

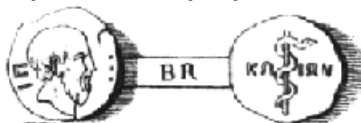


ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
—ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837—

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

"ωφελέειν, εἰ μὴ βλάπτειν"



'benefit and do not harm'

Ανάπτυξη και Επικύρωση νέας Μεθόδου HPLC για τον Προσδιορισμό
Προσμίξεων Μετρονιδαζόλης σε Δισκία

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΤΟΥ ΠΜΣ

«ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ-ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»



ΜΕΝΗ ΑΝΘΗ

Φαρμακοποιός ΕΚΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2024

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ι. ΝΤΟΤΣΙΚΑΣ	ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΕΚΠΑ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)
Ι. ΛΟΥΚΑΣ	ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΕΚΠΑ
Κ. ΓΕΩΡΓΑΚΟΠΟΥΛΟΣ	ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ: ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2024

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στα αναλυτικά εργαστήρια της QualiMetriX SA, τα οποία στεγάζονται στη Λεωφόρο Μεσογείων 579 στην Αγία Παρασκευή Αττικής. Αποτελεί ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Φαρμακευτική Ανάλυση – Έλεγχος Ποιότητας» του τμήματος Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Ντότσικα Ιωάννη, επιβλέποντα καθηγητή μου για την πολύτιμη βοήθεια, κατανόηση και υποστήριξη του καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου, καθώς φυσικά και κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Η καθοδήγησή του καθώς και η μεταξύ μας συνεργασία έπαιξε καθοριστικό ρόλο στην αύξηση της αγάπης και του ενδιαφέροντος μου για τη φαρμακευτική ανάλυση και για τη μετέπειτα επαγγελματική μου πορεία. Ευχαριστώ επίσης τον Αν. Καθηγητή Λουκά Ιωάννη καθώς και τον Αν. Καθηγητή Γεωργακόπουλο Κωνσταντίνο για την αξιολόγηση της παρούσας εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη διοίκηση της QualiMetriX SA για την ευκαιρία που μου πρόσφερε να εκπονήσω την ερευνητική μου εργασία στα υπερσύγχρονα και πλήρως εξοπλισμένα εργαστήρια της, μαθαίνοντας μέσα σε πραγματικό εργαστηριακό GMP περιβάλλον. Ευχαριστώ ολόκληρη την ομάδα του RnD τμήματος και ιδιαίτερα την κυρία Μπούμπουκα Αγγελική για την άψογη συνεργασία, την πλήρη καθοδήγηση και εκπαίδευση που μου πρόσφεραν πάνω στις απαιτούμενες αναλυτικές τεχνικές.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου για τη συμπαράσταση και την υποστήριξη τους σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η ανάπτυξη και επικύρωση μίας μεθόδου HPLC για τον ακριβή και αξιόπιστο προσδιορισμό των προσμίξεων της δραστικής ουσίας Μετρονιδαζόλης σε δισκία ή κάψουλες Υποκιτρικού καλιούχου βισμούθιου 140 mg/ Μετρονιδαζόλης 125 mg/ Υδροχλωρικής τετρακυκλίνης 125 mg. Το συγκεκριμένο σκεύασμα με τον παραπάνω συνδυασμό δραστικών ουσιών χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του πεπτικού έλκους (δωδεκαδακτυλικό) που προκαλείται από το παθογόνο βακτήριο *Helicobacter pylori*. Η μέθοδος που επιλέχθηκε βασίστηκε στις αρχές της χρωματογραφίας αντιστρόφου φάσεως με την προσθήκη υπερχλωρικών στην κινητή φάση για τη δημιουργία ζευγών ιόντων. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν μία ACE 3 C18-PFP, 150 × 4,6 mm, 3 μm σε θερμοκρασία 25 °C και ταχύτητα ροής κινητής φάσης στα 0,6 mL/min. Η κινητή φάση A αποτελούνταν από ρυθμιστικό διάλυμα pH 3,20/Μεθανόλη 95/5 v/v, ενώ η κινητή φάση B από Μεθανόλη/Ακετονιτρίλιο 50/50 v/v. Επιλέχθηκε πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης με συνολική διάρκεια 47 min και μήκος κύματος προσδιορισμού στα 315 nm. Όσον αφορά την επικύρωση της μεθόδου, αυτή στηρίχθηκε στις κατευθυντήριες οδηγίες του ICH και περιλαμβάνουν την εκλεκτικότητα, τη γραμμικότητα, την επαναληψιμότητα, την πιστότητα και τη σταθερότητα των διαλυμάτων.

