίωση της απόδοσης της ανάλυσης. [43]



Εικόνα 3.6: Απεικόνιση διάταξης τριπλού τετράπολου (QqQ)

Σε ένα τριπλό τετράπολο, μπορούν να εφαρμοστούν πολλές λειτουργίες σάρωσης για τον προσδιορισμό μορίων ενδιαφέροντος, ανάλογα με το σκοπό της ανάλυσης. Η πιο απλή περίπτωση είναι οι λειτουργίες full-scan και SIM (single ion monitoring), όπου από το ενδιάμεσο τετράπολο διέρχονται οι μάζες, χωρίς να θραυσατοποιηθούν. Στη λειτουργία full-scan γίνεται σάρωση όλων των μαζών των ιόντων, ενώ στη λειτουργία SIM επιλέγουμε ποιες μάζες θέλουμε να απομονώσουμε. Αντίθετα, οι λειτουργίες SRM, MRM [57, 58], Product ion scanning, Precursor ion scanning και Neutral loss scan,

χρησιμοποιούν το ενδιάμεσο τετράπολο ως κυψελίδα συγκρούσεων (CID) για θραυσματοποίηση των μαζών με κατάλληλη ενέργεια (Collision energy, CE). [64] Ανάλογα το σκοπό της ανάλυσης επιλέγονται συγκεκριμένες μάζες ή σαρώνονται όλες στα τετράπολα Q1 και Q2 , όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.3.

Πίνακας 3.3: Λειτουργίες σάρωσης τριπλού τετράπολου (QqQ)

Λειτουργία	Q1	Q2	Q3	Σκοπός	MS	MS/MS
Πλήρης σάρωση	Σάρωση	Διέλευση όλων των ιόντων	Διέλευση όλων των ιόντων	Πληροφορίες για το μοριακό βάρος	√	
SIM	Καθορισμένο m/z	Διέλευση όλων των ιόντων	Διέλευση όλων των ιόντων	Ποσοτικοποίηση	√	
Σάρωση θυγατρικών ιόντων	Καθορισμένο m/z	Διέλευση όλων των ιόντων (+ θραυσματοποίηση)	Σάρωση	Πληροφορίες για τη δομή		√
SRM	Καθορισμένο m/z	Διέλευση όλων των ιόντων (+ θραυσματοποίηση)	Καθορισμένο m/z	Στοχευμένη ποσοτικοποίηση		√
MRM	Καθορισμένο m/z	Διέλευση όλων των ιόντων (+ θραυσματοποίηση)	Καθορισμένο m/z	Στοχευμένη ποσοτικοποίηση		√
Σάρωση ουδέτερων απωλειών	Σάρωση	Διέλευση όλων των ιόντων (+ θραυσματοποίηση)	Σάρωση	Σάρωση αναλυτών		√
Σάρωση πρόδρομων ιόντων	Σάρωση	Διέλευση όλων των ιόντων (+ θραυσματοποίηση)	Καθορισμένο m/z	Σάρωση αναλυτών		√

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

4.1 Εισαγωγή

Η ανάπτυξη και επικύρωση των μεθόδων για τις ουσίες που μεταναστεύουν, πρέπει να πραγματοποιηθεί σύμφωνα με τις αποδεκτές πρακτικές της βιομηχανίας, με κριτήρια και πρότυπα. Η έκταση της επικύρωσης που απαιτείται εξαρτάται από τους στόχους της μελέτης στην οποία γίνεται χρήση της αναλυτικής μεθόδου. Οι παράμετροι επικύρωσης περιλαμβάνουν: την ακρίβεια, την πιστότητα (επαναληψιμότητα, ενδιάμεση πιστότητα), την ειδικότητα, το όριο ανίχνευσης, το όριο ποσοτικοποίησης, τη γραμμικότητα, το εύρος και την ανθεκτικότητα της μεθόδου. Θα πρέπει επίσης να αναπτυχθούν δοκιμασίες καταλληλότητας του συστήματος (System suitability testing, SST). [59] Παρακάτω, δίνονται περισσότερες λεπτομέρειες για τις επιμέρους παραμέτρους της επικύρωσης.

- Ακρίβεια (Accuracy): Η επικύρωση των παραμέτρων της ακρίβειας αξιολογείται συνήθως σε δείγματα φαρμακευτικού προϊόντος εμπλουτισμένα με γνωστές ποσότητες ουσιών “στόχων”. Η επιλογή της μήτρας του προϊόντος, θα πρέπει να είναι τέτοια, ώστε να μην υπάρχει επαφή μεταξύ αυτών και των υλικών συσκευασίας. Τα επίπεδα εμβολιασμού μπορούν να προσδιοριστούν με βάση τις γνωστές ποσότητες των ουσιών “στόχου” από τις μελέτες εκχύλισης. Συνήθως, η ακρίβεια πραγματοποιείται τυπικά σε τρία επίπεδα εμβολιασμού γνωστών συγκεντρώσεων.
- Πιστότητα (Precision):
 - α) Επαναληψιμότητα (Repeatability)
 - β) Ενδιάμεση Πιστότητα (Intermediate Precision)
- Γραμμικότητα (Linearity): Οι ουσίες που μεταναστεύουν βρίσκονται στα συστατικά της συσκευασίας σε διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων. Για

να ποσοτικοποιηθούν ορθά, λοιπόν, αυτές οι «leachable» ενώσεις, επιλέγεται και επικυρώνεται μια περιοχή συγκεντώσεων η οποία περιλαμβάνει το προκαθορισμένο αναλυτικό όριο (AET) για γενotoξικές ενώσεις (περιγράφεται στο εδάφιο 5.3.1) καθώς επίσης και τιμές μικρότερες, αλλά και μεγαλύτερες από αυτό.

- Εύρος (Range)
- Όριο ανίχνευσης (LOD) και Όριο ποσοτικοποίησης (LOQ): Για να ανιχνευτούν και να ποσοτικοποιηθούν οι άγνωστες ενώσεις, το όριο ποσοτικοποίησης πρέπει να είναι ίσο ή μικρότερο από το προκαθορισμένο αναλυτικό όριο (AET).
- Ειδικότητα (Specificity): Η εκτίμηση της ειδικότητας της μεθόδου μπορεί να επιτευχθεί, αξιολογώντας την καθαρότητα της χρωματογραφικής κορυφής σε εμβολιασμένα και μη εμβολιασμένα δείγματα φαρμακευτικού προϊόντος. Η ειδικότητα τεκμηριώνεται στην περίπτωση όπου δεν παρατηρούνται παρεμπόδισεις από ουσίες της μήτρας του δείγματος.
- Ανθεκτικότητα (Robustness): Για την αξιολόγησή της, είναι σημαντικό να σχεδιαστεί ένας αριθμός πειραμάτων με στατιστική προσέγγιση και λαμβάνοντας υπόψη όλες τις πιθανές αναλυτικές παραμέτρους, οι οποίες θα έκριναν κατά πόσο η μέθοδος είναι ανθεκτική (robust). Οι παράμετροι μπορούν να αφορούν τον ρυθμό ροής της κινητής φάσης στην HPLC, τη στήλη, τη βαθμιδωτή έκλυση της κινητής φάσης, κλπ.
- Δοκιμασίες καταλληλότητας του συστήματος (System Suitability Testing). Οι αναλυτικές μέθοδοι βασισμένες στην οργανολογία GC και HPLC, θα πρέπει να διαθέτουν τα κατάλληλα κριτήρια καταλληλότητας του συστήματος για την αξιολόγηση μιας μεθόδου ρουτίνας. Η ενδιάμεση πιστότητα (System Precision), αποτελεί μέρος της δοκιμασίας καταλληλότητας συστήματος.

Η παρούσα ερευνητική διατριβή εξετάζει την ανάπτυξη μεθόδου για τον προσδιορισμό ουσιών που μεταναστεύουν από τον περιέκτη στο τελικό προϊόν. Επομένως, θα ελεγχθούν όλες οι παράμετροι που περιγράφηκαν προηγουμένως. [3, 60]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΟΥΝ ΑΠΟ ΠΕΡΙΕΚΤΗ ΣΤΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟΥ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΟΣ ΒΟΡΙΚΟΝΑΖΟΛΗΣ

5.1 Εισαγωγή -Σκοπός μελέτης

Η συσκευασία των φαρμακευτικών προϊόντων αποτελεί ουσιαστικό μέρος της παραγωγής τους. Όταν επιλέγεται το υλικό συσκευασίας, λαμβάνονται υπόψη διάφορες παράμετροι, οι περισσότερες από τις οποίες αφορούν τα χαρακτηριστικά του υλικού. Οι παράμετροι αυτές μπορεί να είναι κρίσιμες για τη σταθερότητα του προϊόντος, για τη διατήρηση της στείρας και για να κάνουν τα προϊόντα να είναι εύκολα στη χρήση. Τα υλικά που συνήθως συνθέτουν τη συσκευασία περιλαμβάνουν κυρίως πολυμερικά και μεταλλικά μέρη. Ενώ θα θέλαμε να σκεφτούμε ότι το μεγαλύτερο μέρος αυτών των υλικών είναι πρακτικά αδρανές, κατά τη διάρκεια του αναμενόμενου χρόνου ζωής και χρήσης του προϊόντος, η συνεχής επαφή, καθώς και η πίεση, μπορεί να επιφέρουν μια αλλαγή στη σύνθεση του αποθηκευμένου προϊόντος μέσω αλληλεπιδράσεων με τη συσκευασία του. Τα πολυμερικά υλικά που χρησιμοποιούνται συνήθως ως περιέκτες στη βιομηχανία φαρμάκων περιέχουν διάφορα πρόσθετα τα οποία χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση των ιδιοτήτων των περιεκτών. Τυπικές κατηγορίες προσθέτων περιλαμβάνουν αντιοξειδωτικά, πλαστικοποιητές, αντι-αποικοδομητικά, χρωστικές ή συγκολλητικά. Αυτά τα πρόσθετα ή τα προϊόντα αποικοδόμησής τους, καθώς και υπολείμματα και υποπροϊόντα της διαδικασίας πολυμερισμού, μπορούν να συσσωρευθούν στα φαρμακευτικά προϊόντα μέσω μιας διαδικασίας που ακολουθεί ένα σύνθετο μηχανισμό, που χαρακτηρίζεται κυρίως από μια διαδικασία διάλυσης και διάχυσης. Η μεταφορά αυτών των ενώσεων μπορεί να είναι άμεση (απαιτώντας επαφή) ή έμμεση και μπορεί να προχωρήσει σε περαιτέρω αλληλεπίδραση με το προϊόν σχηματίζοντας ενδεχομένως χαρακτηριστικά προϊόντα αποικοδόμησης.

Οι μελέτες αλληλεπίδρασης της συσκευασίας προϊόντων επικεντρώνονται στην καθιέρωση αυτής της αλλαγής στη σύνθεση του προϊόντος που προκαλείται από την αλληλεπίδραση της συσκευασίας και του αποθηκευμένου περιεχομένου μέσω μοριακών ανταλλαγών. Η ανταλλαγή αυτή μπορεί να επιτελείται τόσο με άμεσο, όσο και έμμεσο τρόπο μεταφοράς.

Το εν λόγω προϊόν είναι σε μορφή σκόνης (λυοφιλοποιημένο) και συνεπώς δεν είναι ικανό να διαχυθεί εντός της πολυμερικής μήτρας προκειμένου να συσσωρευθούν εσώκλειστα, αλλά διαθέσιμα «leachable είδη», όπως θα ήταν ικανό να κάνει ένα προϊόν σε υγρή κατάσταση, ανάλογα με τη διαπερατότητα της εν λόγω μήτρας.

Η διαχείριση των ουσιών μετανάστευσης είναι σημαντική για τους παρασκευαστές φαρμακευτικών προϊόντων και τις κανονιστικές αρχές, καθώς ορισμένες από αυτές βρίσκονται σε συγκεντρώσεις σχετικά μεγάλες και μπορούν να παρουσιάσουν ανησυχίες για την ασφάλεια των ασθενών ή και θέματα συμβατότητας στα φαρμακευτικά προϊόντα. Σκοπός της μελέτης είναι να αξιολογηθεί η καταλληλότητα της μεθόδου που αναπτύχθηκε για χρήση στην ανάλυση του τελικού προϊόντος Voriconazole 200 mg ανά φιαλίδιο σκόνης για διάλυμα προς έγχυση, όσον αφορά στην εφαρμογή της για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό πιθανών «leachable ειδών».

5.2 Σχεδιάγραμμα ανάλυσης

Δεδομένου ότι οι εν λόγω «leachable ενώσεις» ποικίλλουν ως προς τη φύση τους, η ανίχνευσή και ο προσδιορισμός τους συνεπάγονται τη χρήση διαφορετικών μεθοδολογιών. Η μέθοδος που θα επικυρωθεί για την ανίχνευση τέτοιων «leachable ενώσεων» είναι μια μεθοδολογία βασισμένη σε μια τεχνική αντιστρόφου φάσης UPLC-PDA-MS, η οποία χρησιμοποιεί μια πηγή ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI) σε αμφότερους τους τρόπους αρνητικού και θετικού ιονισμού. Ο ανιχνευτής υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) χρησιμεύει για να παρέχει ένα γρήγορο, αρχικό έλεγχο των «leachable ενώσεων», ενώ το φασματόμετρο μαζών παρέχει πολύτιμα δεδομένα για να επιτρέπει την ταυτοποίηση ενώσεων. Χρησιμοποιώντας ένα φασματόμετρο

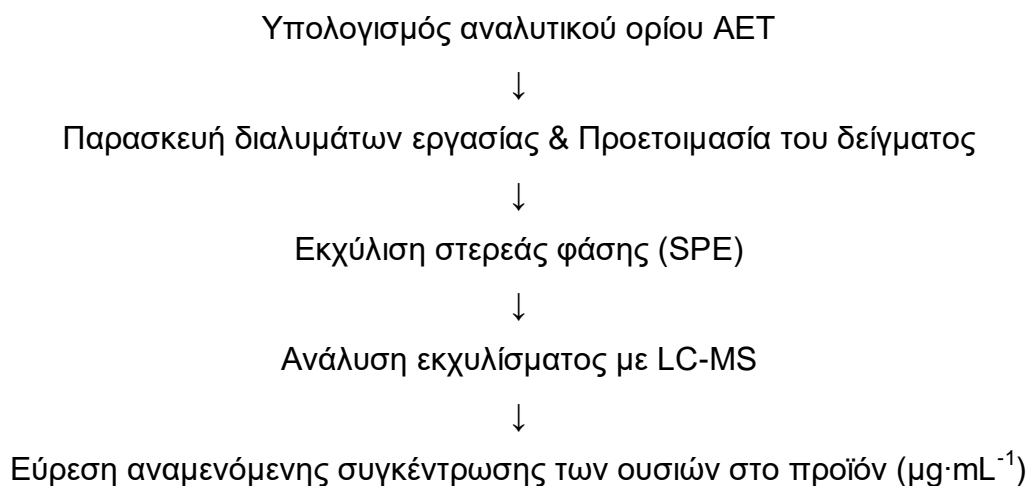
μαζών ικανό να προχωρήσει στην θραυσματοποίηση του αρχικώς απομονωμένου μοριακού ιόντος, ενισχύει τις δυνατότητες της μεθόδου για να διασαφηνίσει τη δομή των ενώσεων που ανιχνεύονται. Αυτή η μέθοδος στοχεύει σε ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών αναλυτών και κυρίως σε μη πτητικούς αναλύτες.

Αρχικά, υπολογίστηκε το αναλυτικό όριο AET, έπειτα έγινε η ανάλυση του δείγματος και στο τέλος έγινε αξιολόγηση για το αν μια «leachable ουσία» βρίσκεται στο δείγμα σε συγκέντρωση μεγαλύτερη του AET και άρα μπορεί να θεωρηθεί ως πιθανώς γενετοξική για την ανθρώπινη υγεία. Πιο συγκεκριμένα, έγινε αξιολόγηση για την ύπαρξη πλαστικοποιητών που έχουν μεταναστεύσει από τον περιέκτη στο περιεχόμενο του φαρμακευτικού σκευάσματος βορικοναζόλης (δραστική ουσία).

Το σκεύασμα βορικοναζόλης που μελετήθηκε είναι ένα ενέσιμο διάλυμα που χορηγείται ενδοφλέβια ως θεραπεία ενάντια διαφόρων ειδών μυκητιάσεων. Το εν λόγω σκεύασμα βρίσκεται αρχικά σε μορφή λυοφιλιωμένης σκόνης και λίγο πριν τη χορήγησή του στον ασθενή πραγματοποιείται η διάλυσή του σε κατάλληλο διαλύτη για τη μετατροπή του σε διάλυμα έτοιμο για ενδοφλέβια χορήγηση. Λόγω του πολύ χαμηλού αναλυτικού ορίου AET του δείγματος, η αναλυτική μέθοδος που αναπτύχθηκε/επικυρώθηκε και εφαρμόστηκε περιλαμβάνει διαδικασίες καθαρισμού και προσυγκέντρωσης του δείγματος με εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE). Στο τέλος, έγινε ανάλυση του εκχυλίσματος με την τεχνική LC-MS, ώστε να προσδιοριστούν τα ίχνη των πλαστικοποιητών που απελευθερώθηκαν στο περιεχόμενο του φαρμάκου.

Ο εργαστηριακός εξοπλισμός, οι πρώτες ύλες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν, περιγράφονται στο Παράρτημα Ι.

Τα στάδια της αναλυτικής μεθόδου που ακολουθήθηκαν, παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.1.



Σχήμα 5.1: Στάδια αναλυτικής μεθόδου σε δείγμα βορικοναζόλης

Η επικύρωση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το διάλυμα του προαναφερθέντος προϊόντος, η σύνθεσή του οποίου παρουσιάζεται στον Πίνακα 5.1.