Abstract

The purpose of this thesis was the development and validation of an HPLC method for the accurate and reliable determination of impurities of the active substance Metronidazole in Bismuth potassium hypocitrate 140 mg/ Metronidazole 125 mg/ Tetracycline hydrochloride 125 mg tablets or capsules. The specific formulation with the above combination of active pharmaceutical compounds is used to treat peptic ulcer (duodenal) caused by the pathogenic bacterium *Helicobacter pylori*. The method chosen was based on the principles of reverse phase chromatography with the addition of perchlorates in mobile phase to create ion pairs. The column used was an ACE 3 C18-PFP, 150 × 4.6 mm, 3 μm at a temperature of 25 °C and a mobile phase flow rate of 0.6 mL/min. Mobile phase A consisted of buffer solution pH 3.20/Methanol 95/5 v/v, while mobile phase B of Methanol/Acetonitrile 50/50 v/v. A gradient elution program with a total run time of 47 min and a determination wavelength of 315 nm was selected. The validation of the method was based on the ICH guidelines which include specificity, linearity, repeatability, accuracy and stability of solutions.

Πίνακας περιεχομένων

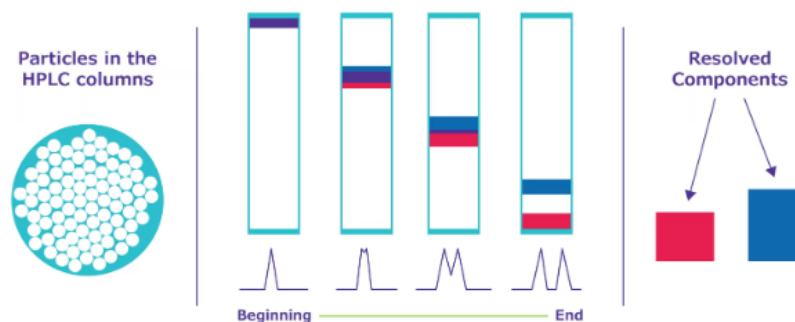
Κεφάλαιο 1 ^ο : Τεχνικές βελτιστοποίησης του χρωματογραφικού διαχωρισμού	8
1.1 Εισαγωγή στις μεθόδους βελτιστοποίησης του χρωματογραφικού διαχωρισμού	8
Κεφάλαιο 2 ^ο : Αναλυτική διαδικασία	19
2.1 Αναλυτικός Εξοπλισμός, Πρότυπα, Αντιδραστήρια και Αναλώσιμα	19
2.2 Παρασκευή διαλυμάτων	20
2.3 Οργανολογικές παράμετροι	21
2.4 Ακολουθία ανάλυσης	22
2.5 Υπολογισμοί	23
Κεφάλαιο 3 ^ο : Ανάπτυξη νέας μεθόδου προσδιορισμού προσμίξεων μετρονιδαζόλης	24
3.1 Οι προσμίξεις της μετρονιδαζόλης	24
3.2 Αρχική χρωματογραφική μέθοδος	27
3.2 Βελτιστοποίηση της μεθόδου	29
3.3 Χρωματογραφικές παράμετροι – Τελική μέθοδος (Μέθοδος III)	41
Κεφάλαιο 4 ^ο : Πειράματα επιταχυνόμενης διάσπασης	44
4.1 Πειράματα επιταχυνόμενης διάσπασης-Διατήρηση μάζας	44
Κεφάλαιο 5 ^ο : Επικύρωση μεθόδου	50
5.1 Εκλεκτικότητα	50
5.2 Γραμμικότητα	55
5.3 Προσδιορισμός του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ)	78
5.4 Προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης (LOD)	80
5.5 Παράγοντας σχετικής απόκρισης (RRF)	81
5.6 Επαναληψιμότητα	81
5.7 Πιστότητα	89
5.8 Σταθερότητα διαλυμάτων	93
Συμπέρασμα	96
Βιβλιογραφικές αναφορές:	97

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1^ο : Τεχνικές βελτιστοποίησης του χρωματογραφικού διαχωρισμού

1.1 Εισαγωγή στις μεθόδους βελτιστοποίησης του χρωματογραφικού διαχωρισμού

Η διαδικασία διαχωρισμού με τη χρήση Υγροχρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) ξεκινά με την εισαγωγή του δείγματος σε μια στήλη αποτελούμενη από πορώδη σωματίδια (στατική φάση). Η έγχυση και η μεταφορά του δείγματος μέσω της στήλης πραγματοποιείται με τη βοήθεια μιας κινούμενης υγρής φάσης (κινητή φάση). Κατά την επαφή των αναλυτών με τη στατική φάση αλληλεπιδρούν με αυτήν σε διαφορετικό βαθμό, γεγονός που οδηγεί στο διαχωρισμό τους σε 'καθαρές' ζώνες οι οποίες μπορούν στη συνέχεια να συλλεχθούν και να αναλυθούν.[1] Ισχυρή συγγένεια των αναλυτών με τη στατική φάση οδηγεί σε ισχυρότερη συγκράτηση στη στήλη και κατά συνέπεια μεγαλύτερους χρόνους κατακράτησης.[2]



Εικόνα 1.1: Σχεδιαγραμματική απεικόνιση του χρωματογραφικού διαχωρισμού

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες αξιολόγησης της απόδοσης της HPLC είναι η διαχωριστική ικανότητα (Resolution, R_s).[3] Η διαχωριστική ικανότητα, R_s μπορεί να εκφραστεί μέσω της παρακάτω εξίσωσης, στην οποία συμπεριλαμβάνονται οι παράγοντες που την επηρεάζουν[κατακράτηση(retention), εκλεκτικότητα(selectivity) και απόδοση(efficiency)]:[3], [4]

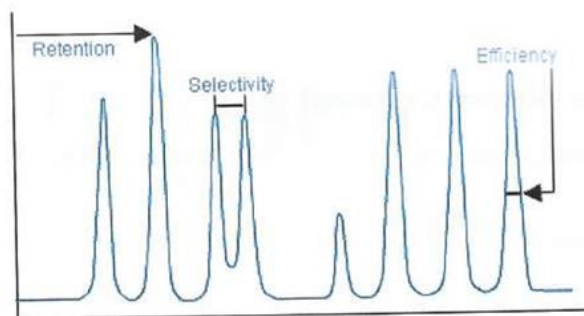
$$R_s = \frac{k}{k+1} \times \frac{\alpha-1}{\alpha} \times \frac{\sqrt{N}}{4}$$

Retention Selectivity Efficiency

Όπου k: συντελεστής συγκράτησης ή παράγοντας χωρητικότητας

α: εκλεκτικότητα και

N: οι θεωρητικές πλάκες της στήλης



Εικόνα 1.2: Η θεμελιώδης εξίσωση της διαχωριστικής ικανότητας και οι συνεισφέροντες παράγοντες

Προκειμένου να εξεταστεί εάν μια ένωση κατακρατείται από τη στήλη πρέπει να είναι γνωστός ο νεκρός όγκος, V_0 ή ο νεκρός χρόνος της στήλης, t_0 . Ως νεκρός χρόνος ορίζεται ο χρόνος που κάνει να διαπεράσει τη στήλη μία ουσία που δεν συγκρατείται καθόλου από αυτή και εκλύεται μαζί με το μέτωπο του διαλύτη για μία συγκεκριμένη ταχύτητα ροής. Ενώσεις που εκλύονται στο νεκρό χρόνο ή πολύ κοντά σε αυτόν δε μπορούν να αναλυθούν και να διαχωριστούν καθώς δεν αλληλεπιδρούν επαρκώς με τη στατική φάση της στήλης.