Πίνακας 5.1: Σύσταση διαλύματος προϊόντος στην προ-λυοφιλοποιημένη μορφή

Συστατικά του προϊόντος	Συγκέντρωση (mg/ mL)
Βορικοναζόλη	20
Υδροξυλοπροπυλο-βητα-κυκλοδεξτρίνη	240
Χλωριούχο νάτριο	22,56
Υδροχλωρικό οξύ (1N)	μέχρι pH 5,6
Υπερκάθαρο νερό	μέχρι το 1mL

Πριν τη χρήση του λυοφιλοποιημένου τελικού προϊόντος, πραγματοποιήθηκε διάλυση του λυοφιλοποιημένου στερεού με προσθήκη 10 mL υπερκάθαρου νερού. Η χρήση του διαλύματος του προϊόντος και όχι του προϊόντος (στερεού), όπως αυτό εμπεριέχεται στην τελική συσκευασία, είναι αναγκαία ενέργεια δεδομένου ότι η διαδικασία λυοφιλοποίησης λαμβάνει χώρα εντός του τμήματος του γυάλινου φιαλιδίου της τελικής συσκευασίας και είναι επομένως αδύνατο να γίνει η παραδοχή ότι το εν λόγω προϊόν δεν θα αλληλεπιδράσει με το γυάλινο φιαλίδιο της τελικής συσκευασίας. Εξετάζοντας την τελική σύσταση του προϊόντος που παρουσιάζεται στον Πίνακα 5.2, είναι επίσης προφανές ότι το διάλυμα προϊόντος προ-λυοφιλοποίησης διαφέρει

μόνο ως προς την παρουσία ύδατος και δεν υπάρχουν επιπρόσθετοι παράγοντες για την υποβοήθηση της διαδικασίας λυοφιλοποίησης, οι οποίοι να απουσιάζουν στην τελική μορφή. Οι δύο συστάσεις επομένως είναι σε συμφωνία μεταξύ τους.

Πίνακας 5.2: Σύσταση τελικού προϊόντος Voriconazole 200 mg / φιαλίδιο σκόνη προς έγχυση

Συστατικό	Ρόλος	Συγκέντρωση (mg/ vial)
Βορικοναζόλη	Δραστική ουσία	200
Υδροξυλοπροπυλο-βητα-κυκλοδεξτρίνη	Παράγοντας συμπλοκοποίησης και διαλυτοποίησης	2400
Χλωριούχο νάτριο	Παράγοντας τονικότητας	225,6
Υδροχλωρικό οξύ (1N)	Παράγοντας ρύθμισης του pH (5,6)	μέχρι pH 5,6 (στο διάλυμα)

Ο Πίνακας 5.3 που ακολουθεί παρουσιάζει τα εξαρτήματα που αποτελούν τη συσκευασία του προϊόντος μαζί με διάφορα υλικά για κάθε μονάδα.

Πίνακας 5.3: Μέρη συσκευασίας τελικού προϊόντος

Εξάρτημα/ Ταυτοποίηση προϊόντος	Υλικό/ Χαρακτηρισμός
Γυάλινο δοχείο των 25 mL	Υδρολυτικό διάφανο γυαλί
Αλουμινένιο καπάκι με κόκκινη πλαστική σφραγίδα από πάνω	Αλουμίνιο και πλαστικό
Ελαστικό Πώμα	Γκρι χλωριωμένο ελαστικό πώμα

Οι ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ως αναλύτες-στόχοι για αυτή την επικύρωση καθορίστηκαν μέσω μιας μελέτης εκχύλισης (Extractable species profiling study) που πραγματοποιήθηκε πρωτίτερα στα υλικά συσκευασίας του τελικού προϊόντος. Σε πολλές περιπτώσεις η ένωση που επιλέγεται ως αναλύτης-στόχος αναμένεται να είναι χημικά συγγενής με τους αναλύτες που πιθανόν υπάρχουν στο προφίλ των «leachable ενώσεων».

Ο πλαστικοποιητής Ph. Eur. Plastic Additive 08, χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο (internal standard, IS), διότι, μετά από πειράματα, αποδείχθηκε ότι δίνει σήμα τόσο στη λειτουργία θετικού, όσο και στη λειτουργία αρνητικού ιοντισμού και επίσης το σήμα του ήταν παρόμοιο στις δύο λειτουργίες ιοντισμού.

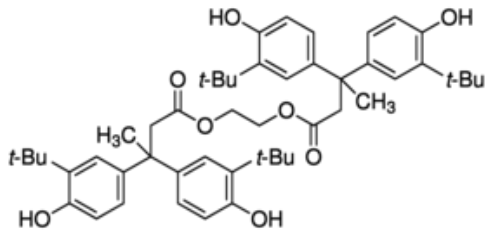
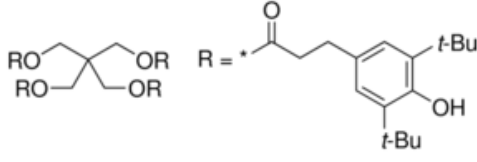
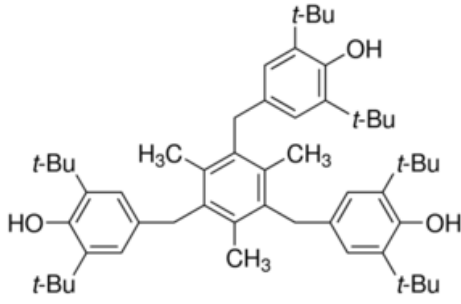
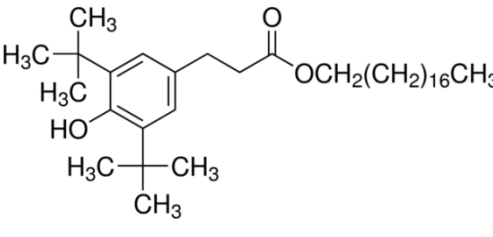
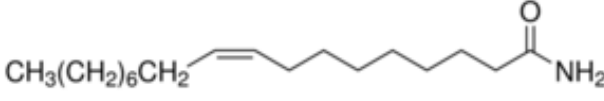
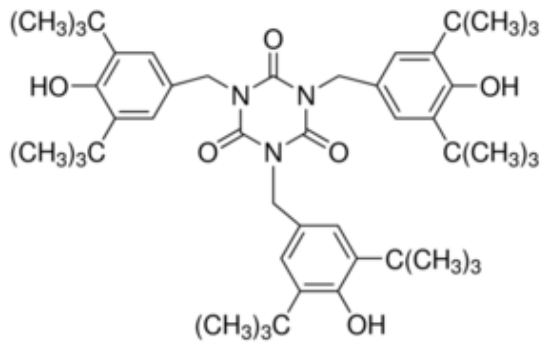
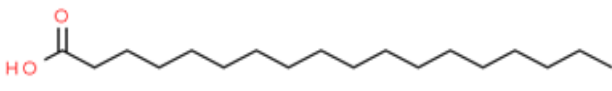
Οι αναλύτες-στόχοι (Ph. Eur. PlasticAdditives) 09, 11, 12, 13 και 21 ιοντίζονται μόνο κατά τη λειτουργία θετικού ιοντισμού, ενώ οι πλαστικοποιητές 10, 11 και 19 μόνο κατά τη λειτουργία αρνητικού ιοντισμού. Όσον αφορά στον αναλύτη-στόχο Plastic Additive 11, είναι δυνατός ο ιοντισμός και στις δύο λειτουργίες του ESI, επομένως εξετάστηκε και στις δύο πολικότητες.

Ο Πίνακας 5.4 παρουσιάζει τις ενώσεις που θα χρησιμοποιηθούν στην επικύρωση της μεθόδου UPLC-PDA-MS.

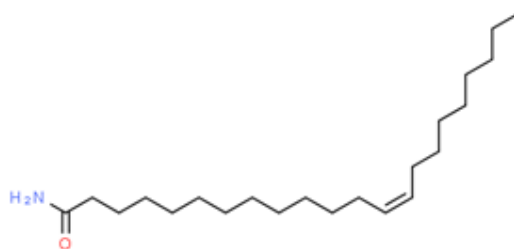
Πίνακας 5.4: Χημικές ουσίες αναφοράς (CRS) (πλαστικοποιητές) που θα χρησιμοποιηθούν ως αναλύτες στόχοι για την επικύρωση της LC-MS μεθόδου

Όνομασία ευρωπαϊκής φαρμακοποιίας	CAS number	Μοριακός Τύπος	Όνομα κατά IUPAC	Κατηγορία [61]
Ph. Eur. Plastic Additive 08 (IS)	32509-66-3	C ₅₀ H ₆₆ O ₈	Ethylene bis[3,3-bis[3-(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxyphenyl]butanoate]	Αντιοξειδωτικό
Ph. Eur. Plastic Additive 09	6683-19-8	C ₇₃ H ₁₀₈ O ₁₂	Pentaerythritol tetrakis (3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl) propionate	Αντιοξειδωτικό
Ph. Eur. Plastic Additive 10	1709-70-2	C ₅₄ H ₇₈ O ₃	1,3,5-Trimethyl-2,4,6-tris(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl) benzene	Αντιοξειδωτικό
Ph. Eur. Plastic Additive 11	2082-79-3	C ₃₅ H ₆₂ O ₃	Octadecyl 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate	Αντιοξειδωτικό
Ph. Eur. Plastic Additive 12	31570-04-4	C ₄₂ H ₆₃ O ₃ P	Tris(2,4-di-tert-butylphenyl) phosphite	Αντιοξειδωτικό
Ph. Eur. Plastic Additive 13	27676-62-6	C ₄₈ H ₆₉ N ₃ O ₆	1,3,5-Tris(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl)-s-triazine-2,4,6 (1H,3H,5H)-trione	Αντιοξειδωτικό
Ph. Eur. Plastic Additive 19	57-11-4	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	Στεατικόξύ (Stearic acid)ήOctadecanoic acid	Παράγοντας διασταύρωσης (Crosslinking agent)
Ph. Eur. Plastic Additive 21	112-84-5	C ₂₂ H ₄₃ NO	Ερουκαμίδιο (Erucamide)	Παράγοντας ολίσθησης (Slip agent)

Πίνακας 5.5: Συντακτικοί τύποι πλαστικοποιητών

Ph. Eur. Plastic Additive 08	
Ph. Eur. Plastic Additive 09	
Ph. Eur. Plastic Additive 10	
Ph. Eur. Plastic Additive 11	
Ph. Eur. Plastic Additive 12	
Ph. Eur. Plastic Additive 13	
Ph. Eur. Plastic Additive 19	

Ph. Eur. Plastic Additive 21



5.3 Ανάπτυξη μεθόδου

5.3.1 Υπολογισμός ορίου αναλυτικής αξιολόγησης (Analytical Evaluation Threshold, AET)

Σύμφωνα με τον οργανισμό PQRI (Product Quality Research Institute), το όριο ασφαλείας SCT που καθορίζει αν μια ουσία είναι γεντοτοξική (genotoxic) σε ένα παρεντερικό σκεύασμα, ανέρχεται στα 1,5 µg/day. Αντίστοιχα, το όριο SCT για μια ερεθιστική ουσία (irritant/toxic) σε παρεντερικό σκεύασμα καθορίζεται στα 5 µg/day. [8, 66] Σύμφωνα με το γενικότυπο μετατροπής του SCT στο όριο AET, αυτό υπολογίζεται με βάση το σενάριο «χειρότερης περίπτωσης» (worst case scenario), όπου στο δείγμα ενυπάρχει μια ουσία γεντοτοξικού ή τοξικού χαρακτήρα για τον ανθρώπινο οργανισμό. [3]

Το όριο αναλυτικής αξιολόγησης (AET) αναφέρεται στη συγκέντρωση πάνω από την οποία πρέπει να προσδιοριστούν ή / και να ποσοτικοποιηθούν οι «leachable ενώσεις» που ανιχνεύτηκαν. Σύμφωνα με το SPC (Summary of Product Characteristics, Περίληψη Χαρακτηριστικών Προϊόντος), λαμβάνοντας υπόψη τη φάση φόρτωσης (loading phase) για τη χορήγηση του φαρμάκου και ένα άτομο με βάρος σώματος κατά προσέγγιση 80 Kg, η μέγιστη ημερήσια δόση σε ενεργό φαρμακευτικό συστατικό είναι 960 mg. Αυτή η δόση αντιστοιχεί σε περίπου 4,8 μονάδες προϊόντος 200 mg/φιαλίδιο.

Ο υπολογισμός για το συγκεκριμένο όριο ακολουθεί τις συστάσεις της αντίστοιχης κατευθυντήριας γραμμής/ οδηγίας (guideline) της USP, για την οποία χρησιμοποιείται η ακόλουθη εξίσωση: [3] (§ 1.3)

$$AET_{(\mu\text{g}/\text{container})} = \left(\frac{SCT \mu\text{g}/\text{day}}{\text{doses}/\text{day}} \right) \times \left(\frac{\text{doses}}{\text{container}} \right) \quad (5.1)$$

$$AET_{(\mu\text{g}/\text{mL})} = \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{container}} \right) \div \left(\frac{\text{mL}}{\text{container}} \right) \quad (5.2)$$

Πιο αναλυτικά, για μια ουσία που έχει χαρακτηριστεί γενετοξικού χαρακτήρα:

$$AET_{\text{genotoxic}} = \left(\frac{1,5 \mu\text{g}/\text{day}}{4,8 \text{ doses}/\text{day}} \right) \times \left(\frac{1 \text{ dose}}{\text{product container}} \right) \times 0,5 \text{ (uncertainty factor)}$$

≈ 0,1563 μggenotoxiccompound/ productcontainer

Ομοίως, για μια ουσία που έχει χαρακτηριστεί ως τοξική/ερεθιστική:

$$AET_{\text{toxic/irritant}} = \left(\frac{5,0 \mu\text{g}/\text{day}}{4,8 \text{ doses}/\text{day}} \right) \times \left(\frac{1 \text{ dose}}{\text{product container}} \right) \times 0,5 \text{ (uncertainty factor)}$$

≈ 0,5208 μg toxic ή irritant compound/ product container

Παρατηρείται ότι το όριο AET για το οποίο μια ουσία μπορεί να χαρακτηριστεί ως γενετοξική, είναι σαφώς χαμηλότερο, σε σχέση με το AET για μια ουσία τοξική που προκαλεί ερεθισμό. Η παρούσα μελέτη μετανάστευσης έχει στόχο να ελέγξει την ύπαρξη πλαστικοποιητών σε συγκέντρωση μεγαλύτερη ή μικρότερη του AET_{genotoxic}.

5.3.2 Πειραματική πορεία – Παρασκευή διαλυμάτων/ δειγμάτων για την επικύρωση της μεθόδου

5.3.2.1 Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας

- Πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης πλαστικοποιητών (stock solutions of plastic additives, SS-PA) σε συγκέντρωση 1000 ppm (μg/mL) το καθένα, σε διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα:

Ζύγιση 10 mg του εκάστοτε πλαστικοποιητή και αραιώση μέχρι τα 10 mL σε κατάλληλη ογκομετρική φιάλη.

Τα διαλύματα των πλαστικοποιητών διατηρήθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης στην κατάψυξη σε θερμοκρασία -15 ± 3 °C, όπως ορίζει η Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία. Στον Πίνακα 5.4 παρουσιάζονται οι πλαστικοποιητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη της μεθόδου. Πρόκειται για χημικές ουσίες αναφοράς (CRS) του Ευρωπαϊκού Οργανισμού EDQM. [65]

- Ενδιάμεσο (intermediate) διάλυμα εσωτερικού προτύπου IS_{LC}, INT-IS_{LC} σε συγκέντρωση 31,3 µg/mL:

Μεταφέρθηκαν 0,157 mL από το διάλυμα παρακαταθήκης του εσωτερικού προτύπου (Ph. Eur. Plastic Additive 08), SSIS, σε ογκομετρική φιάλη των 5 mL που είχε προ-συμπληρωθεί με 2 mL διαλύματος κινητής φάσης B (§ 5.3.3) και αναμείχθηκαν με τη χρήση vortex για 20 sec για ενσωμάτωση. Στη συνέχεια αραιώθηκε το διάλυμα μέχρι τη χαραγή της φιάλης με τον ίδιο διαλύτη και αναδεύτηκε ξανά με vortex για 20 sec. Το διάλυμα αποθηκευόταν σε θερμοκρασία 5 ± 3 °C, όταν δεν χρησιμοποιούταν.

- Διάλυμα εργασίας εσωτερικού προτύπου IS_{LC} σε συγκέντρωση 3,13 µg/mL:

Παρασκευάστηκε με αραιώση 0,500 mL του INT-IS_{LC} σε ογκομετρική φιάλη των 5 mL, όπως περιγράφεται ανωτέρω.

- Διάλυμα που περιέχει τους αναλύτες στόχους, Ref_{LC}-C σε συγκέντρωση 35 µg/mL:

Μεταφέρθηκε όγκος ίσος με 0,175 mL από καθένα από τα προετοιμασμένα διαλύματα παρακαταθήκης (SS-PA) των αναλυτών που ,εκτός από αυτό του εσωτερικού προτύπου, δηλαδή τα διαλύματα SS-PA9, SS-PA10, SS-PA11, SS-PA12, SS-PA13, SS-PA19 και SS-PA21 (βλέπε πίνακα 5.4) σε ογκομετρική φιάλη των 5 mL που περιείχε με 2,0 mL κινητής φάσης B. Αναμείχθηκαν με vortex για ενσωμάτωση και αραιώθηκαν μέχρι τη χαραγή με

τον ίδιο διαλύτη. Ανακινήθηκαν πάλι με τη χρήση του Vortex για 1 min. Το διάλυμα αποθηκευόταν σε θερμοκρασία 5 ± 3 °C, όταν δεν χρησιμοποιούταν.

- Διάλυμα που περιέχει τους αναλύτες στόχους, Ref_{LC}-B σε συγκέντρωση 10 µg/mL:

Παρασκευάστηκε όπως ανωτέρω χρησιμοποιώντας 0,050 mL από τα διαλύματα παρακαταθήκης των αναλυτών.

- Διάλυμα που περιέχει τους αναλύτες στόχους, Ref_{LC}-A σε συγκέντρωση 1,0 µg/mL:

Παρασκευάστηκε όπως ανωτέρω χρησιμοποιώντας 0,500 mL από το διάλυμα Ref_{LC}-B

5.3.2.2 Γενική προετοιμασία δειγμάτων – Προκατεργασία με την τεχνική SPE

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει ένα στάδιο προ-συγκέντρωσης / εκχύλισης των αναλυτών στόχων μέσω εκχύλισης στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE). Το προσροφητικό υλικό που χρησιμοποιείται είναι το τροποποιημένο (end-capped) με οκταδεκυλο-διοξειδίου του πυριτίου (C18), το οποίο είναι γνωστό ότι είναι το πλέον άπολο και λιγότερο επιλεκτικό των κοινώς χρησιμοποιούμενων προσροφητών, προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι πιθανές απώλειες κατά τη φάση φόρτωσης. Τα φυσίγγια της SPE που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα Chromabond C18 ec ef, ένας υποτύπος σχεδιασμένος για να υποστηρίζει τη γρήγορη ροή του διαλύματος μέσω της στατικής φάσης και να επιτρέπει την ξήρανση του προσροφητικού υλικού χωρίς την εφαρμογή υψηλού κενού, γεγονός που μπορεί να εφαρμοστεί και για πτητικούς αναλύτες.