- **Παράγοντας χωρητικότητας, k**

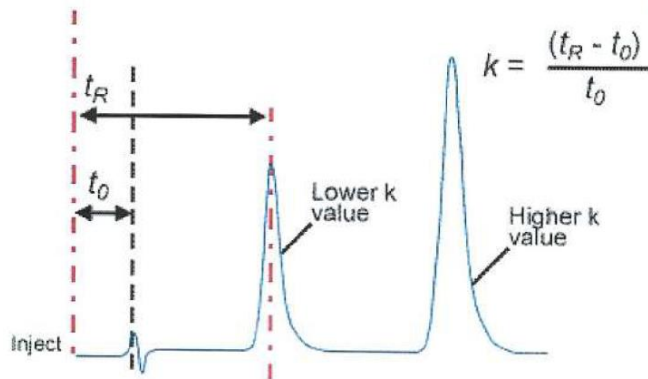
Ο συντελεστής συγκράτησης ή παράγοντας χωρητικότητας εκφράζεται μέσα από την παρακάτω σχέση (ο παράγοντας χωρητικότητας είναι καθαρός αριθμός χωρίς μονάδα):[5]

$$k = \frac{(t_R - t_0)}{t_0}$$

,όπου t_R ο χρόνος συγκράτησης της ουσίας και t_0 ο νεκρός χρόνος

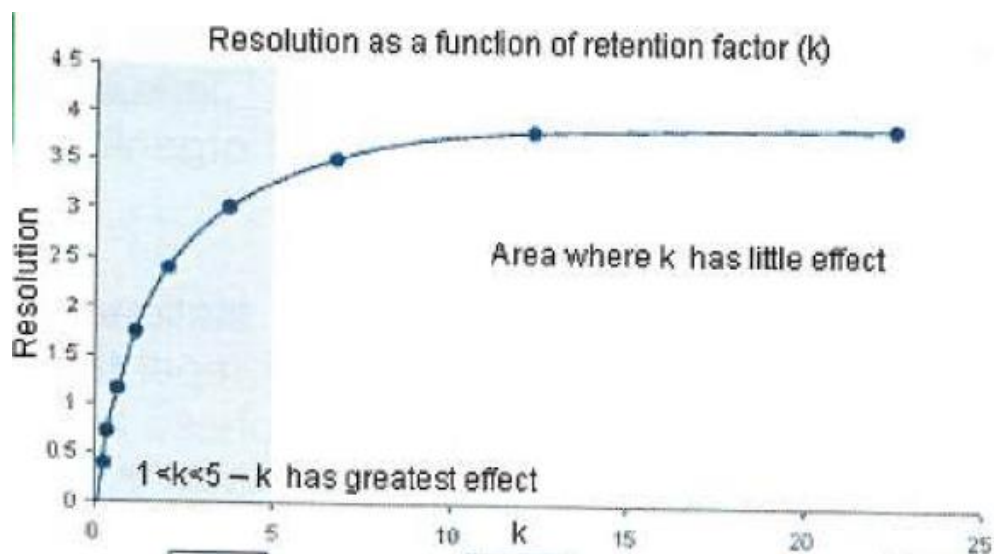
Τιμή k ίση με μηδέν υποδηλώνει ουσία που δε συγκρατείται στη στήλη, ενώ τιμή ίση με 1 ουσία που περνά ίσο χρόνο στη στατική φάση και στην κινητή φάση. Ο νεκρός όγκος στήλης σε χρωματογραφία αντιστρόφου φάσης καθορίζεται συνήθως με έγχυση μιας πολύ πολικής ένωσης όπως η ουρακίλη ή η θειουρία. Πολλές διαφορετικές μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επιβεβαίωση του πραγματικού νεκρού όγκου.

Ο παράγοντας χωρητικότητας είναι ανεξάρτητος από ορισμένους βασικούς μεταβλητούς παράγοντες όπως μικρές αλλαγές στην ταχύτητα ροής της κινητής φάσης και στις διαστάσεις των στηλών. Το παραπάνω χαρακτηριστικό του τον καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμο κατά τη σύγκριση χρωματογραφικών κορυφών προερχόμενων από διαφορετικά HPLC συστήματα.



Εικόνα 1.3: Προσδιορισμός του παράγοντα χωρητικότητας k

Αξιόπιστη ποσοτικοποίηση κορυφών επιτυγχάνεται συνήθως για τιμές k μεγαλύτερες ή ίσες του 1. Τιμή k μεταξύ 2 και 3 θεωρείται επιθυμητή εάν αυτό καθίσταται δυνατό. Τιμές k μεγαλύτερες από 10 βελτιώνουν ελάχιστα το διαχωρισμό, ενώ ταυτόχρονα αυξάνουν σημαντικά το χρόνο της ανάλυσης και καθιστούν δυσκολότερο τον εντοπισμό του αναλύτη.



Εικόνα 1.4: Συσχέτιση διαχωριστικής ικανότητας και παράγοντα χωρητικότητας

- **Εκλεκτικότητα**

Η εκλεκτικότητα ή συντελεστής διαχωρισμού, α υπολογίζεται από την αναλογία των τιμών k για γειτονικές κορυφές. Στον αριθμητή τοποθετείται πάντα ο παράγοντας χωρητικότητας της τελευταίας κορυφής (αυτή που εκλύεται αργότερα) ώστε οι τιμές α να είναι μεγαλύτερες ή ίσες του 1. Ο υπολογισμός γίνεται ως εξής: [6]

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}$$

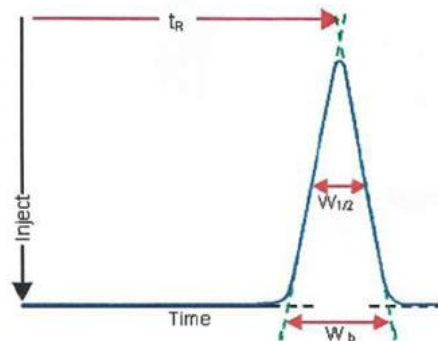
Τιμή α 1,1 θεωρείται επιθυμητή καθώς επιτρέπει την επίτευξη διαχωριστικής ικανότητας $R_s=1,5$ σε συνδυασμό με έναν αριθμό θεωρητικών πλακών της τάξης των 10000. Σε μία ανάλυση κρίσιμο ζεύγος (γειτονικών) ουσιών θεωρείται εκείνο που έχει τη μικρότερη τιμή α . Με βάση το κρίσιμο ζεύγος καθορίζεται ο ελάχιστος αριθμός θεωρητικών πλακών που απαιτούνται για το διαχωρισμό των ουσιών και κατά συνέπεια το ελάχιστο μέγεθος σωματιδίων και το μήκος της στήλης.

- **Αριθμός θεωρητικών πλακών, N ή απόδοση (αποτελεσματικότητα) της στήλης**

Η απόδοση μιας στήλης εκφράζεται συνήθως μέσα από τον αριθμό θεωρητικών πλακών, N και υπολογίζεται μέσα από τους παρακάτω τύπους:[7]

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2$$

Όπου t_r ο χρόνος συγκράτησης της ουσίας, w_b το πλάτος της κορυφής στη βάση της και $w_{1/2}$ το πλάτος της κορυφής στο μισό του ύψους της. Όταν το πλάτος κορυφής μετράται στο μισό ύψος, η σταθερά είναι 5,54, ενώ στην περίπτωση που το πλάτος κορυφής μετριέται στη βάση, πρέπει να χρησιμοποιηθεί μια σταθερά 16 για να φτάσει στην ίδια περίπου τιμή N.



Εικόνα 1.5: Προσδιορισμός των θεωρητικών πλακών N

Υπάρχουν πολλές αιτίες που μπορούν να οδηγήσουν σε μειωμένη απόδοση της στήλης. Μεταξύ των βασικότερων περιλαμβάνονται οι παρακάτω:[8]

Το είδος της ροής που δημιουργούν οι σωληνώσεις, στρωτή ή τυρβώδης: Τυρβώδης ροή μπορεί να οδηγήσει σε διεύρυνση των κορυφών, καθώς επίσης και το μήκος και η

διάμετρος των σωληνώσεων μπορούν με τη σειρά τους να επιφέρουν μειωμένο διαχωρισμό κορυφών λόγω αυξημένου νεκρού όγκου.