A. Φάση προετοιμασίας-ενεργοποίησης των φυσιγγίων SPE:

Δεδομένου ότι τα φυσίγγια είναι πολυμερικής σύνθεσης η φάση αυτή στοχεύει στην εξάλειψη της πιθανής συγκέντρωσης υποβάθρου σε αναλύτες στόχους.

- i. Στάδιο έκπλυσης: 6 mL 2-προπανόλης καθαρότητας HPLC φορτώνεται στα φυσίγγια. Ο διαλύτης αφήνεται να ρέει λόγω βαρύτητας για να διαλύσει τυχών επιμολύνσεις.
- ii. Σταδιο ενεργοποίησης προσροφητή και αφαιρέσεως υπολειπόμενου όγκου 2-προπανόλης: 15 mL μεθανόλης, καθαρότητας LC-MS, φορτώνεται στο φυσίγγιο και αφήνεται να ρέει λόγω βαρύτητας.
- iii. Στάδιο εξισορρόπησης: 15 mL νερού HPLC φορτώνονται στο φυσίγγιο. Το φυσίγγιο δεν επιτρέπεται να στεγνώσει μεταξύ των σταδίων, αλλά ούτε και μετά το πέρας του τρίτου σταδίου εξισορρόπησης.

B. Φάση φόρτωσης (Loading phase):

Σε 20 mL διαλύματος προϊόντος (ισοδύναμο με την ανασυσταθείσα περιεκτικότητα δύο μονάδων προϊόντος) προστίθεται 0,100 mL διαλύματος IS_{LC} και την κατάλληλη ποσότητα από τους αναλύτες-στόχους. Ακολουθεί ενσωμάτωση με τη βοήθεια vortex για 20 sec και το εμβολιασμένο διάλυμα προϊόντος φορτώνεται στο ενεργοποιημένο φυσίγγιο της SPE.

Γ. Φάση έκλουσης (elution phase):

Το φυσίγγιο ξηραίνεται υπό συνθήκες χαμηλής πίεσης κενού για χρονική περίοδο περίπου 1 min. Οι αναλύτες που συγκρατούνται από τον προσροφητή στη συνέχεια εκλούνται χρησιμοποιώντας 6,0 mL μίγματος έκλουσης το οποίο αποτελείται από 10% 2-προπανόλη και 90% κ-εξάνιο. Το εκλουσθέν διάλυμα συλλέγεται σε υάλινο δοκιμαστικό σωλήνα. Ακολουθεί ξήρανση φυσιγγίου υπό συνθήκες χαμηλής πίεσης κενού για 1-2 min και το εκλουσθέν διάλυμα συλλέγεται στον ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα. Έπειτα, το διάλυμα που έχει συλλεχθεί εξατμίζεται μέχρι ξηρού υπό ήπιο ρεύμα αζώτου και στη συνέχεια γίνεται ανασύσταση αυτού με 1,0 mL διαλύματος κινητής φάσης B. Το δείγμα, στη συνέχεια, φιλτράρεται μέσω ενός φίλτρου RC (αναγεννημένης κυτταρίνης) 0,2 μm και μεταφέρεται σε φιαλίδιο δείγματος (sample vial) για να αναλυθεί.

Η προηγούμενη τιμή του ΑΕΤ (§ 5.3.1) εκφράζεται βάσει των πειραματικών διαδικασιών σε συγκέντρωση διαλύματος ελέγχου:

$$\begin{aligned} \text{ΑΕΤ} &= \frac{0,1563 \mu\text{g genotoxic compound / product container}}{20,0 \text{ mL reconstituted solution}} \times 2 \text{ product containers} = \\ &0,01563 \mu\text{g genotoxic compound/reconstituted solution} \equiv \\ &\frac{0,01563 \mu\text{g genotoxic compound reconstituted solution}}{6,0 \text{ mL eluted solvent}} \times 20,0 \text{ mL reconstituted solution} \times \\ &\frac{6,0 \text{ mL eluted solvent}}{1,0 \text{ mL test solution}} = 0,3126 \mu\text{g genotoxic compound /mL test solution} \end{aligned}$$

5.3.2.3 Παρασκευή διαλυμάτων για την επικύρωση μεθόδου

Έλεγχος Ειδικότητας (Specificity)

Ο έλεγχος της πιθανής παρουσίας των αναλυτών-στόχων στο δείγμα έγινε με την παρασκευή και τη σύγκριση των ακόλουθων δύο διαλυμάτων:

- **Διάλυμα προϊόντος εμβολιασμένο με το εσωτερικό πρότυπο:**

Δύο φιαλίδια προϊόντος ανασυστάθηκαν με 10,0 mL νερού HPLC το καθένα και αναδεύτηκαν με vortex για επίτευξη της πλήρους διάλυσης του στερεού. Ακολούθησε συνένωση των δύο διαλυμάτων και εμβολιασμός με 0,100 mL διαλύματος IS_{LC}.

- **Διάλυμα προϊόντος χωρίς εσωτερικό πρότυπο:**

Όπως ανωτέρω χωρίς την προσθήκη διαλύματος IS_{LC}.

Έλεγχος Γραμμικότητας (Linearity) – Καθαρά διαλύματα

- **Πρότυπο διάλυμα E, STD-E, 3,5 μg/mL:**

Μεταφέρθηκε όγκος ίσος με 1,0 mL από το διάλυμα Ref_{LC}-C (§ 5.3.2.1) σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL που περιείχε 2,0 mL κινητής φάσης B. Αναμείχθηκαν με vortex για ενσωμάτωση και αραιώθηκαν μέχρι τη χαραγή

με τον ίδιο διαλύτη. Ανακινήθηκαν πάλι με τη χρήση του vortex για 1 min. Το διάλυμα αποθηκευόταν σε θερμοκρασία 5 ± 3 °C, όταν δεν χρησιμοποιούταν.

- Πρότυπο διάλυμα D, STD-D, 2,0 µg/mL:
Όπως ανωτέρω χρησιμοποιώντας 1,0 mL διαλύματος Ref_{LC}-B.
- Πρότυπο διάλυμα C, STD-C, 1,0 µg/mL:
Όπως ανωτέρω χρησιμοποιώντας 0,500 mL διαλύματος Ref_{LC}-B.
- Πρότυπο διάλυμα B, STD-B, 0,50 µg/mL:
Όπως ανωτέρω χρησιμοποιώντας 0,250 mL διαλύματος Ref_{LC}-B.
- Πρότυπο διάλυμα A, STD-A, 0,06 µg/mL:
Όπως ανωτέρω χρησιμοποιώντας 0,600 mL διαλύματος STD-B.

Έλεγχος Γραμμικότητας (Matrix Matched Linearity, MM) –

Διαλύματα που προσομοιάζουν τη μήτρα του δείγματος

Βαθμονομητής (Calibrant): πρότυπο διάλυμα παρασκευασμένο με τρόπο που να προσομοιάζει τη μήτρα του δείγματος (Matrix matched standard solution).

Για την παρασκευή των βαθμονομητών που προσομοιάζουν στη μήτρα του δείγματος ακολουθήθηκε η γενική πειραματική πορεία προκατεργασίας, που περιγράφεται στην ενότητα 5.3.2.2, μέχρι το στάδιο πριν την ανασύσταση με το 1,0 mL κινητής φάσης B, δηλαδή την εξάτμιση μέχρι ξηρού.

- Βαθμονομητής-E, MM-STD-E, 3,5 µg/mL:
Μετά την εξάτμιση μέχρι ξηρού, γίνεται ανασύσταση με 0,900 mL κινητής φάσης B και εμβολιασμός με 0,100 mL από το διάλυμα Ref_{LC}-C. Ακολουθεί ανάδευση με τη χρήση vortex και διήθηση του διαλύματος με φίλτρο RC 0,20 µm.

- Βαθμονομητής-C, MM-STD-C, 1,0 µg/mL:

Όπως ανωτέρω με χρήση 0,100 mL διαλύματος Ref_{LC}-B.

- Βαθμονομητής-A, MM-STD-A, 0,06 µg/mL:

Όπως ανωτέρω με χρήση 0,940 mL κινητής φάσης και 0,060 mL διαλύματος Ref_{LC}-A.

Έλεγχος Ακρίβειας (Accuracy) &

Όριο ποσοτικοποίησης (Limit of quantification, LOQ)

- Εμβολιασμένο δείγμα A (Spiked sample A), 0,1 µg/mL:

Δύο φιαλίδια προϊόντος ανασυστάθηκαν με 10,0 mL νερού HPLC το καθένα και αναδεύτηκαν με vortex για επίτευξη της πλήρους διάλυσης του στερεού. Ακολούθησε συνένωση των διαλυμάτων και εμβολιασμός με 0,100 mL διαλύματος IS_{LC} και 0,100 mL διαλύματος Ref_{LC}-A.

Πραγματοποιήθηκαν τρεις παρασκευές του παραπάνω διαλύματος από τον ίδιο αναλυτή, την ίδια ημέρα.

- Εμβολιασμένο δείγμα B (Spiked sample B), 1,0 µg/mL:

Όπως ανωτέρω με χρήση 0,100 mL διαλύματος Ref_{LC}-B.

- Εμβολιασμένο δείγμα C (Spiked sample C), 3,5 µg/mL:

Όπως ανωτέρω με χρήση 0,100 mL διαλύματος Ref_{LC}-C.

Έλεγχος Πιστότητας (Precision) -

Έλεγχος Επαναληψιμότητας (Repeatability)

- Εμβολιασμένο δείγμα B (Spiked sample B), 1,0 µg/mL:

Όπως περιγράφηκε ανωτέρω.

Πραγματοποιήθηκαν έξι παρασκευές του παραπάνω διαλύματος από τον ίδιο αναλυτή, την ίδια ημέρα.

Έλεγχος Πιστότητας (Precision) -

Έλεγχος Ενδιάμεσης πιστότητας (Intermediate Precision)

- Εμβολιασμένο δείγμα B (Spiked sample B), 1,0 µg/mL:

Όπως περιγράφηκε ανωτέρω.

Πραγματοποιήθηκαν τρεις παρασκευές του παραπάνω διαλύματος από διαφορετικό αναλυτή, μια άλλη ημέρα.

Έλεγχος Σταθερότητας (Stability)

- Εμβολιασμένο δείγμα B (Spiked sample B), 1,0 µg/mL:

Όπως περιγράφηκε ανωτέρω.

Έλεγχος καταλληλότητας συστήματος

(System Suitability Testing, SST/ System Precision)

- Διάλυμα SST-1, (ένεση μία φορά ανά τρόπο λειτουργίας (ESI +/-))

Μεταφέρθηκαν 0,100 mL από το διάλυμα παρακαταθήκης του κάθε ενός από τους οχτώ αναλύτες σε φιαλίδιο δείγματος και αναμίχθηκαν με vortex. Η συγκέντρωση του κάθε αναλύτη ήταν πλέον 125,0 µg/mL. Έπειτα μεταφέρθηκαν 0,500 mL από αυτό το ενδιάμεσο διάλυμα σε ογκομετρική φιάλη των 5 mL που περιείχε 2,0 mL κινητής φάσης B, αραιώθηκε το διάλυμα μέχρι τη χαραγή με τον ίδιο διαλύτη και ανακατεύθηκε ξανά με vortex για 20 sec. Η συγκέντρωση του παρασκευασθέντος διαλύματος SST-1 για κάθε αναλύτη είναι περίπου 12,5 µg/mL και υπολογίστηκε με τον ακόλουθο τύπο:.

$$\text{Συγκέντρωση αναλυτών} = \left(\frac{0,100 \text{ mL} \times 1000 \text{ µg/mL}}{N \times 0,100 \text{ mL}} \right)$$

όπου N είναι ο αριθμός των αναλυτών

- Διάλυμα SST-2, (ένεση πέντε συνεχόμενες φορές ανά τρόπο λειτουργίας (ESI +/-))

Ακολουθήθηκε η διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος με μόνη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκαν 20,0 mL νερού HPLC αντί του διαλύματος του προϊόντος. (Τα 20,0 mL νερού HPLC ισοδυναμούν ποσοτικά με το περιεχόμενο δύο φιαλιδίων προϊόντος που έχουν ανασυσταθεί με 10,0 mL νερού HPLC το καθένα).

5.3.3 Ανάλυση - Προσδιορισμός “leachables” ουσιών με LC-MS/MS (QqQ)

Ο προσδιορισμός των ουσιών, που μεταναστεύουν από τον περιέκτη του φαρμακευτικού σκευάσματος, έγινε για την τεχνική της υγροχρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών με ηλεκτροψεκασμό (LC-ESI-MS/MS). Η τεχνική αυτή επιλέχθηκε, καθώς στο τελικό εκχύλισμα έγινε ανασύσταση με μίγμα διαλυτών (44% ακετονιτρίλιο και 56% μεθανόλη, κατ' όγκο), κατάλληλο για την εισαγωγή του δείγματος σε σύστημα LC παρουσία υδατικής κινητής φάσης. Στην ενότητα αυτή, θα αναφερθούν οι παράμετροι που επιλέχθηκαν στο σύστημα της υγροχρωματογραφίας (κινητή φάση, στήλη), καθώς και στο σύστημα φασματομετρίας μαζών (MS mode, acquisition time).

A. Σύστημα Υγροχρωματογραφίας (HPLC)

Ο αρχικός διαχωρισμός των αναλυτών στο σύστημα LC-MS/MS, έγινε με την τεχνική της υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Δεδομένου ότι η φύση των αναλυτών είναι μη πολικού χαρακτήρα, εφαρμόστηκε η υγροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης (Reversed Phase). Η τεχνική αυτή απαιτεί μια σχετικά μη πολική στατική φάση, γι' αυτό και χρησιμοποιήθηκε μια Pentafluorophenyl (PFP) στήλη. Αντίθετα, για την κινητή φάση (πολική), έγινε χρήση πολικών διαλυτών. Παρακάτω παρουσιάζονται οι παράμετροι του

χρωματογραφικού συστήματος που επιλέχθηκαν μετά από αρκετά πειράματα βελτιστοποίησης.

Χρωματογραφικό Σύστημα	<u>ShimadzuNexeraX2 HPLC</u> LC-30AD UPLC αντλία με τέσσερα κανάλια DGU-20A5R απαερωτήρας SIL30AC αυτόματο δειγματολήπτη CTO-20AC φούρνο στήλης SPD-M20A IVDD PDA ανιχνευτή Λογισμικό LabSolutions v.5,75		
Κινητή φάση A	5 mM υδατικού διαλύματος οξικού αμμωνίου		
Κινητή φάση B	44% ACN σε MeOH (v/v)		
Στήλη	Phenomenex, Kinetex®, PFP, 100 × 2,1mm × 1,7μm (Part No: 00D-4476-AN)		
Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης	<u>Χρόνος</u> (min)	<u>% Κινητή</u> <u>φάση B</u>	<u>Ροή</u> (mL/min)
	0,0	10	0,20
	0,3	10	0,20
	7,9	90	0,20
	28,3	90	0,20
Όγκος Ένεσης	10 μL		
Θερμοκρασία δειγματολήπτη	12 °C		
Μέγιστη πίεση (psi)	15000 psi		
Θερμοκρασία στήλης	35 °C		
Παράμετροι PDA	Μήκη κύματος: 310, 330, 350, 380 (± 4) nm		
Λυχνία	D2		
Θερμοκρασία κυψελίδας	40 °C		
Πλάτος σχισμής	1,2 nm		

- **Κριτήρια επιλογής και μηχανισμός δράσης χρωματογραφικής στήλης PFP:**

Οι φθοριωμένες στατικές φάσεις έχουν δείξει μεγάλη εκλεκτικότητα για διάφορες κατηγορίες ενώσεων και σε πολλές περιπτώσεις έχουν αποδειχθεί χρήσιμες ως εναλλακτική λύση έναντι των παραδοσιακών στατικών φάσεων C18 και C8, ειδικότερα όταν ο επιδιωκόμενος διαχωρισμός αναλυτών είναι πιο απαιτητικός.

Οι στατικές φάσεις PFP χρησιμοποιούν πολλαπλούς μηχανισμούς κατακράτησης για τον διαχωρισμό των ενώσεων. Περιλαμβάνονται υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, π-π αλληλεπιδράσεις, αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου και αλληλεπιδράσεις δεσμού υδρογόνου. Ο βαθμός επικράτησης του κάθε μηχανισμού κατακράτησης επηρεάζεται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ένωσης που κατακρατείται, τη δομή της και τις χρωματογραφικές συνθήκες.

Τα ηλεκτροαρνητικά άτομα φθορίου της στατικής φάσης δημιουργούν στο φαινυλικό δακτύλιο έλλειψη ηλεκτρονίων έτσι, ώστε η στατική φάση PFP να δρα ως οξύ κατά Lewis ή ως δέκτης ηλεκτρονίων. Η π-π αλληλεπίδραση μπορεί να συμβεί με αναλύτες πλούσιους σε ηλεκτρόνια (βάσεις κατά Lewis). Οι δεσμοί άνθρακα-φθορίου του δακτυλίου είναι πολύ πολικοί, επιτρέποντας έτσι στους αναλύτες να συγκρατούνται επιπρόσθετα με αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου και αλληλεπιδράσεις δεσμού υδρογόνου, με αποτέλεσμα την αυξημένη κατακράτηση του αναλύτη.

Οι στατικές φάσεις PFP δείχνουν εξαιρετική εκλεκτικότητα ειδικά για πολύ πολικούς αναλύτες, αρωματικές και ακόρεστες ενώσεις, φαινόλες, αλογονωμένες ενώσεις και ταξάνες. Επιπλέον, τα ισομερή θέσης εμφανίζουν αυξημένο διαχωρισμό σε στατικές φάσεις PFP. Οι φάσεις PFP μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε υψηλά υδατικές συνθήκες.

- **Κριτήρια επιλογής κινητών φάσεων A και B στο σύστημα LC-MS/MS:**

Κινητή Φάση A: 5 mM υδατικό διάλυμα οξικού αμμωνίου

Παρέχει ιόντα NH_4^+ και ιόντα H^+ μέσω ιοντισμού της κινητής φάσης στο ESI, δημιουργώντας ισχυρούς δεσμούς H-C με τα μόρια των αναλυτών. Η κινητή φάση A, αποτελεί έναν ιδανικό πολικό διαλύτη στην HPLC, συμβατό παράλληλα στο MS και για τις δύο λειτουργίες του (ESI(+), ESI(-)).

Κινητή Φάση B: 44% ACN σε MeOH (v/v)

Τόσο το ακετονιτρίλιο, όσο και η μεθανόλη αποτελούν ιδανικούς πολικούς διαλύτες, λόγω μεγάλης εκλουστικής ισχύος. Βοηθάει, επίσης, στην ενίσχυση του σήματος στην λειτουργία ESI (-) στο MS.