Η επίδραση του θαλάμου ανάμειξης: Ένας ανοιχτός σωλήνας γίνεται ένας εξαιρετικός αναμεικτής εάν το δείγμα αφιερώνει πολύ χρόνο σε αυτό το περιβάλλον. Αυτό έχει ωστόσο το ανεπιθύμητο αποτέλεσμα της μείωσης των N και της μείωσης της διαχωριστικότητας. Η επίδρασή του μπορεί να ελαχιστοποιηθεί κάνοντας συνδέσεις με κομμάτια σωληνών μικρού μήκους και μικρής εσωτερικής διαμέτρου (I.D.). Τα συστήματα διασποράς του δείγματος συχνά διαφέρουν μεταξύ συστημάτων HPLC. Έτσι ένα σύστημα μπορεί να έχει υψηλότερη απόδοση με την ίδια στήλη, επειδή έχει μια πιο αποτελεσματική (μικρότερη σε μήκος/πιο στενή) διαδρομή ροής από τον εγχυτήρα μέσω της στήλης στον ανιχνευτή.

Επίσης, οι δίνες που μπορεί να δημιουργούνται κατά τη ροή της κινητής φάσης προκαλούν αλλαγές στην εσωτερική διάμετρο, απότομες στροφές και ανωμαλίες στη διαδρομή του δείγματος μέσα στη στήλη με αποτέλεσμα μειωμένη απόδοση.

- **Συμμετρία κορυφής**

Η απόδοση της στήλης και κατά συνέπεια ο διαχωρισμός επηρεάζεται και από τη συμμετρία/ασυμμετρία των κορυφών. Η συμμετρία μιας κορυφής υπολογίζεται μέσω του παράγοντα ασυμμετρίας (A_s) ή του παράγοντα Tailing (T ή TF):[9], [10]

$$A_s = \frac{B}{A}$$

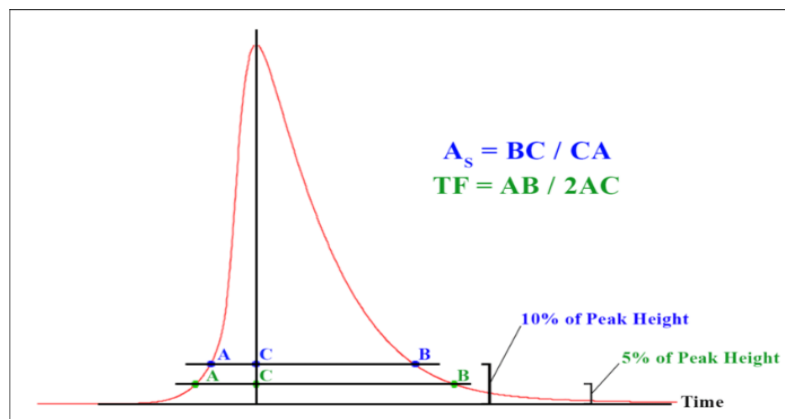
$$A_s > 1.0 = \text{Tailing}$$

$$A_s < 1.0 = \text{Fronting}$$

$$T = \frac{W_{0.05}}{2f}$$

$$T > 1.0 = \text{Tailing}$$

$$T < 1.0 = \text{Fronting}$$



Εικόνα 1.6:

Σχεδιαγραμματική απεικόνιση του υπολογισμού του παράγοντα ασυμμετρίας και του παράγοντα Tailing, πηγή: https://www.researchgate.net/figure/Calculation-for-Peak-Asymmetric-and-Tailing-Factor_fig44_336116079

Στην περίπτωση του παράγοντα ασυμμετρίας (A_s) το πλάτος της κορυφής μετράται στο 10% του ύψους της ενώ για τον παράγοντα tailing (T) στο 5% όπως φαίνεται και στο παραπάνω σχήμα.