B. Σύστημα Φασματομετρίας Μαζών (MS/MS)

Η ανίχνευση των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με τη μορφή ιόντων με τον αναλυτή μαζών, MS. Για τον ιοντισμό και την εξαέρωση του δείγματος, επιλέχθηκε ως πηγή ιοντισμού ο ηλεκτροψεκασμός (ESI). Το ESI αποτελεί μια μαλακή πηγή εκρόφησης. Ο κύριος λόγος που επιλέχθηκε είναι ότι συνδυάζεται με το σύστημα HPLC, παρέχοντας καλή ευαισθησία και εύκολη ποσοτικοποίηση. Παρακάτω παρουσιάζονται οι παράμετροι του συστήματος.

Φασματόμετρο μαζών	Shimadzu 8040 τριπλό τετράπολο (QqQ) με λογισμικό LabSolutions v.5,75
Πηγή Ιοντισμού	Ηλεκτροψεκασμός (ESI)
Πολικότητα	Θετικός ιοντισμός ESI (+) / Αρνητικός ιοντισμός ESI (-)
Λειτουργία σάρωσης/ανάλυσης	MS (όχι θραυσματοποίηση) Mode : Q1 Scan, HR
Χρόνος λήψης δεδομένων	0 – 28,3 min
Εύρος σάρωσης	m/z 125 έως 1250

Ταχύτητα σάρωσης	10000 u/s
Διάρκεια ανάγνωσης ιόντος	0,150 s
Δυναμικό πηγής	4 kV
Ροή αερίου εκνέφωσης	2 L/min
Ροή αερίου ξήρανσης	12,5 L/min

Για την ανίχνευση των ιόντων και την καταγραφή των μαζών τους (m/z), επιλέχτηκε η λειτουργία MS (χωρίς θραυσματοποίηση), όπου γίνεται σάρωση όλων των μαζών στο πρώτο τετράπολο (Q1 Scan). Από τα τετράπολα Q2, Q3, γίνεται απλή διέλευση των ιόντων. Η τεχνική “Full-Scan MS”, παρέχει φάσμα πλήρους σάρωσης ανά χρονική στιγμή, δίνοντας πληροφορίες για το μοριακό βάρος των ενώσεων.



Εικόνα 5.1: Τριπλό τετράπολο – Λειτουργία πλήρους σάρωσης (Full-Scan) MS[62]

Η τεχνική LC-MS είναι σε θέση να δημιουργήσει ένα χαρακτηριστικό “προφίλ” για τις «leachable ουσίες» στη μορφή των χρωματογραφημάτων. Τα ακριβή δεδομένα των ενώσεων που εξάγονται από το MS περιλαμβάνουν:

- Το μονοϊσοτοπικό μοριακό βάρος του ιόντος της ουσίας
- Το μοριακό τύπο της ουσίας με βάση τις ακριβείς μετρήσεις μάζας ή και τις μετρήσεις της ακριβούς αναλογίας ισοτόπων (isotope ratio) του μοριακού ιόντος
- Τον τρόπο θραυσματοποίησης των αναλυτών, με βάση τη θραυσματοποίηση στην πηγή ιοντισμού (in-source fragmentation) ή κατά τη διαδοχική φασματομετρία μαζών (tandem MS)

Η οργανολογία LC-MS εξάγει κατά την ανάλυση ενός δείγματος δύο κύρια δεδομένα. Αυτά είναι ο χρόνος ανάσχεσης των άγνωστων ουσιών (R_t) και τα φάσματα μαζών σε κάθε χρονική στιγμή (MS spectra). Από το φάσμα μαζών μια άγνωστης «leachable ένωσης» υπάρχει η δυνατότητα εύρεσης του μοριακού τύπου της ένωσης. Στη συνέχεια με τη βοήθεια βιβλιοθηκών (π.χ. Chemsprider) μπορεί να βρεθεί η συντακτική της δομή και τέλος, συγκρίνοντας τα δεδομένα της άγνωστης ένωσης με αυτά των πρότυπων ουσιών αναφοράς, είναι δυνατό να επιβεβαιωθεί η ταυτοποίηση της άγνωστης ένωσης. Παρόλο αυτά, οι πρότυπες ουσίες αναφοράς δεν είναι πάντα διαθέσιμες και γι' αυτό κρίνεται απαραίτητη η δημιουργία και χρήση των επιπέδων εμπιστοσύνης – ταυτοποίησης. [33, 40] Τα στάδια που λαμβάνουν χώρα και τα δεδομένα που παράγονται κατά τη διαδικασία της ταυτοποίησης είναι τα εξής:

1. Η εύρεση του μοριακού βάρους
2. Η εξέταση του ισοτοπικού προφίλ
3. Η εύρεση της στοιχειακής σύστασης του δείγματος (μοριακός τύπος)
4. Ο τρόπος θραυσματοποίησης της μάζας
5. Η σύγκριση του φάσματος μαζών με αντίστοιχα διαθέσιμων βιβλιοθηκών (π.χ. NIST)
6. Η σύγκριση του φάσματος μαζών και του χρωματογραφικού χρόνου ανάσχεσης με αυτά της πρότυπης ουσίας αναφοράς

Μία επιβεβαιωμένη ταυτοποίηση (confirmed) σημαίνει ότι κατά το στάδιο 6, υπάρχει πλήρης ταύτιση του χρόνου ανάσχεσης και του φάσματος μαζών ανάμεσα στο πρότυπο και την άγνωστη ένωση.

Μία σίγουρη ταυτοποίηση (confident) σημαίνει ότι η αξιολόγηση έχει συμπεριλάβει τα πρώτα πέντε στάδια που περιγράφονται παραπάνω και υπάρχει ταύτιση κατά τη σύγκριση του φάσματος μαζών της άγνωστης ένωσης με αντίστοιχο φάσμα μαζών διαθέσιμων βιβλιοθηκών.

Μία ενδεικτική ταυτοποίηση (tentative), αλλά όχι σίγουρη, σημαίνει ότι έχουν πραγματοποιηθεί τα τέσσερα από τα έξι παραπάνω στάδια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6.1 Χαρακτηριστικά Ποιότητας μεθόδου

Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου, πραγματοποιήθηκε έλεγχος των χαρακτηριστικών ποιότητάς της. Οι παράμετροι που θα παρουσιαστούν είναι η δοκιμασία καταλληλότητας του συστήματος, η εξειδίκευση της μεθόδου, η γραμμικότητά της, η ακρίβεια της μεθόδου, η επαναληψιμότητα και η ενδιάμεση πιστότητα του οργάνου, καθώς επίσης και η σταθερότητα των διαλυμάτων και η ανθεκτικότητα της μεθόδου. Τα χαρακτηριστικά ποιότητας προσδιορίστηκαν, τόσο σε θετικό, όσο και σε αρνητικό ιοντισμό στο ESI.

6.2 Έλεγχος καταλληλότητας συστήματος

Ελέγχθηκε με τα ακόλουθα δύο κριτήρια:

i) Ανίχνευση ενώσεων με βάση το λόγο m/z και κριτήριο S/N

Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό μέσω της εφαρμογής κατάλληλων δυναμικών, επιτρέπει την είσοδο των ιόντων στο MS. Τα ιόντα που δημιουργούνται είναι συνήθως ψευδομοριακά $[M+H]^+$ και $[M-H]^-$, ενώ υπάρχουν και περιπτώσεις που σχηματίζονται ιόντα προσθήκης (adduct ions). Μια τέτοια περίπτωση είναι η δημιουργία μεγαλύτερων ιόντων, όπως τα ιόντα $[M+NH_4]^+$.

Πριν την ανάπτυξη της μεθόδου, παρασκευάστηκε ένα διάλυμα (SST-1)(§ 5.3.2.3), το οποίο περιείχε όλους τους πλαστικοποιητές σε συγκέντρωση 12,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (ppm) σε διαλύτη με σύσταση 44% ακετονιτρίλιο και 56% μεθανόλη κατ' όγκο (v/v), με σκοπό να προσδιοριστεί και να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη και η ακριβής μάζα (exact mass) κάθε αναλύτη, στόχου τόσο στη λειτουργία θετικού ιοντισμού (ESI (+)), όσο και στη λειτουργία αρνητικού ιοντισμού (ESI

(-)). Η ακριβής μάζα του κάθε αναλύτη-στόχου δεν πρέπει να έχει διαφορά μεγαλύτερη από $\pm 1,0$ amu από τη θεωρητική τιμή της μάζας του.

Η αξιολόγηση του εν λόγω διαλύματος έδειξε ότι όλοι οι αναλύτες μπορούν να ανιχνευθούν κατάλληλα, χρησιμοποιώντας το χαρακτηριστικό τους μοριακό ιόν στον αντίστοιχο τρόπο λειτουργίας. Η εξέταση του χρωματογραφήματος που αποκτήθηκε για το διάλυμα SST-1 επιβεβαιώνει ότι οι κορυφές που αποδίδονται σε όλους τους αναλύτες πληρούν, επίσης, το κριτήριο του λόγου σήματος προς θόρυβο (S/N), καθώς τόσο για τη λειτουργία θετικού, όσο και για τη λειτουργία αρνητικού ιοντισμού ο λόγος S/N είναι μεγαλύτερος του 10. Στον Πίνακα 6.1, παρουσιάζεται η ακριβής μάζα των αναλυτών, καθώς επίσης και η μορφή τους (dominant characteristic ions) και ο λόγος S/N, ύστερα από την ανάλυση του πρότυπου διαλύματος πλαστικοποιητών συγκέντρωσης 12,5 ppm.

Πίνακας 6.1: Ανίχνευση αναλυτών (πλαστικοποιητών) με βάση το λόγο m/z

Λειτουργία ιοντισμού	Αναλύτης	Μορφή	Ακριβής μάζα m/z (amu)	S/N
ESI(+)	Ph. Eur. Plastic Additive 08	[M+NH ₄] ⁺	812,9	67
	Ph. Eur. Plastic Additive 09	[M+NH ₄] ⁺	1195,1	82
	Ph. Eur. Plastic Additive 11	[M+NH ₄] ⁺	548,8	12
	Ph. Eur. Plastic Additive 12	[M+H] ⁺	647,8	95
	Ph. Eur. Plastic Additive 13	[M+NH ₄] ⁺	801,9	54
	Ph. Eur. Plastic Additive 21	[M+H] ⁺	338,5	250
ESI(-)	Ph. Eur. Plastic Additive 08	[M-H] ⁻	793,4	54
	Ph. Eur. Plastic Additive 10	[M-H] ⁻	773,6	11
	Ph. Eur. Plastic Additive 11	[M-H] ⁻	529,5	11
	Ph. Eur. Plastic Additive 19	[M-H] ⁻	283,2	14

ii) Υπολογισμός %RSD μεταξύ των ενέσεων του διαλύματος SST-2 (Έλεγχος επαναληψιμότητας)

Ο έλεγχος της καταλληλότητας του συστήματος περιλάμβανε και την παρασκευή ενός διαλύματος (SST-2) (§ 5.3.2.3) σύμφωνα με την πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε για την ανάλυση του τελικού προϊόντος, με τη διαφορά ότι αντί για τελικό προϊόν, χρησιμοποιήθηκε νερό HPLC. Το διάλυμα αυτό αναλύθηκε πέντε συνεχόμενες φορές και στη συνέχεια υπολογίστηκε η σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) για το σήμα του εσωτερικού προτύπου στις πέντε συνεχόμενες ενέσεις του ίδιου διαλύματος, σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

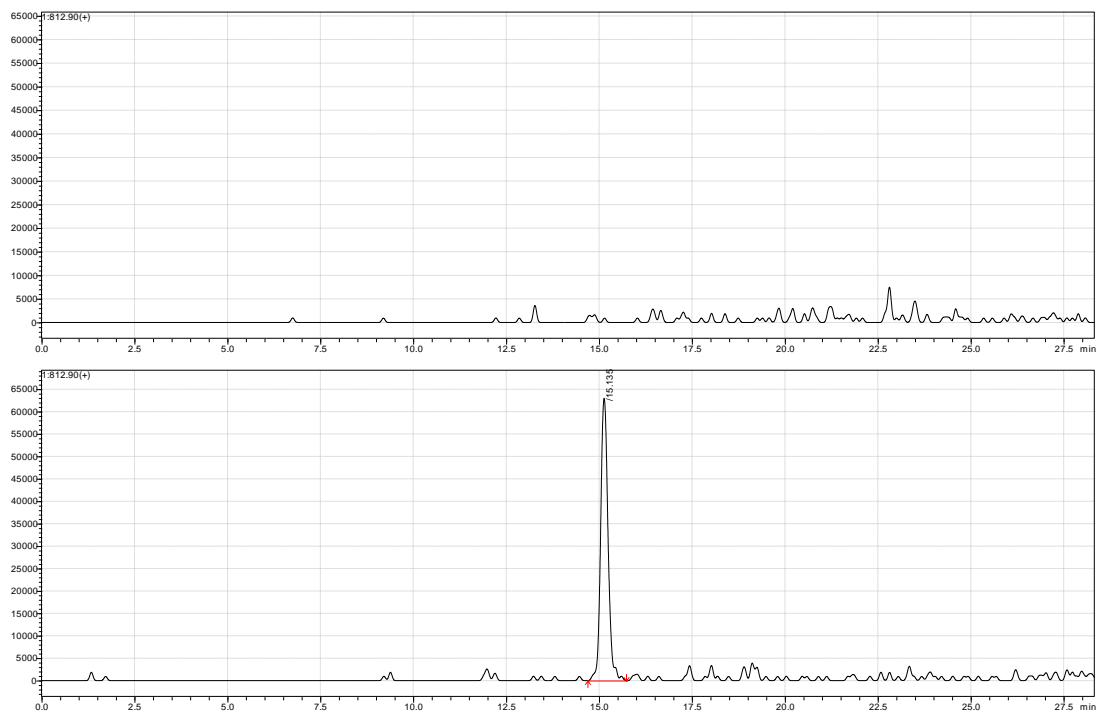
$$\% RSD = 100 \times \frac{\text{STANDARD DEVIATION of the area of IS}}{\text{AVERAGE of the area of IS}} \quad (6.1)$$

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το σύστημα θεωρείται κατάλληλο για τη διεξαγωγή της ανάλυσης. Είναι δηλαδή σταθερό το σήμα του εσωτερικού προτύπου στις πέντε συνεχόμενες ενέσεις, καθώς η τιμή του %RSD που υπολογίστηκε όσον αφορά στο ESI (+) είναι ίση με 14,5 και στο ESI (-) είναι ίση με 9,3. Επομένως και στις δύο περιπτώσεις η τιμή του %RSD είναι μικρότερη από την τιμή 20, που καθορίστηκε ως προδιαγραφή.

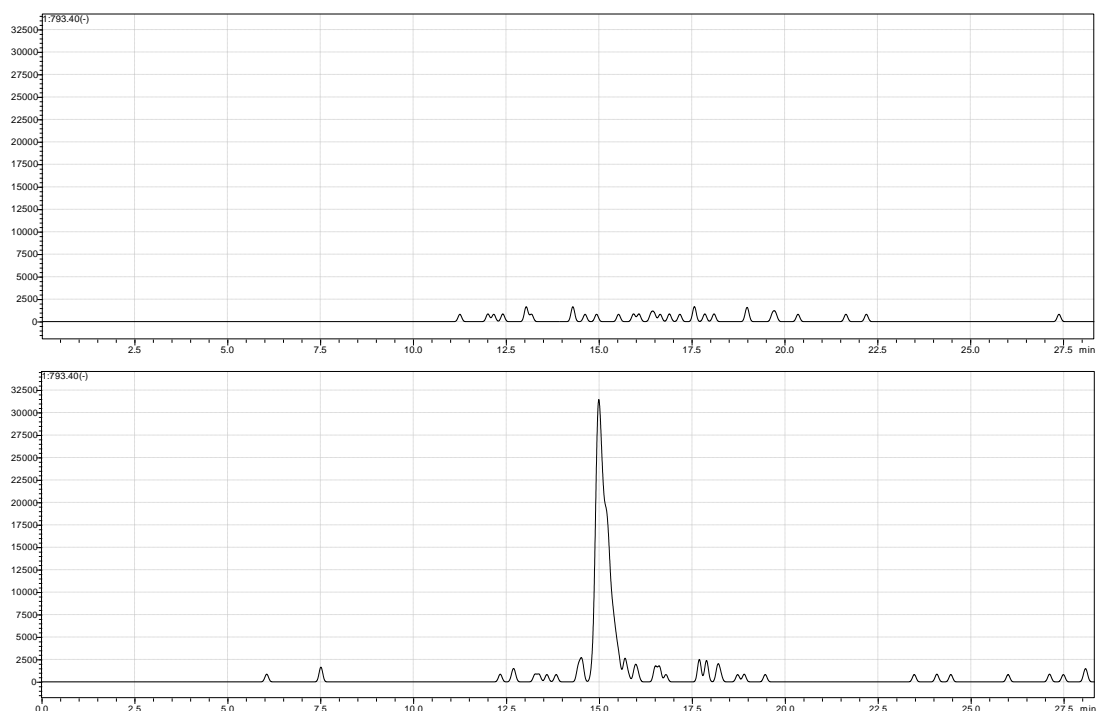
6.3 Έλεγχος Ειδικότητας (Specificity)

Για τον έλεγχο της ειδικότητας της μεθόδου παρασκευάστηκαν, αναλύθηκαν και συγκρίθηκαν δύο διαλύματα σύμφωνα με τη γενική πειραματική πορεία. Η διαφορά μεταξύ των δύο διαλυμάτων είναι ότι στο ένα διάλυμα είχε γίνει εμβολιασμός με το διάλυμα του εσωτερικού προτύπου, ενώ στο δεύτερο διάλυμα δεν είχε γίνει εμβολιασμός. Η αξιολόγηση των χρωματογραφημάτων του εμβολιασμένου και του μη εμβολιασμένου διαλύματος του προϊόντος, τα οποία αναλύθηκαν σε ESI (+) και ESI (-) τρόπο λειτουργίας έδειξε ότι το εσωτερικό πρότυπο (Ph. Eur. Plastic Additive 08) δεν περιέχεται στο διάλυμα

προϊόντος, καθώς δεν εμφανιζόταν η κορυφή του εσωτερικού προτύπου στο μη εμβολιασμένο διάλυμα. Στις παρακάτω εικόνες (Εικόνα 6.1 και 6.2) παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα του μη εμβολιασμένου και του εμβολιασμένου διαλύματος, τόσο στη λειτουργία θετικού, όσο και στη λειτουργία αρνητικού ιοντισμού.