Βελτίωση του διαχωρισμού μπορεί να επιτευχθεί τροποποιώντας μία από τις τρεις βασικές παραμέτρους της εξίσωσης διαχωρισμού (N, α , k).[1], [8], [11]–[16] [17], [18]

- **Αύξηση της αποτελεσματικότητας (N) μπορεί να επιτευχθεί μέσω των παρακάτω τροποποιήσεων:**

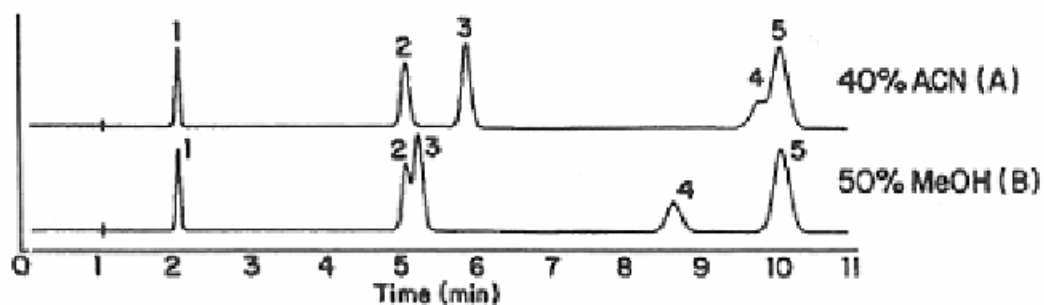
- Αύξησης του μήκους της στήλης
- Μείωσης του μεγέθους των σωματιδίων
- Μείωση της ουράς των κορυφών
- Αύξηση θερμοκρασίας (μειώνει το ιξώδες της κινητής φάσης και αυξάνει το ρυθμό διάχυσης του διαλύτη)[19]
- Μείωση του νεκρού όγκου του συστήματος

- **Αλλαγή της εκλεκτικότητας (α) μπορεί να επιτευχθεί μέσω:**

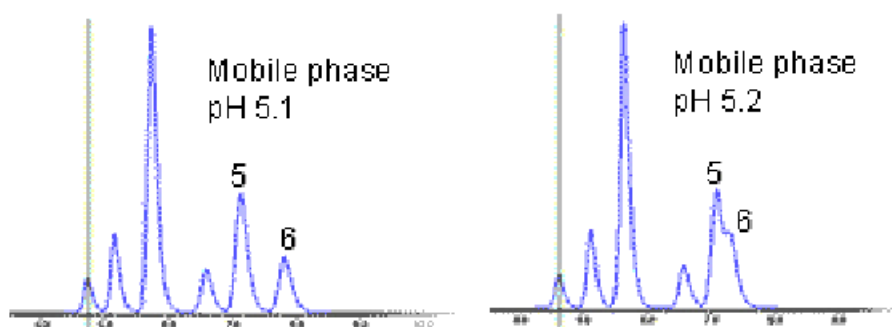
- Αλλαγής της στατικής φάσης της στήλης[20]
- Αλλαγής του pH της κινητής φάσης
- Αλλαγής διαλύτη(ών)/σύστασης κινητής φάσης

- **Αύξηση της συγκράτησης (k) μπορεί να επιτευχθεί μέσω:**

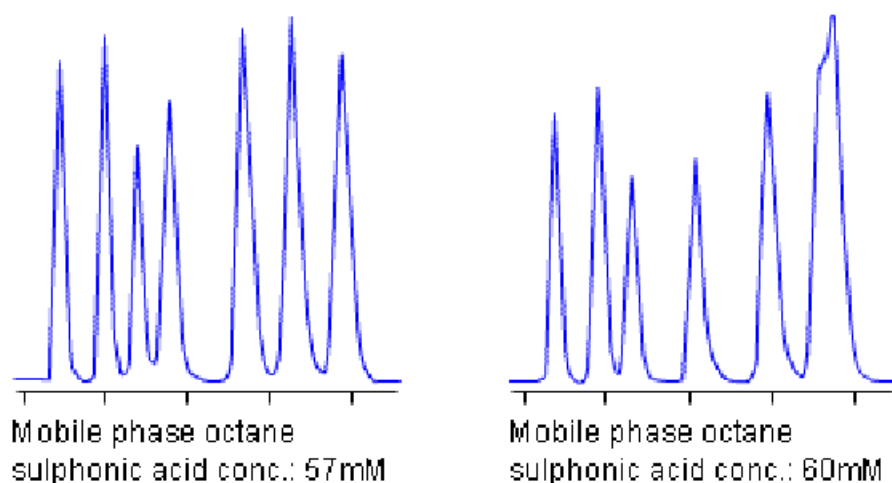
- Χρήσης ασθενέστερου διαλύτη (αλλαγή πολικότητας)
- Αλλαγής του ιονισμού (πολικότητας) της αναλυόμενης ουσίας με αλλαγή/ρύθμιση του pH
- Χρήση ισχυρότερης στατικής φάσης (αλλαγή πολικότητας)