Εικόνα 6.1: Χρωματογραφήματα ιόντος εσωτερικού προτύπου για το μη εμβολιασμένο διάλυμα (πάνω) και το εμβολιασμένο διάλυμα (κάτω), σε λειτουργία θετικού ιοντισμού (ESI(+))



Εικόνα 6.2: Χρωματογραφήματα ιόντος εσωτερικού προτύπου για το μη εμβολιασμένο διάλυμα (πάνω) και το εμβολιασμένο διάλυμα (κάτω), σε λειτουργία αρνητικού ιοντισμού (ESI(-))

Ο διαχωρισμός των ενώσεων των αναλυτών στόχων επιτρέπεται, λόγω του διαφορετικού λόγου m/z και του διαφορετικού χρόνου ανάσχεσης

6.4 Έλεγχος Γραμμικότητας (Linearity)

Κριτήριο για την αξιολόγηση της γραμμικότητας της μεθόδου αποτελεί ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2), ο οποίος σε όλες τις περιπτώσεις θα πρέπει να είναι μεγαλύτερος ή ίσος της τιμής 0,98. Ο έλεγχος της γραμμικότητας της μεθόδου εξετάστηκε σε δύο σειρές διαλυμάτων.

Αρχικά ελέγχθηκε σε καθαρά διαλύματα (STD-A-STD-E) (§ 5.3.2.3), δηλαδή σε διαλύματα των αναλυτών στόχων σε πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις με διαλύτη την κινητή φάση Β, η σύσταση της οποίας είναι 44% ακετονιτρίλιο και 56% μεθανόλη. Τα δεδομένα που αποκτήθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6.2).

Πίνακας 6.2: Δεδομένα από τον έλεγχο γραμμικότητας σε καθαρά διαλύματα

Λειτουργία ιοντισμού	Αναλύτης	Κλίση (Slope)	Σημείο τομής του άξονα Y (Intercept)	Συντελεστής προσδιορισμού (Coefficient of determination, R ²)
ESI(+)	Ph. Eur. Plastic Additive 09	3,32 (±0,23)	0,45 (±0,39)	0,98
	Ph. Eur. Plastic Additive 11	33,1 (±1,8)	5,8 (±3,1)	0,98
	Ph. Eur. Plastic Additive 12	9,01 (±0,60)	1,1 (±1,1)	0,98
	Ph. Eur. Plastic Additive 13	5,64 (±0,13)	0,07 (±0,25)	0,998
	Ph. Eur. Plastic Additive 21	55,1 (±4,2)	15,6 (±7,2)	0,98
ESI(-)	Ph. Eur. Plastic Additive 10	1,199 (±0,041)	0,019 (±0,077)	0,997
	Ph. Eur. Plastic Additive 11	14,56 (±0,29)	0,43 (±0,50)	0,998
	Ph. Eur. Plastic Additive 19	39,2 (±2,3)	14,0 (±4,0)	0,98

Ακολούθως, έγινε έλεγχος γραμμικότητας σε διαλύματα προτύπων με μήτρα του τελικού προϊόντος (Matrix Matched STDs, MM-STD-A -MM-STD-C). Τα δεδομένα που αποκτήθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6.3).

Πίνακας 6.3: Δεδομένα από τον έλεγχο γραμμικότητας σε διαλύματα που προσομοιάζουν τη μήτρα του τελικού προϊόντος

Λειτουργία ιοντισμού	Αναλύτης	Κλίση (Slope)	Σημείο τομής του άξονα Y (Intercept)	Συντελεστής προσδιορισμού (Coefficient of determination, R ²)
ESI(+)	Ph. Eur. Plastic Additive 09	6,09 (±0,50)	3,33 (±0,91)	0,98
	Ph. Eur. Plastic Additive 11	54,1 (±4,3)	11,3 (±7,9)	0,98
	Ph. Eur. Plastic Additive 12	34,9 (±2,0)	71,8 (±3,6)	0,994
	Ph. Eur. Plastic Additive 13	11,69 (±0,73)	4,8 (±1,3)	0,992
	Ph. Eur. Plastic Additive 21	236 (±15)	669 (±27)	0,992
ESI(-)	Ph. Eur. Plastic Additive 10	1,67 (±0,22)	-0,06 (±0,45)	0,98
	Ph. Eur. Plastic Additive 11	14,1 (±1,1)	1,3 (±2,0)	0,98
	Ph. Eur. Plastic Additive 19	164 (±14)	135 (±26)	0,98

Με βάση τα δεδομένα που προέκυψαν και έπειτα από την αξιολόγηση των καμπυλών βαθμονόμησης του κάθε αναλύτη στις δύο σειρές διαλυμάτων που ελέγχθηκαν, συμπεραίνεται ότι η γραμμικότητα σε ένα εύρος συγκεντρώσεων από 0,06 ppm έως 3,5 ppm είναι ικανοποιητική και για τους δύο τύπους διαλυμάτων, καθώς ικανοποιείται το κριτήριο για το συντελεστή προσδιορισμού (R²), ο οποίος σε όλες τις περιπτώσεις είναι μεγαλύτερος της

τιμής 0,98. Είναι φανερό ότι ο συντελεστής προσδιορισμού είναι καλύτερος για τις καμπύλες προτύπων με μήτρα προσομοιάζουσα το τελικό προϊόν. Εφόσον οι καμπύλες προτύπων με μήτρα που προσομοιάζει το τελικό προϊόν δεν περνούν από την αρχή των αξόνων, για τους υπολογισμούς επιβάλλεται να χρησιμοποιείται πάντα καμπύλη πολλαπλών σημείων.

6.5 Έλεγχος επίδρασης φαινομένου της μήτρας (Matrix Effect)

Δεδομένου ότι η μήτρα του δείγματος είναι πολύπλοκη και η ανίχνευση των αναλυτών γίνεται σε εύρη συγκεντρώσεων ppm, κρίθηκε απαραίτητη η αξιολόγηση της επίδρασης της μήτρας στην ανάκτηση των αναλυτών στόχων. Για τον έλεγχο λοιπόν των φαινομένων μήτρας, υπολογίστηκε ο συντελεστής μήτρας (Matrix Factor, MF), καθώς και η επίδραση μήτρας (Matrix Effect, ME), σύμφωνα με τους τύπους που παρουσιάζονται παρακάτω.

$$MF = \frac{\text{Slope of calibration curve of MM-STDs}}{\text{Slope of calibration curve of STDs}} \quad (6.2)$$

$$ME = (MF - 1) \times 100 \quad (6.3)$$

Για την επεξεργασία των υπολογισμών χρησιμοποιήθηκαν οι κλίσεις των καμπυλών βαθμονόμησης όλων των αναλυτών, σε θετικό και αρνητικό ιοντισμό, για τις δύο σειρές διαλυμάτων Έχοντας λοιπόν όλα τα απαραίτητα δεδομένα, εφαρμόστηκαν οι εξισώσεις 6.2 και 6.3. Τα αποτελέσματα φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 6.4.

Οι τιμές που λαμβάνουν οι παράγοντες «Matrix Factor» και «Matrix Effect» είναι:

- $MF \geq 1$ (Απόσβεση σήματος / Ion suppression) ή $ME \leq 0$ αντίστοιχα.
- $MF \leq 1$ (Ενίσχυση σήματος / Ion enhancement) ή $ME \geq 0$ αντίστοιχα.

Πίνακας 6.4: Επίδραση μήτρας στον προσδιορισμό ουσιών μετανάστευσης

Λειτουργία ιοντισμού	Αναλύτης	% Matrix Effect
ESI(+)	Ph. Eur. Plastic Additive 09	83
	Ph. Eur. Plastic Additive 11	63
	Ph. Eur. Plastic Additive 12	287
	Ph. Eur. Plastic Additive 13	107
	Ph. Eur. Plastic Additive 21	328
ESI(-)	Ph. Eur. Plastic Additive 10	39
	Ph. Eur. Plastic Additive 11	-3
	Ph. Eur. Plastic Additive 19	318

Παρατηρείται ότι τόσο στον θετικό όσο και στον αρνητικό ιοντισμό οι ενώσεις της μήτρας του δείγματος οδηγούν στην ενίσχυση του αναλυτικού σήματος των αναλυτών-στόχων (ME>0). Εξάιρεση αποτελεί το Ph. Eur. Plastic Additive 11 για το οποίο παρατηρείται μια ελαφριά απόσβεση του σήματος.

Για το λόγο αυτό η ποσοτικοποίηση των υπόλοιπων παρασκευασμένων διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των καμπυλών βαθμονόμησης των Matrix Matched STDs (MM-STD-A - MM-STD-C).

Η ποσοτικοποίηση κάθε αναλύτη-στόχου πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της αντίστοιχης εξίσωσης παλινδρόμησης ($y = ax + b$) που παρουσιάζεται στον πίνακα 6.3. Η συγκέντρωση που κάθε αναλύτη-στόχου υπολογίζεται σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο (6.4):

$$\text{Estimated concentration } (\mu\text{g}/\text{mL test sol.}) = \frac{\text{Peak Area Ratio} - \text{intercept}}{\text{Slope}} \quad (6.4)$$

6.6 Έλεγχος Ακρίβειας (Accuracy)

Κριτήρια για την αξιολόγηση της ακρίβειας της μεθόδου αποτελούν η % ανάκτηση του κάθε αναλύτη, η οποία θα πρέπει να είναι εντός του εύρους 80-120% και η % σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) τριών διαλυμάτων ίδιας συγκέντρωσης, η οποία δεν πρέπει να υπερβαίνει το 20%.

Για την εξέταση της ακρίβειας της μεθόδου παρασκευάστηκαν εμβολιασμένα διαλύματα (Spiked solutions), τα οποία περιείχαν τους αναλύτες-στόχους σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις. Για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης πραγματοποιήθηκαν τρεις ανεξάρτητες παρασκευές. Η παρασκευή των διαλυμάτων αυτών περιγράφεται λεπτομερώς στο κεφάλαιο 5 (§ 5.3.2.3). Έπειτα από την ανάλυση των παραπάνω διαλυμάτων σε τρόπο λειτουργίας ESI (+) και ESI (-) υπολογίστηκαν η συγκέντρωση του κάθε αναλύτη (Estimated concentration) και η % ανάκτηση (%Recovery) για κάθε αναλύτη στόχο σύμφωνα με τους τύπους 6.4 και 6.5 που περιγράφονται παρακάτω. Επίσης, υπολογίστηκε και η % σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) μεταξύ των τριών διαλυμάτων ίδιας συγκέντρωσης (βλ. τύπο 6.1). Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν παρατίθενται στους Πίνακες 6.5 και 6.6.

$$\text{Estimated concentration } (\mu\text{g/mL test sol.}) = \frac{\text{Peak Area Ratio} - \text{intercept}}{\text{Slope}} \quad (6.4)$$

$$\% \text{ Recovery} = 100 \times \frac{\text{Estimated concentration}}{\text{Fortification level}} \quad (6.5)$$

Πίνακας 6.5: Δεδομένα από τον έλεγχο ακρίβειας της μεθόδου, σε λειτουργία θετικού ιοντισμού

Ph. Eur. Plastic Additive 09			
Συγκέντρωση αναλύτη (μg/mL)	% Ανάκτηση	Μέση % Ανάκτηση (n=3)	%RSD (n=3)
0,1	108,3 99,4 108,8	105,5	5,0
1,0	93,0 100,4 98,9	97,4	4,0
3,5	100,1 105,9 111,1	105,7	5,2
Ph. Eur. Plastic Additive 11			
Συγκέντρωση αναλύτη (μg/mL)	% Ανάκτηση	Μέση % Ανάκτηση (n=3)	%RSD (n=3)
0,1	95,3 91,4 94,1	93,6	2,1
1,0	109,5 101,4 109,6	106,8	4,4
3,5	96,8 106,0 97,1	100,0	5,2
Ph. Eur. Plastic Additive 12			
Συγκέντρωση αναλύτη (μg/mL)	% Ανάκτηση	Μέση % Ανάκτηση (n=3)	%RSD (n=3)
0,1	102,0 105,4 98,2	101,9	3,5
1,0	102,2 95,6 92,9	96,9	4,9
3,5	105,6 106,4 103,7	105,2	1,3

Ph. Eur. Plastic Additive 13			
Συγκέντρωση αναλύτη (μg/mL)	% Ανάκτηση	Μέση % Ανάκτηση (n=3)	%RSD (n=3)
0,1	100,7	97,5	5,7
	91,1		
	100,7		
1,0	104,9	104,2	2,4
	106,3		
	101,5		
3,5	99,7	99,5	1,8
	101,2		
	97,7		
Ph. Eur. Plastic Additive 21			
Συγκέντρωση αναλύτη (μg/mL)	% Ανάκτηση	Μέση % Ανάκτηση (n=3)	%RSD (n=3)
0,1	110,5	105,0	4,8
	103,8		
	100,7		
1,0	104,8	102,1	3,2
	98,5		
	103,0		
3,5	93,1	98,3	5,2
	98,3		
	103,4		

Πίνακας 6.6: Δεδομένα από τον έλεγχο ακρίβειας της μεθόδου, σε λειτουργία αρνητικού ιοντισμού

Ph. Eur. Plastic Additive 10			
Συγκέντρωση αναλύτη (μg/mL)	% Ανάκτηση	Μέση % Ανάκτηση (n=3)	%RSD (n=3)
0,1	115,8	113,8	1,6
	112,3		
	113,4		
1,0	103,6	102,0	2,2
	103,0		
	99,4		
3,5	99,4	96,9	2,3
	95,1		
	96,3		
Ph. Eur. Plastic Additive 11			
Συγκέντρωση αναλύτη (μg/mL)	% Ανάκτηση	Μέση % Ανάκτηση (n=3)	%RSD (n=3)
0,1	109,3	107,5	1,5
	106,2		
	107,0		
1,0	93,1	91,5	2,6
	88,8		
	92,6		
3,5	100,0	102,7	3,0
	102,0		
	106,1		
Ph. Eur. Plastic Additive 19			
Συγκέντρωση αναλύτη (μg/mL)	% Ανάκτηση	Μέση % Ανάκτηση (n=3)	%RSD (n=3)
0,1	107,9	106,9	2,5
	108,9		
	103,8		
1,0	96,0	94,5	1,8
	94,7		
	92,7		

3,5	98,5	96,8	1,7
	96,6		
	95,3		

Εφόσον η % ανάκτηση του κάθε αναλύτη, για καθένα από τα τρία επίπεδα στα οποία ελέγχθηκε η μέθοδος ως προς τη ακρίβειά της, είναι εντός του εύρους 80-120% και η % σχετική απόκλιση για κάθε επίπεδο είναι μικρότερη του 20%, η μέθοδος θεωρείται ακριβής.

6.7 Έλεγχος Ορίου Ποσοτικοποίησης (LOQ)

Ως όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου για έναν αναλύτη ορίζεται η χαμηλότερη συγκέντρωση αυτού που μπορεί να προσδιοριστεί με αποδεκτή ακρίβεια. [68] Εφόσον, προηγουμένως, αποδείχθηκε ότι η μέθοδος είναι ακριβής για όλους τους αναλύτες-στόχους στο χαμηλότερο σημείο της καμπύλης, δηλαδή τα 0,1 µg/ mL, ως όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου ορίζεται η συγκέντρωση των 0,1 µg/ mL. Η συγκέντρωση των 0,1 µg/ mL είναι μικρότερη από τη συγκέντρωση του AET (0,3126 µg/mL), επομένως έχει αποδειχθεί ότι η μέθοδος είναι αρκετά ευαίσθητη για το LOQ και έχει επαρκή ανιχνευσιμότητα.

6.8 Έλεγχος Πιστότητας (Precision)

Όσον αφορά στον έλεγχο της πιστότητας της μεθόδου, εξετάστηκαν δύο παράμετροι, η επαναληψιμότητα και η ενδιάμεση πιστότητα της μεθόδου.

6.8.1 Έλεγχος Επαναληψιμότητας (Repeatability)

Κριτήρια για την αξιολόγηση της επαναληψιμότητας της μεθόδου αποτελούν η % ανάκτηση του κάθε αναλύτη, η οποία θα πρέπει να είναι εντός του εύρους

80-120% και η % σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) μεταξύ των έξι διαλυμάτων, η οποία δεν πρέπει να υπερβαίνει το 20%.

Για την έλεγχο της επαναληψιμότητας της μεθόδου παρασκευάστηκαν έξι εμβολιασμένα διαλύματα (spiked solutions), τα οποία περιείχαν τους αναλύτες στόχους σε συγκέντρωση 1,0 ppm. Η παρασκευή των διαλυμάτων αυτών περιγράφεται λεπτομερώς στο κεφάλαιο 5. Έπειτα από την ανάλυση των παραπάνω διαλυμάτων σε ESI(+) και ESI(-) τρόπο λειτουργίας υπολογίστηκαν η συγκέντρωση του κάθε αναλύτη και η % ανάκτηση για κάθε αναλύτη-στόχο σύμφωνα με τους τύπους 6.3 και 6.4 που παρουσιάζονται παραπάνω. Υπολογίστηκε, επίσης, και η % σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) μεταξύ των έξι δειγμάτων. Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν παρατίθενται στον Πίνακα 6.7.

Πίνακας 6.7: Δεδομένα από τον έλεγχο επαναληψιμότητας της μεθόδου

Λειτουργία ιοντισμού	Αναλύτης	% Ανάκτηση	% RSD (n=6)
ESI(+)	Ph. Eur. Plastic Additive 09	95,4	4,3
	Ph. Eur. Plastic Additive 11	107,6	3,1
	Ph. Eur. Plastic Additive 12	99,8	5,6
	Ph. Eur. Plastic Additive 13	101,8	3,3
	Ph. Eur. Plastic Additive 21	100,4	3,7
ESI(-)	Ph. Eur. Plastic Additive 10	98,5	4,7
	Ph. Eur. Plastic Additive 11	96,7	6,4
	Ph. Eur. Plastic Additive 19	95,1	3,9

Εφόσον η % ανάκτηση του κάθε αναλύτη, στα εμβολιασμένα διαλύματα, τα οποία παρασκευάστηκαν με σκοπό τον έλεγχο της επαναληψιμότητας της εν λόγω μελέτης, είναι εντός του εύρους 80-120%, και η % σχετική απόκλιση

είναι μικρότερη του 20%, τόσο στον θετικό, όσο και στον αρνητικό ιοντισμό, η μέθοδος θεωρείται επαναλήψιμη.

6.8.2 Έλεγχος Ενδιάμεσης πιστότητας (Intermediate Precision)

Κριτήρια για την αξιολόγηση της ενδιάμεσης πιστότητας της μεθόδου αποτελούν η μέση % ανάκτηση του κάθε αναλύτη, η οποία θα πρέπει να είναι εντός του εύρους 80-120%, η επαναληψιμότητα του εργαστηρίου (overall repeatability, $\%RSD_r$) και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα (intermediate precision, $\%RSD_R$). Οι δύο τελευταίες δεν πρέπει να υπερβαίνουν το 25%.

Η αξιολόγηση της μεθόδου ως προς την ενδιάμεση πιστότητά της πραγματοποιήθηκε με την παρασκευή έξι εμβολιασμένων διαλυμάτων (spiked solutions), τα οποία περιείχαν τους αναλύτες στόχους σε συγκέντρωση 1,0 ppm. Τρία από αυτά τα διαλύματα παρασκευάστηκαν από τον ίδιο αναλύτη αλλά σε διαφορετική ημέρα, ενώ τα υπόλοιπα τρία διαλύματα παρασκευάστηκαν τη ίδια ημέρα αλλά από διαφορετικό αναλύτη. Η παρασκευή των διαλυμάτων αυτών περιγράφεται λεπτομερώς στο κεφάλαιο 5. Έπειτα από την ανάλυση των παραπάνω διαλυμάτων σε ESI(+) και ESI(-) τρόπο λειτουργίας υπολογίστηκαν η συγκέντρωση του κάθε αναλύτη και η % ανάκτηση για κάθε αναλύτη στόχο σύμφωνα με τους τύπους 6.3 και 6.4 που περιεγράφηκαν παραπάνω. Εκτός από τα έξι διαλύματα που μόλις περιεγράφηκαν, για τον έλεγχο της ενδιάμεσης πιστότητας χρησιμοποιήθηκαν και τα αποτελέσματα από τον έλεγχο επαναληψιμότητας της μεθόδου. Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν από τα δώδεκα αυτά διαλύματα συγκρίθηκαν μεταξύ τους και με τη βοήθεια της ανάλυσης της διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (ANOVA) υπολογίστηκε η επαναληψιμότητα του εργαστηρίου (overall repeatability, $\%RSD_r$) και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα (intermediate precision, $\%RSD_R$). Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.8.

Πίνακας 6.8: Δεδομένα από τον έλεγχο ενδιάμεσης πιστότητας της μεθόδου

Λειτουργία ιοντισμού	Αναλύτης	Μέση % Ανάκτηση (n=9)	% RSD _r (n=9)	% RSD _R (n=9)
ESI(+)	Ph. Eur. Plastic Additive 09	101,1	3,9	8,1
	Ph. Eur. Plastic Additive 11	107,5	2,9	5,4
	Ph. Eur. Plastic Additive 12	108,0	4,2	10,3
	Ph. Eur. Plastic Additive 13	104,5	4,5	5,8
	Ph. Eur. Plastic Additive 21	103,7	3,5	5,5
ESI(-)	Ph. Eur. Plastic Additive 10	98,0	4,3	5,0
	Ph. Eur. Plastic Additive 11	95,9	5,5	7,1
	Ph. Eur. Plastic Additive 19	96,2	3,6	4,1

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, κριτήρια για την αξιολόγηση της ενδιάμεσης πιστότητας της μεθόδου είναι οι τιμές της % RSD_r και της % RSD_R. Οι τιμές και για της δύο παραμέτρους δεν υπερβαίνουν το 25%, τιμή όπου έχει οριστεί ως προδιαγραφή, επομένως η μέθοδος θεωρείται ότι έχει αποδεκτή πιστότητα.

6.9 Έλεγχος Σταθερότητας (Stability)

Προκειμένου να εξεταστεί η σταθερότητα των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την επικύρωση της μεθόδου και κατά συνέπεια σε

συνθήκες ρουτίνας αναλύθηκαν δύο διαλύματα δειγμάτων τα οποία είχαν παρασκευαστεί με τον ίδιο τρόπο (περιγράφεται στο κεφάλαιο 5) και περιείχαν τους αναλύτες-στόχους σε συγκέντρωση 1,0 ppm. Το ένα από τα δύο αυτά διαλύματα παρασκευάστηκε και αναλύθηκε την ίδια ημέρα, ενώ το άλλο είχε παρασκευαστεί και αποθηκευτεί στο χώρο του δειγματολήπτη επτά ημέρες πριν την ανάλυσή του. Μετά από την ανάλυση και των δύο αυτών διαλυμάτων αξιολογήθηκε η % διαφορά μεταξύ τους, η οποία υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο 6.6 που περιγράφεται παρακάτω. Η διαφορά αυτή δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10%. Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.9.

$$\% \text{ Διαφορά} = 100 \times \frac{| \text{Peak Area Ratio of old solution} - \text{Peak Area Ratio of fresh solution} |}{\text{Peak Area Ratio of old solution}}$$

(6.6)

Πίνακας 6.9: Δεδομένα από τον έλεγχο σταθερότητας της μεθόδου

Λειτουργία ιονισμού	Αναλύτης	% Διαφορά (n=2)
ESI(+)	Ph. Eur. Plastic Additive 09	6,0
	Ph. Eur. Plastic Additive 11	4,0
	Ph. Eur. Plastic Additive 12	9,6
	Ph. Eur. Plastic Additive 13	2,7
	Ph. Eur. Plastic Additive 21	5,9
ESI(-)	Ph. Eur. Plastic Additive 10	3,7
	Ph. Eur. Plastic Additive 11	1,5
	Ph. Eur. Plastic Additive 19	2,3

Η μελέτη σταθερότητας έδειξε ότι τα διαλύματα παραμένουν σταθερά για διάστημα επτά ημερών από την παρασκευή τους αν αποθηκεύονται στις συνθήκες του αυτόματου δειγματολήπτη, μιας και η % διαφορά που

υπολογίστηκε για καθένα από τους αναλύτες στόχους έχει τιμή μικρότερη/ίση από 10%.

6.10 Έλεγχος Ανθεκτικότητας (Robustness)

Η ανθεκτικότητα της μεθόδου απαιτεί πειραματικό σχεδιασμό, με σκοπό τη μελέτη των μεταβολών των πειραματικών παραμέτρων και τον εντοπισμό αυτών που επηρεάζουν τη μέθοδο έτσι, ώστε να τεθούν αυστηρές ανοχές και μέτρα ελέγχου τους. Πρόκειται λοιπόν, για προσχεδιασμένες σκοπούμενες μικρομεταβολές των πειραματικών παραμέτρων. Μελετήθηκε, λοιπόν, η ανθεκτικότητα της μεθόδου ως προς τις παραμέτρους του οργάνου LC-ESI-MS/MS.

Η μελέτη ανθεκτικότητας έγινε σε εμβολιασμένα με τους αναλύτες στόχους (πλαστικοποιητές) διαλύματα συγκέντρωσης ίσης με 1,0 µg/mL για κάθε αναλύτη. Οι αρχικές παράμετροι της μεθόδου που επιλέχτηκαν στο σύστημα της υδροχρωματογραφίας (κινητή φάση, στήλη), καθώς και στο σύστημα φασματομετρίας μαζών (MS mode, acquisition time), αναφέρθηκαν αναλυτικά στο Εδάφιο 5.3.3. Για τη μελέτη ανθεκτικότητας, τόσο στο θετικό ιοντισμό ESI(+), όσο και στον αρνητικό ιοντισμό ESI(-), πραγματοποιήθηκαν τέσσερα (4) διαφορετικά πειράματα, τα οποία παρουσιάζονται ακολούθως.

Ο έλεγχος ανθεκτικότητας αξιολόγησε την επίδραση παραγόντων οι οποίοι είναι γνωστό ότι επηρεάζουν την απόδοση στην υδροχρωματογραφία, ενώ παράλληλα είναι πιθανή και η επίδραση του σήματος στη φασματομετρία μαζών. Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες αλλαγές:

1. Μια μεταβολή ($\pm 1,5\%$ στην κινητή φάση B) στην αρχική και την τελική σύνθεση της κινητής φάσης, προκειμένου να αξιολογηθούν διαφορετικές ρυθμίσεις συμπίεστικότητας για τις μονάδες αντλίας της HPLC. Η σύσταση της κινητής φάσης επηρεάζει την αγωγιμότητα και τη διαθεσιμότητα των

ιόντων, επηρεάζοντας έτσι, πιθανώς και το σήμα στη φασματομετρία μαζών.

2. Μια μεταβολή της ροής στη στήλη ($\pm 0,030$ mL / min ίση με 15% της κανονικής τιμής), η οποία υποδεικνύει πιθανή ανακρίβεια στην προσαρμογή του ρυθμού ροής σε διαφορετικά συστήματα HPLC. Αυτό το χαρακτηριστικό επηρεάζει την ταχύτητα αναπλήρωσης της επιφάνειας όσον αναφορά στην πηγή ιονισμού ESI. Αυτό αποτελεί ένα κρίσιμο χαρακτηριστικό για το σήμα στη φασματομετρία μαζών.

Κριτήρια για την αξιολογήση της ανθεκτικότητας της μεθόδου στις προκαλούμενες μεταβολές αποτελούν:

- α) Η αλλαγή του χρόνου κατακράτησης για κάθε αναλύτη, η οποία δεν πρέπει να υπερβαίνει το αποδεκτό όριο του $\pm 15\%$.
- β) Η % RSD του σήματος του κάθε αναλύτη-στόχου μεταξύ των δύο ενέσεων υπό κανονικές συνθήκες και των δύο ενέσεων ανά τροποποίηση (+/-), ανά παράμετρο θα πρέπει να είναι μικρότερη ή ίση του 20% σε όλες τις περιπτώσεις.

Και οι δύο αυτές αλλαγές οδήγησαν σε αλλαγή του χρόνου κατακράτησης για κάθε αναλύτη. Η αλλαγή, ωστόσο, ήταν εντός του αποδεκτού ορίου $\pm 15\%$ για το χρόνο ανάσχεσης (R_t) της προσδιοριζόμενης ουσίας.

Όσον αφορά στις μεθόδους που περιλαμβάνουν αλλαγές στη σύσταση της κινητής φάσης, διεξήχθησαν διαδοχικές ενέσεις του εμβολιασμένου διαλύματος, ενώ προηγουμένως είχαν προηγηθεί ενέσεις διαλύτη (κινητή φάση B), δεδομένου ότι το σύστημα έπρεπε να προσαρμοστεί (conditioning/equilibration) αναλόγως πριν την ένεση του εμβολιασμένου διαλύματος.

Η % σχετική τυπική απόκλιση(% RSD) για το σήμα (Response) των αναλυτών-στόχων ανάμεσα στις δύο ενέσεις υπό κανονικές συνθήκες και στις δύο ενέσεις ανά τροποποίηση (+/-) ανά παράμετρο (σύνολο έξι ενέσεων) ήταν

σε όλες τις περιπτώσεις πολύ κοντά στην αναμενόμενη μεταβλητότητα του συστήματος (% RSD \leq 17,5).

Από τα παραπάνω δεδομένα, διαπιστώνεται ότι η μέθοδος που επιλέχθηκε στο σύστημα LC-MS, είναι ανθεκτική, καθώς παράγει ακριβή και αξιόπιστα δεδομένα.

Η μέθοδος λοιπόν είναι ανθεκτική για τις μεταβολές των παραμέτρων:

- \pm 1,5 % μεταβολή της κινητής φάσης B στην αρχική και την τελική σύσταση της κινητής φάσης.
- \pm 0,030 mL / min (\pm 15%) μεταβολή της ροής στη στήλη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΕΚΧΥΛΙΖΟΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ (REAL SAMPLE)

7.1 Είδη δειγμάτων

Όπως αναφέρθηκε και στο υποκεφάλαιο 5.2, τα εξεταζόμενα δείγματα είναι λυοφιλοποιημένα τελικά προϊόντα βορικοναζόλης, τα οποία παρασκευάστηκαν από τη φαρμακοβιομηχανία. Εκτός από τα λυοφιλοποιημένα τελικά προϊόντα παρελήφθησαν επίσης και τα επιμέρους συστατικά του τελικού προϊόντος, δηλαδή η δραστική ουσία βορικοναζόλη και τα επιμέρους έκδοχα, το καθένα ξεχωριστάέτσι, ώστε να παρασκευαστεί το δείγμα Ελέγχου («Control»), το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της ύπαρξης πιθανών leachable ειδών. Αναλύθηκαν, επομένως, τα ακόλουθα δύο είδη δειγμάτων:

1. Δείγμα Τελικού προϊόντος («Final Product»).

Πρόκειται για λυοφιλοποιημένο τελικό προϊόν, το οποίο έχει ανασυσταθεί με διαλύτη νερό HPLC. Περιέχει τη δραστική ουσία βορικοναζόλης, τα έκδοχα, τα συστατικά της μήτρας του δείγματος αλλά, και πιθανούς πλαστικοποιητές (PAs) που έχουν μεταναστεύσει από την τελική συσκευασία του προϊόντος στο διάλυμα προϊόντος, λόγω πιθανής αλληλεπίδρασης.

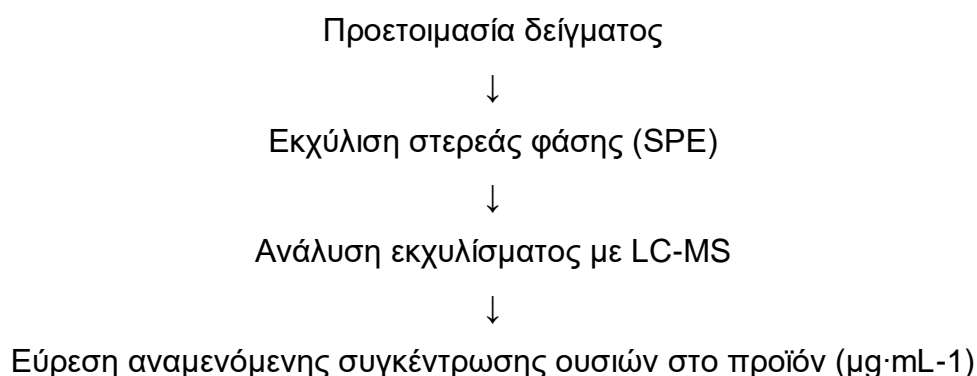
2. Δείγμα Ελέγχου («Control»).

Πρόκειται για διάλυμα τελικού προϊόντος, το οποίο έχει παρασκευαστεί στο εργαστήριο σύμφωνα με τις οδηγίες παρασκευής του τελικού προϊόντος με τη διαφορά ότι δεν έχει έρθει σε επαφή με τον τελικό περιέκτη του προϊόντος. Επομένως, περιέχει τη δραστική ουσία βορικοναζόλης, τα έκδοχα και τα συστατικά της μήτρας του δείγματος.

Ο εργαστηριακός εξοπλισμός, οι πρώτες ύλες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν, περιγράφονται στο Παράρτημα Ι.

7.2 Στάδια προκατεργασίας δείγματος

Τα στάδια προκατεργασίας των δύο δειγμάτων ακολουθούν την ίδια πορεία που αναφέρθηκε στο Εδάφιο 5.3.2.2, που περιλαμβάνει εκχύλιση στερεής φάσης (SPE). Η μέθοδος εφαρμόστηκε με δύο ταυτόχρονα πειράματα ένα για το τελικό προϊόν μετά από ανασύσταση με διαλύτη νερό HPLC (Δείγμα 1) και ένα για το δείγμα Control (Δείγμα 2). Τα στάδια της προκατεργασίας των δύο δειγμάτων παρουσιάζονται στο Σχήμα 7.1.



Σχήμα 7.1: Στάδια προκατεργασίας δειγμάτων "Final Product" και "Control"

7.3 Ανάλυση - Προσδιορισμός "leachables" ουσιών σε άγνωστο δείγμα με LC-MS

Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε με τη μέθοδο που επικυρώθηκε για το σκοπό αυτό. Οι παράμετροι του χρωματογραφικού συστήματος αναφέρθηκαν αναλυτικά στο Εδάφιο 5.3.2.3.

Ομοίως οι παράμετροι του συστήματος της φασματομετρίας μαζών MS, αναφέρθηκαν στο Εδάφιο 5.3.2.3.

7.4 Αποτελέσματα

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των αγνώστων ουσιών, βασίζεται στις ενώσεις αναφοράς (target analytes). Η ποσοτικοποίηση για κάθε άγνωστη κορυφή στα δείγματα, έγινε με τη χρωματογραφική κορυφή του αναλύτη-στόχου ο οποίος βρίσκεται σε κοντινότερο χρόνος ανάσχεσης (R_t) με την άγνωστη ένωση. Εφόσον οι δύο ενώσεις εκλούνται σε στενότερη εγγύτητα αναμένεται να υπόκεινται στην ίδια επίδραση της μήτρας του δείγματος και να μοιράζονται παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης μιας άγνωστης ουσίας που μεταναστεύει από τον περιέκτη του φαρμακευτικού σκευάσματος στο προϊόν, χρησιμοποιήθηκε η Εξίσωση 7.1.

$$\text{Concentration of leachable species in the solution } (\mu\text{g/mL test sol.}) = \frac{\frac{\text{Area unknown}}{\text{Area IS}}}{\frac{\text{Area analyte}}{\text{Area IS}}} \times C_{\text{analyte}} \quad (7.1)$$

Όπου:

Area unknown: Το εμβαδόν της κορυφής της άγνωστης ουσίας

Area IS: Το εμβαδόν της κορυφής του εσωτερικού προτύπου

Area analyte: Το εμβαδόν της κορυφής της πρότυπης ουσίας αναφοράς (target analyte), που χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της άγνωστης ουσίας.

C analyte: Η συγκέντρωση C ($\mu\text{g/mL}$) της ουσίας αναφοράς (target analyte) που χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της άγνωστης ουσίας.

Μετά τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της κάθε άγνωστης ουσίας στο τελικό διάλυμα, η συγκέντρωση αυτή μεταφέρεται στο αρχικό προϊόν (product), δηλαδή σε μονάδες ($\mu\text{g/ product unit}$) με τη χρήση της ακόλουθης εξίσωσης (εξίσωση 7.2):

$$\text{Concentration of leachable species in the solution } (\mu\text{g/mL product unit}) = \text{Concentration of leachable species in the solution } (\mu\text{g/mL test sol.}) \times DF \quad (7.2)$$

Όπου ο Dilution Factor (DF) υπολογίστηκε με τον εξής τύπο (7.3):

$$DF = \frac{1,0 \text{ mL testsolution}}{6,0 \text{ mL elutedsolvent}} \times \frac{6,0 \text{ mL elutedsolvent}}{20,0 \text{ mLreconstitutedsolution}} \times \frac{20,0 \text{ mLreconstitutedsolution}}{2 \text{ productunits}} = 0,5 \quad (7.3)$$

7.4.1 Δοκιμασία καταλληλότητας συστήματος

Η δοκιμασία καταλληλότητας του συστήματος ελέγχθηκε με 2 κριτήρια, όπως και κατά την επικύρωση της μεθόδου που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση των «leachable species» στο τελικό προϊόν (Δείγμα 1).

Όσον αφορά στο πρώτο κριτήριο, το κριτήριο του S/N, ο έλεγχος της καταλληλότητας του συστήματος περιλάμβανε την παρασκευή ενός διαλύματος (SST-1) το οποίο περιείχε όλους τους πλαστικοποιητές σε συγκέντρωση $12,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ (ppm) σε διαλύτη με σύσταση 44% ακετονιτρίλιο και 56% μεθανόλη κατ' όγκο (v/v), με σκοπό να προσδιοριστεί η ύπαρξη κάθε αναλύτη στόχου καθώς επίσης και ο λόγος S/N του καθενός, τόσο στη λειτουργία θετικού ιοντισμού (ESI (+)), όσο και στη λειτουργία αρνητικού ιοντισμού (ESI (-)).

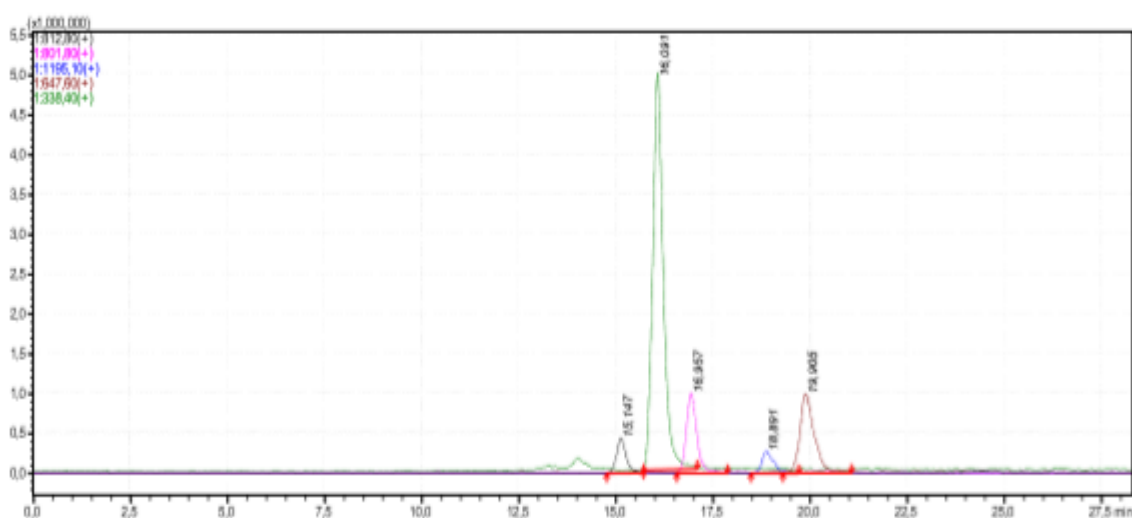
Η αξιολόγηση του εν λόγω διαλύματος έδειξε ότι όλοι οι αναλύτες μπορούν να ανιχνευθούν κατάλληλα, χρησιμοποιώντας το χαρακτηριστικό τους μοριακό ιόν στον αντίστοιχο τρόπο λειτουργίας. Η εξέταση του χρωματογραφήματος που αποκτήθηκε για το διάλυμα SST-1 επιβεβαιώνει ότι οι κορυφές που αποδίδονται σε όλους τους αναλύτες πληρούν το κριτήριο του λόγου του σήματος προς το θόρυβο (S/N), καθώς τόσο για τη λειτουργία θετικού όσο και για τη λειτουργία αρνητικού ιοντισμού ο λόγος S/N είναι μεγαλύτερος του 10. Συγκεκριμένα, για τη λειτουργία ESI (+) ο λόγος S/N ξεπερνάει την τιμή 112,2

για όλους τους αναλύτες στόχους, ενώ αντίστοιχα για τη λειτουργία ESI (-) την τιμή 12,6.

Όσον αφορά στο δεύτερο κριτήριο, το κριτήριο του %RSD, ο έλεγχος της καταλληλότητας του συστήματος περιλάμβανε την παρασκευή ενός διαλύματος (SST-2) σύμφωνα με την πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε για την ανάλυση του τελικού προϊόντος, με τη διαφορά ότι αντί για τελικό προϊόν, χρησιμοποιήθηκε νερό HPLC. Το διάλυμα αυτό αναλύθηκε πέντε συνεχόμενες φορές και στη συνέχεια υπολογίστηκε η σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) για το σήμα του εσωτερικού προτύπου στις πέντε συνεχόμενες ενέσεις του ίδιου διαλύματος, σύμφωνα με τον τύπο 6.1 που παρουσιάζεται στο εδάφιο 6.1.

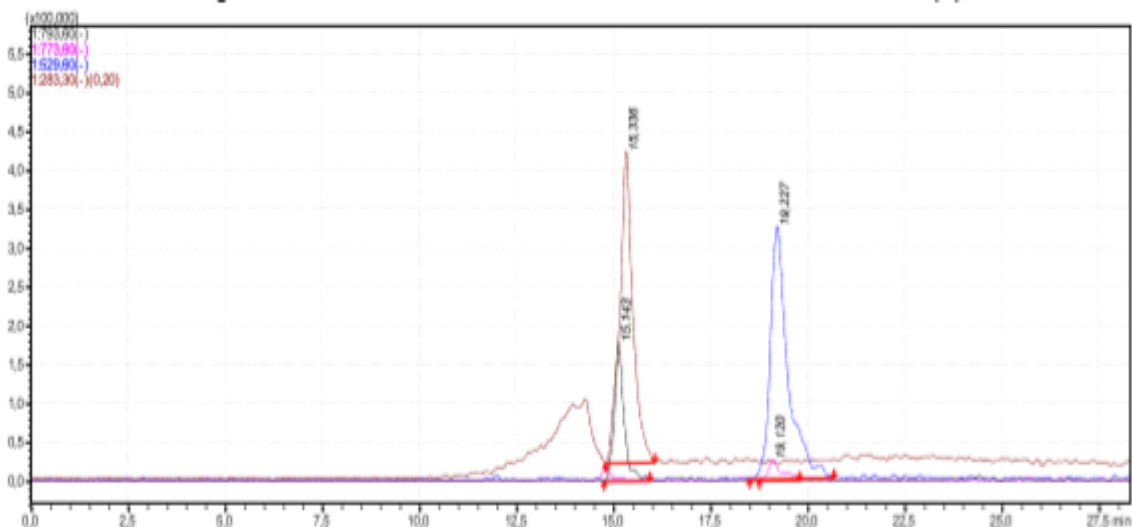
Ο υπολογισμός του %RSD έδειξε ότι το σύστημα θεωρείται κατάλληλο για τη διεξαγωγή της ανάλυσης, καθώς το σήμα του εσωτερικού προτύπου στις πέντε συνεχόμενες ενέσεις είναι σταθερό. Η τιμή του %RSD που υπολογίστηκε όσον αφορά στη λειτουργία ESI(+) είναι ίση με 19,9% και στην ESI(-) είναι ίση με 10,4%. Επομένως και στις δύο περιπτώσεις η τιμή του %RSD είναι μικρότερη από την τιμή 20, που αποτελεί και το κριτήριο.

Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται οι κορυφές των αναλυτών στόχων από τον έλεγχο καταλληλότητας του συστήματος, στην λειτουργία ESI(+) και ESI(-) αντίστοιχα.



Εικόνα 7.1: Κορυφές αναλυτών στόχων στο διάλυμα SST-1, για τον έλεγχο καταλληλότητας του συστήματος, σε λειτουργία θετικού ιοντισμού (ESI (+))

(Μαύρο: additive 08, Ροζ: additive 13, Μπλε: additive 09, Καφέ: additive 12, Πράσινο: additive 21)



Εικόνα 7.2: Κορυφές αναλυτών στόχων στο διάλυμα SST-1, για τον έλεγχο καταλληλότητας του συστήματος, σε λειτουργία αρνητικού ιοντισμού (ESI (-)) (Μαύρο: additive 08, Ροζ: additive 10, Μπλε: additive 11, Καφέ: additive 19)

7.4.2 Ανάλυση διαλύματος τελικού προϊόντος

Στο Εδάφιο 5.3.1, έγινε αναλυτικός υπολογισμός του ΑΕΤ στο προϊόν όσον αφορά σε ουσίες που χαρακτηρίζονται ως “γενετοξικές”, αλλά και σε ουσίες που χαρακτηρίζονται ως “ερεθιστικές”. Στην πρώτη περίπτωση, το αναλυτικό όριο είναι σαφώς χαμηλότερο. Πιο συγκεκριμένα, για το δείγμα προϊόντος βορικοναζόλης ισχύει:

$$\text{ΑΕΤ}_{\text{genotoxic}} = 0,156 \mu\text{g genotoxic compound /product vial}$$

$$\text{ΑΕΤ}_{\text{irritant}} = 0,521 \mu\text{g genotoxic compound /product vial}$$

Όσον αφορά στην ανάλυση των διαλυμάτων του τελικού προϊόντος ανιχνεύτηκαν αρκετά ευρήματα, όλα στο θετικό τρόπο ιοντισμού (ESI (+)). Ανάμεσα στα ευρήματα, δεν περιλαμβάνεται κάποιος από τους πλαστικοποιητές που χρησιμοποιήθηκαν ως αναλύτες-στόχοι, καθώς κανένας

από αυτούς δεν ανιχνεύτηκε, είτε στο θετικό, είτε στον αρνητικό τρόπο ιοντισμού.

Στον Πίνακα 7.1, παρουσιάζονται οι ενώσεις (ως Rt και m/z), οι οποίες βρίσκονται σε συγκεντρώσεις κοντά ή άνω του αναλυτικού ορίου ΑΕΤ. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση δύο ειδών τελικού προϊόντος, τελικού προϊόντος το οποίο είχε αποθηκευτεί τοποθετημένο κανονικά (upright) και τελικού προϊόντος το οποίο είχε αποθηκευτεί τοποθετημένο ανάποδα. (ανεστραμμένο, inverted). Έγιναν δύο παρασκευές για κάθε είδος τελικού προϊόντος. Οι συγκεντρώσεις που βρέθηκαν, τόσο στο τελικό διάλυμα (solution), όσο και στο προϊόν (product), υπολογίστηκαν από τον μέσο όρο των συγκεντρώσεων στα δύο δείγματα (στις δύο παρασκευές) του ίδιου διαλύματος που έλαβαν χώρα.

Πίνακας 7.1: Ουσίες («leachables») που ανιχνεύτηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν σε συγκεντρώσεις κοντά ή άνω του ορίου ΑΕΤ, στη λειτουργία θετικού ιοντισμού, ESI(+), όσον αφορά στα δύο είδη δειγμάτων

Rt (min)	m/z	Upright	Inverted
		Average estimated concentration (µg/ product vial)	
11,6	456,5	0,371	μ.α.*
14,0	408,3	2,22	2,20
14,7	336,3	3,02	2,91
15,2	408,5	12,0	12,7
15,5	466,6	14,7	15,3
15,9	568,7	9,09	9,42
16,0	494,7	4,95	4,99
16,2	582,8	6,09	6,26
16,5	596,8	3,39	3,31
16,6	640,9	2,73	2,79
16,6	729,0	2,33	2,32
17,0	743,0	1,46	1,44
17,0	875,0	0,632	0,732
17,3	831,0	0,644	0,528
20,7	698,6	0,743	0,468

21,6	833,4	0,399	0,174
23,7	846,6	0,277	0,070

*μ.α. : Μη ανιχνεύσιμο

Οι ενώσεις που επισημαίνονται με πράσινο χρώμα έχουν συγκέντρωση μικρότερη από το όριο ΑΕΤ που έχει οριστεί για τις πιθανές γενετοξικές ουσίες. Οι ενώσεις που επισημαίνονται με κίτρινο χρώμα βρέθηκαν σε συγκέντρωση που είναι μεγαλύτερη του ΑΕΤ για μια πιθανή γενετοξική ουσία, αλλά χαμηλότερη του ΑΕΤ για μια πιθανή ερεθιστική ουσία. Τέλος, οι ενώσεις με κόκκινο χρώμα βρέθηκαν σε συγκέντρωση μεγαλύτερη του ορίου ΑΕΤ που έχει οριστεί για πιθανές ερεθιστικές ενώσεις.

Ανάμεσα στις άγνωστες ουσίες (leachables) που ανιχνεύτηκαν παρουσιάζονται και δύο ομάδες (κατανομές) μορίων οι οποίες ακολουθούν συγκεκριμένα μοτίβα. Η πρώτη κατανομή, της οποίας κύριο ιόν είναι αυτό με m/z 408,5, αποτελείται από μόρια τα οποία έχουν διαφορά μεταξύ τους 44 amu . Αυτό το μοτίβο είναι ενδεικτικό των εστέρων πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG) ή πιο συγκεκριμένα των εστεροποιημένων ενώσεων που βασίζονται στην επαναλαμβανόμενη ομάδα αιθυλενογλυκόλης ή αιθυλενοξειδίου. Έτσι η διαφορά είναι ίση με 44 amu ή πολλαπλάσια αυτής, 88, 132 κ.λ.π. για την αναπτυσσόμενη αλυσίδα CH_2CH_2O- . Η δεύτερη κατανομή, της οποίας κύριο ιόν είναι το ιόν με m/z 466,6, περιέχει μόρια που διαφέρουν μεταξύ τους κατά 14 amu , γεγονός που υποδηλώνει μια επαναλαμβανόμενη ομάδα ενός τμήματος υδρογονανθρακικής αλυσίδας ($-CH_2-$). Λαμβάνοντας υπόψη τη δήλωση του παραγωγού για την παρουσία αντιδραστηρίων φυτικής προέλευσης, γίνεται η υπόθεση ότι οι ενώσεις αυτές ανήκουν σε φυτικά έλαια που έχουν υποστεί χημική τροποποίηση με στόχο το σχηματισμό εποξειδίων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

8.1 Αποτελέσματα και Συζήτηση

Η δυνατότητα της φασματομετρίας μαζών (MS) να ανιχνεύει σχεδόν κάθε οργανική ένωση σε χαμηλές συγκεντρώσεις (< ppm), την καθιστά ιδανική για τον προσδιορισμό μιας μεγάλης ποικιλίας ουσιών που μεταναστεύουν κατά την παραγωγική διαδικασία (φίλτρο, σωλήνες, συσκευασίες φαρμακευτικών σκευασμάτων) στο περιεχόμενο των φαρμάκων.

Στην ερευνητική αυτή εργασία, αναπτύχθηκε μια μέθοδος SPE HPLC-MS για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των ουσιών που μεταναστεύουν (leachables) από τον περιέκτη του φαρμακευτικού σκευάσματος σε φαρμακευτικό σκεύασμα βορικοναζόλης. Η ανάλυση, η οποία πραγματοποιήθηκε σε πρότυπο δείγμα προσαρμοσμένο στη μήτρα του δείγματος της βορικοναζόλης (matrix matched reference), θεωρείται κατάλληλη για το σκοπό για τον οποίο προορίστηκε (fit for purpose), αφού τηρούνται όλα τα κριτήρια που είχαν οριστεί.

Η μέθοδος που επικυρώθηκε περιλαμβάνει στάδια προκατεργασίας του δείγματος με μεγάλη χρονική διάρκεια (SPE). Παρόλο αυτά, τα στάδια ήταν αναγκαία δεδομένου του πολύ χαμηλού ορίου ΑΕΤ που υπολογίστηκε και καθορίστηκε. Η εκχύλιση στερεάς φάσης ήταν σημαντική για τον καθαρισμό και την προσυγκέντρωση του δείγματος.

Κατά την επικύρωση της μεθόδου, πραγματοποιήθηκε έλεγχος των χαρακτηριστικών ποιότητάς της. Οι παράμετροι που εξετάστηκαν ήταν η δοκιμασία καταλληλότητας του συστήματος, η γραμμικότητα, η ακρίβεια, η ενδιάμεση πιστότητα, η επαναληψιμότητα, η ειδικότητα, το όριο ποσοτικοποίησης, η σταθερότητα των διαλυμάτων και η ανθεκτικότητα της μεθόδου. Τα κριτήρια για αυτές τις παραμέτρους πληρούνται σε κάθε

περίπτωση, αποδεικνύοντας ότι η μέθοδος που αναπτύχθηκε είναι κατάλληλη για την ανάλυση δείγματος βορικοναζόλης.

Κατά την εφαρμογή της μεθόδου, στον θετικό ιοντισμό ESI (+), ανιχνεύτηκαν αρκετές άγνωστες ενώσεις. Αντίθετα, στον αρνητικό ιοντισμό ESI (-), δεν ανιχνεύτηκε καμία άγνωστη ένωση.

Οι συγκεντρώσεις τους βρέθηκαν να υπερβαίνουν το αναλυτικό όριο $AET_{\text{genotoxic}}$ (για ενώσεις με πιθανή γενετοξική δράση για τον ανθρώπινο οργανισμό). Κάποιες από τις ενώσεις αυτές, βρέθηκαν να υπερβαίνουν ακόμα και το όριο AET_{irritant} (για ενώσεις με πιθανή ερεθιστική δράση στον ανθρώπινο οργανισμό).

8.2 Μελλοντική Έρευνα

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε μπορεί να βελτιστοποιηθεί μελλοντικά, στους παρακάτω τομείς:

- Χρήση διαφορετικώνφουσιγγίωντης SPE, που θα είναι πιο εκλεκτικά ως προς τους άπολους αναλύτες.
- Βελτιστοποίησητων συνθηκών της διαδικασίας τη SPE.

Μια ήδη επικυρωμένη μέθοδος σε ενέσιμο διάλυμα βορικοναζόλης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μελλοντικά για την ανάλυση παρόμοιων δειγμάτων και για αναλύτες που μεταναστεύουν και είναι άπολου χαρακτήρα.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
Active Pharmaceutical Ingredient	Δραστική Φαρμακευτική Ουσία
Acquisition mode	Λειτουργία σάρωσης/ανάλυσης
Acquisition time	Χρόνος λήψης δεδομένων
Analytical Evaluation Threshold	Αναλυτικό Όριο Αξιολόγησης
Electrospray Ionization	Ιοντισμός με Ηλεκτροψεκασμό
Extractables	Εκχυλίσιμες Ουσίες
Extraction Studies	Μελέτες εκχύλισης
Identification	Ταυτοποίηση
Internal Standard	Εσωτερικό Πρότυπο
Leachables	Ουσίες Μετανάστευσης
Leachable Species Profile	Προφίλ Μετανάστευσης
Mass Spectrometry	Φασματομετρία Μαζών
Mass to Charge ratio	Λόγος μάζας/φορτίου
Matrix Effect	Επίδραση Μήτρας
Matrix Factor	Παράγοντας Μήτρας
Matrix matched	Προσαρμοσμένο στη μήτρα του δείγματος
Migration Studies	Μελέτες Μετανάστευσης
Photodiode Array Detector	Ανιχνευτής Συστοιχίας Φωτοδιόδων
Quantification	Ποσοτικοποίηση
Recovery	Ανάκτηση
Relative Standard Deviation	Σχετική Τυπική Απόκλιση
Retention Time	Χρόνος Ανάσχεσης
Solid Phase Extraction	Εκχύλιση Στερεάς Φάσης
Specifications	Προδιαγραφές
Spiked sample	Εμβολιασμένο Δείγμα
System Suitability testing	Έλεγχος Καταλληλότητας Συστήματος
Validation	Επικύρωση

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Ακρωνύμια και η ανάπτυξή τους

AAS	Atomic Absorption Spectroscopy
AET	Analytical Evaluation Threshold
AMU	Atomic Mass Unit
API	Active Pharmaceutical Ingredient
CI	Chemical Ionization
CRS	Certified Reference Substance
DAD	Diode Array Detector
EDQM	European Directorate for the Quality of Medicines
EI	Electron Impact
EIC	Extracted Ion Chromatogram
EMA	European Medicines Agency
ESI	Electrospray Ionization
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
GC	Gas Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICH	International Conference on Harmonization
INT	Internal
IS	Internal Standard
M/Z	Mass to Charge
ME	Matrix Effect
MF	Matrix Factor
MS	Mass Spectrometry
PA	Plastic Additive
PDA	Photo Diode Array
PQRI	Product Quality Research Institute
QQQ	Triple Quadrupole
R (%)	Recovery (%)
RH	Relative Humidity
RP	Reversed-Phase Chromatography
RSD	Relative Standard Deviation

RT	Retention Time
S/N	Signal to Noise
SCT	Safety Concern Threshold
SIM	Single Ion Monitoring
SPC	Summary of Product Characteristics
SPE	Solid Phase Extraction
SST	System Suitability Testing
TDI	Total Daily Intake
TTC	Threshold of Toxicological Concern
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultraviolet
V/V (%)	Volume to Volume (%)
W/V (%)	Weight to Volume (%)
ΕΚΠΑ	Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
ΕΦ	Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία
ΜΒ	Μοριακό Βάρος

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Α. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

Χρωματογραφικό Σύστημα:	<u>ShimadzuNexeraX2 HPLC</u> LC-30ADUPLC αντλία 4 δοχείων DGU-20A5R απαερωτής SIL30AC αυτόματος δειγματολήπτης CTO-20AC φούρνος στήλης SPD-M20A IVDD PDA ανιχνευτής Λογισμικό LabSolutions v.5.75
Φασματοόμετρο μαζών:	Shimadzu 8040 τριπλό τετράπολο (QqQ) με πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI)
Αναλυτικές Στήλες	Phenomenex, Kinetex®, PFP, 100 × 2,1mm × 1,7µm (Part No: 00D-4476-AN)
Σύστημα SPE:	VACELUT SPS 24, Varian®, Agilent
Στήλες SPE	C18 endcapped, 6mL/500 mg, Sorbent–LOT0615/7, CHROMABOND® • LC-Florisil 100/120 mesh particles, Magnesium Silicate, Sigma-Aldrich

Συσκευή παραγωγής νερού υψηλής καθαρότητας

Χρησιμοποιήθηκε συσκευή απόσταξης CorningMegapure με δοχείο έξι λίτρων, η οποία τροφοδοτείται με απιοντισμένο νερό το οποίο έχει διέλθει μέσα από ιονανταλλακτική στήλη IONEL. Το νερό που παραλαμβάνεται τελικά, είναι απιοντισμένο και απεσταγμένο, με ειδική αντίσταση >18 MΩ·cm.

Λοιπές συσκευές

1. Αναλυτικός ζυγός AUW320 (10mg – 300g), της εταιρείας Schimadzu
2. Αναλυτικός ζυγός AUX320 (10mg – 100g), της εταιρείας Schimadzu
3. Πεχάμετρο Consort C3010, με ηλεκτρόδιο υάλου της ίδιας εταιρίας
4. Συσκευή διήθησης κινητής φάσης AFORA poro 3, με χρήση φίλτρων PVDF, με πόρους διαμέτρου 0,45 μm και συνολική διάμετρο 47 mm, Rephile Bioscience
5. Φίλτρα σύριγγας αναγεννημένης κυτταρίνης (RC), με διάμετρο πόρων 0,45 μm, 45/25, CHROMAFIL® Xtra
6. Σύριγγες Nipro Syringe 5mL, 21G x 11/2", 0,8 x 38 mm with needle
7. Μαγνητικός Αναδευτήρας IKA® RT15 10.

B. ΔΙΑΛΥΤΕΣ - ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. Ακετονιτρίλιο βαθμού καθαρότητας LC-MS Grade (Fischer Scientific)
2. Μεθανόλη βαθμού καθαρότητας LC-MS Grade (Fischer Scientific)
3. Οξικό αμμώνιο, 99% (ACROS Organics)
4. Κανονικό Εξάνιο, ≥ 95% (Sigma-Aldrich)
5. Ισοπροπανόλη βαθμού καθαρότητας HPLC (Fischer Scientific)

Γ. ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (CRS)

(Λοιπές πληροφορίες στον πίνακα 5.4)

1. Ph. Eur. Plastic Additive 08, Batch no:3, purity: 100%, CAS number: 32509-66-3
2. Ph. Eur. Plastic Additive 09, Batch no:3, purity: 100%, CAS number: 6683-19-8
3. Ph. Eur. Plastic Additive 10, Batch no:3, purity: 100%, CAS number: 1709-70-2
4. Ph. Eur. Plastic Additive 11, Batch no:3, purity: 100%, CAS number: 2082-79-3
5. Ph. Eur. Plastic Additive 12, Batch no:3, purity: 100%, CAS number: 31570-01-4
6. Ph. Eur. Plastic Additive 13, Batch no:3, purity: 100%, CAS number: 27676-62-6
7. Ph. Eur. Plastic Additive 19, Batch no:3, purity: 100%, CAS number: 57-11-4
8. Ph. Eur. Plastic Additive 21, Batch no:3, purity: 100%, CAS number: 112-84-5

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- [1] D. Jenke, *Compatibility of Pharmaceutical Products and Contact Materials - Safety Considerations Associated with Extractables and Leachables*, New Jersey: John Wiley & Sons, 2009.
- [2] USP General Chapter 1663, *Assessment of extractables associated with pharmaceutical packaging/delivery systems*.
- [3] USP General Chapter 1664, *Assessment of drug product leachables associated with pharmaceutical packaging/delivery systems*.
- [4] *Guideline on Plastic Immediate Packaging Materials*, in European Medicines Agency Inspection, London, 2005.
- [5] D. Ball, J. Blanchard, D. Jacobson-Kram, R. McClellan, T. McGovern and D. Norwood, *Development of safety qualification thresholds and their use in orally inhaled and nasal drug product evaluation*, Toxicological Sciences, vol. 97, pp. 226-236, 2007.
- [6] R. Kroes, A. Renwick, M. Cheeseman, J. Kleiner, I. Mangelsdorf, A. Piersma and B. Schilter, *Structure-based threshold of toxicological concern (TTC): Guidance for application to substances present at low levels in the diet*, Food Chemistry Toxicology, vol. 42, pp. 65-83, 2004.
- [7] Product Quality Research Institute (PQRI), *Safety Thresholds and Best Practices for Extractables and Leachables in Orally Inhaled and Nasal Drug Products*, in *Leachables and Extractables Working Group*, Arlington, 2006.
- [8] D. M. Paskiet, *Leachables and Extractables, PODP Accomplishments and Next Steps (PQRI)*, 2011.<http://pqri.org/wpcontent/uploads/2015/11/Paskiet.pdf>
(Ημερομηνία τελευταίας επίσκεψης: 26/8/2018)
- [9] A. Shroeder, *Leachables and extractables in OINDP, an FDA perspective*, in *PQRI Leachables and Extractables Workshop*, Bethesda, December 2008.
- [10] G. Poochikian, *Leachables and extractables: evolution of regulatory aspects and perspectives on PQRI recommendations*, in IPAC-RS, 2011

Conference: Bringing Value to the Patient in a Changing World, Rockville, 2011.

[11] D. Ball, D. Norwood, C. Stults and L. Nagao, *Leachables and Extractables Handbook*, New York: J. Wiley and Sons, 2012.

[12] FDA, *Guidance for industry: container-closure systems for packaging human drugs and biologics*, Rockville, 1999.

[13] D. Paskiet, D. Jenke and D. Ball, *The Product Quality Research Institute (PQRI) Leachables and Extractables Working Group Initiatives for Parenteral and Ophthalmic Drug Product (PODP)*, PDA J Pharm Sci Technol, vol. 67, pp. 430-447, Sep-Oct 2013.

[14] <https://en.wikipedia.org/wiki/Voriconazole>(Ημερομηνία τελευταίας επίσκεψης: 31/8/2018)

[15] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Voriconazole>(Ημερομηνία τελευταίας επίσκεψης: 10/8/2019)

[16] European Pharmacopoeia 8.0, monograph 01/2012:2576, Voriconazole.

[17] P. Boeira, *Ultra-Performance Liquid Chromatographic Method for Measurement of Voriconazole in Human Plasma and Oral Fluid*, Journal of the Brazilian Chemical Society vol. 23, number 1, pp. 148-155, 2012.

[18] Ping Gu and Yuru Li, *Development and Validation of a Stability-Indicating HPLC Method for Determination of Voriconazole and Its Related Substances*, Journal of Chromatographic Science, vol. 47, 2009.

[19] Anne-Catherine Servais, *Development and validation of a liquid chromatographic method for the stability study of a pharmaceutical formulation containing voriconazole using cellulose tris(4-chloro-3-methylphenylcarbamate) as chiral selector and polar organic mobile phases*, Journal of Chromatography A, vol. 1363, pp. 178-182, 2014.

[20] A.-C. Servais, *Development and validation of a liquid chromatographic method for the stability study of a pharmaceutical formulation containing*

voriconazole using cellulose tris(4-chloro-3-methylphenylcarbamate) as chiral selector and polar organic mobile phases, Journal of Chromatography A, vol. 1363, pp. 178-182, 2014.

[21] <https://www.medicines.org.uk/emc/product/8674/smpc> (Ημερομηνία τελευταίας επίσκεψης: 10/8/2019)

[22] Ur. Theuretzbacher, F. Ihle, H. Derendorf, *Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Profile of Voriconazole*, Clinical Pharmacokinetics, vol. 45, number 7, pp. 649-663, 2006.

[23] L. Purkins, N. Wood, K. Greenhalgh, M.J. Allen, S.D. Oliver, *Voriconazole, a novel wide-spectrum triazole: oral pharmacokinetics and safety*, British Journal of Clinical Pharmacology, vol. 56, pp. 10-16, 2003.

[24] I.F. Kuo and M.H.H. Ensom, *Role of Therapeutic Drug Monitoring of Voriconazole in the Treatment of Invasive Fungal Infections*, The Canadian Journal of Hospital Pharmacy, vol. 62, number 6, pp. 469-482, 2009.

[25] D. Levêque, Y. Nivoix, F. Jehl, R. Herbrecht, *Clinical Pharmacokinetics of Voriconazole*, International Journal of Antimicrobial Agents, vol. 27, pp. 274-284, 2006

[26] K. Han, R. Bies, H. Johnson, B. Capitano, R. Venkataramanan, *Population Pharmacokinetics Evaluation with External Validation and Bayesian Estimator of Voriconazole in Liver Transplant Recipients*, Clinical Pharmacokinetics, vol.50, pp.201-214, 2011.

[27] A. Pasqual, T. Calandra, S. Bolay, T. Buclin, J. Bille, O. Marchetti, *Voriconazole Therapeutic Drug Monitoring in Patients with Invasive Mycoses Improves Efficacy and Safety Outcomes*, Clinical Infectious Disease, vol. 46, pp. 202-211, 2007.

[28] L. Friberg, P. Ravva, M. Karlsson, P. Liu, *Integrated Population Pharmacokinetic Analysis of Voriconazole in Children, Adolescents, and Adults*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol.56, Number 6, pp.3032-3042, June 2012.

- [29] Briefing document for voriconazole (oral and intravenous formulations). Prepared for submission to US Food and Drug Administration, Food and Drugs Advisory Committee. Pfizer; 2001 Oct 4 [cited 2008 Sep 3]. Available from:http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3792b2_01_Pfizer.pdf
- [30] <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00582> (Ημερομηνία τελευταίας επίσκεψης: 10/8/2019)
- [31] <https://reference.medscape.com/drug/vfend-voriconazole-342598> (Ημερομηνία τελευταίας επίσκεψης: 10/8/2019)
- [32] <https://www.rxlist.com/vfend-drug.htm>(Ημερομηνία τελευταίας επίσκεψης: 10/8/2019)
- [33] European Medicines Agency, *Guideline on the investigation of drug interactions*, 2012.
- [34] T. Driscoll, L. Yu, H. Frangoul, R. Krance, E. Nemecek, J. Blumer, A. Arrieta, M. Graham, S. Bradfield, A. Baruch, P. Liu, *Comparison of Pharmacokinetics and Safety of Voriconazole Intravenous-to-Oral Switch in Immunocompromised Children and Healthy Adults*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 55, number 12, pp.5770-5779, December 2011.
- [35] S. Rawa-Adkonis, L. Wolska and J. Namiesnik, *Modern techniques of extraction of organic from environmental matrices*, *Anal. Chem.*, vol. 33, 2003.
- [36] V. Camel, *Solid phase extraction of trace elements*, *Spectrochimica Acta*, vol. 58, 2003.
- [37] A. Żwir-Ferenc and M. Biziuk, *Solid-Phase Extraction Technique-Trends, Opportunities and Applications*, *Polish J. of Environ. Stud.*, vol. 15, pp. 677-690, 2006.
- [38] Θ. Χατζηγιάννου και Μ. Κουππάρης, *ΕΝΟΡΓΑΝΗ ΑΝΑΛΥΣΗ*, Αθήνα: Δ.Μαυρομμάτη, 2003.
- [39] P. Lucci, D. Pacetti, N. Frega and O. Núñez, *Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis*, in

Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis, InTech, 2012.

[40] R. Clement and C. Hao, *Liquid–Liquid Extraction: Basic Principles and Automation*, in *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, Elsevier, pp. 51-63, 2012.

[41] D. Skoog, J. Holler and T. Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*, Athens: Kostarakis Editions, 2005.

[42] S. Kataria, P. Beniwal, A. Middha, P. Sandhu and D. Rathore, *Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Applications*, *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, vol. 2, pp. 1544-1560, 2011.

[43] J. Watson and D. Sparkman, *Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation*, John Wiley & Sons, 2007.

[44] E. Hoffmann and V. Stroobant, *Mass Spectrometry, Principles and Applications*, Edition 3, Ed., John Wiley & Sons, 2007.

[45] J. Gross, *Mass spectrometry: a textbook*, Berlin: Springer, 2004.

[46] H.-J. Hübschmann, *Handbook of GC/MS - Fundamentals and Applications*, Germany: Wiley-VCH, 2009.

[47] M. Sargent, *Guide to achieving reliable quantitative LC-MS measurements*, RSC Analytical Methods Committee, 2013.

[48] J.-S. Kang, *Principles and Applications of LC-MS/MS for the Quantitative Bioanalysis of Analytes in Various Biological Samples*, in *Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles*, D. J. Prasain, Ed., InTech, pp. 794, 2012.

[49] D. Hager, N. Dovichi, J. Klassen and P. Kebarle, *Droplet electrospray mass spectrometry*, *Analytical Chemistry*, vol. 66, pp. 3944-49, 1994.

- [50] R. Grimm and J. Beauchamp, *Evaporation and discharge dynamics of highly charged multicomponent droplets generated by electrospray ionization*, J. Phys. Chem, vol. 114, pp. 1411-19, 2010.
- [51] J. Syage, S. Cai and L. Short, *Atmospheric Pressure Photoionization - The Second Source for LC-MS?*, LCGC North America, vol. 26, pp. 286-296, 2008.
- [52] M. Wilm, *Principles of Electrospray Ionization*, Molecular & Cellular Proteomics, vol. 10, 2011.
- [53] R. Kostianen, T. Kotiaho, T. Kuuranne and S. Auriola, *Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization–mass spectrometry in drug metabolism studies*, J Mass Spectrometry, vol. 38, pp. 357-372, 2003.
- [54] T. Covey, B. Thomson and B. Schneider, *Atmospheric pressure ion sources*, Mass Spectrom Rev, vol. 28, pp. 870-897, 2009.
- [55] R. Xu, L. R. M. Fan and T. El-Shourbagy, *Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC-MS/MS*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, vol. 44, number 2, pp. 342-355, 2007.
- [56] J. Mazzeo, U. Neue, M. Kele and P. R.S, *Advancing LC Performance with Smaller Particles and Higher Pressure*, Analytical Chemistry, vol. 77, number 23, pp. 460-467, 2005.
- [57] M. Yao, L. Humphreys and W. Zhu, *Rapid screening and characterization of drug metabolites using a multiple ion monitoring-dependent MS/MS acquisition method on a hybrid triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometer*, J Mass Spectrometry, vol. 43, pp. 1364-75, 2008.
- [58] M. Yao, L. Ma, E. Duchoslav and M. Zhu, *Rapid screening and characterization of drug metabolites using multiple ion monitoring dependent product ion scan and postacquisition data mining on a hybrid triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometer*, Rapid Commun Mass Spectrometry, vol. 23, pp. 1683-93, 2009.

[59] M. Schwartz and I. Krull, *Analytical Method Development and Validation*, New York: Marcel Dekker, 1997.

[60] J. Ermer and J. H. McB., *Method Validation in Pharmaceutical Analysis*, J. Ermer, Ed., WILEY-VCH, 2005.

[61] European Pharmacopoeia 8.0, monograph 01/2008:30113, corrected 6.2 (§ 3.1.13): Plastic additives.

[62] J. Watson and D. Sparkman, *Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications, and Strategies for Data Interpretation (4th Edition)*, Journal of Chemical Education, July 2009.