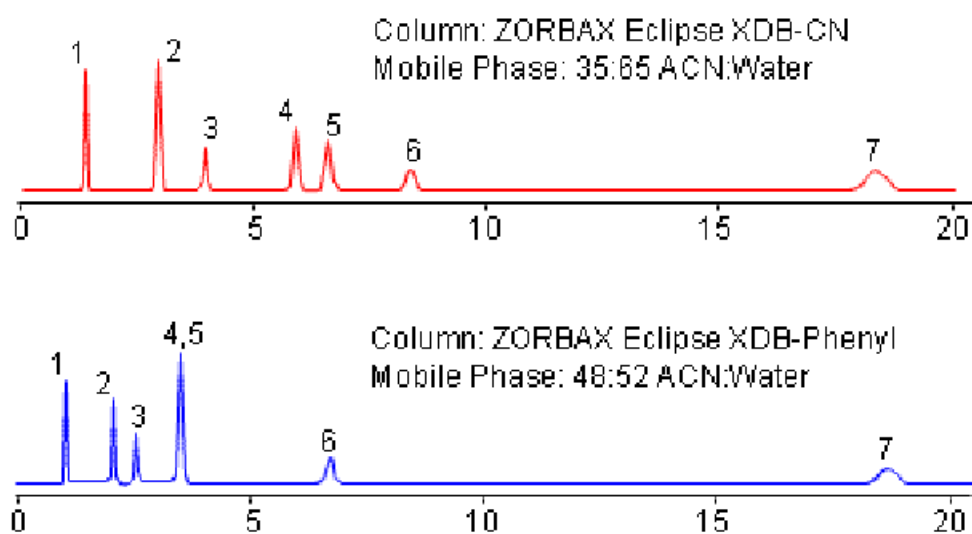
Εικόνα 1.7: Παράδειγμα επίδρασης οργανικού τροποποιητή της κινητής φάσης



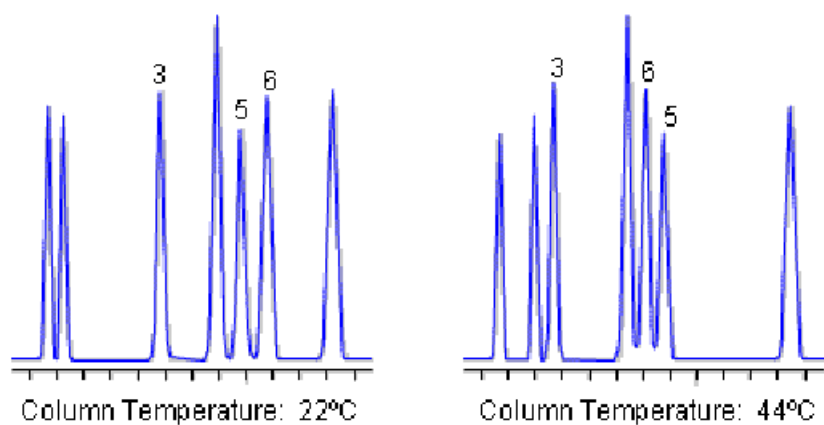
Εικόνα 1.8: Παράδειγμα επίδρασης του pH της κινητής φάσης



Εικόνα 1.9: Παράδειγμα επίδρασης της συγκέντρωσης του παράγοντα δημιουργίας ζευγών ιόντων στην HPLC αντιστρόφου φάσης

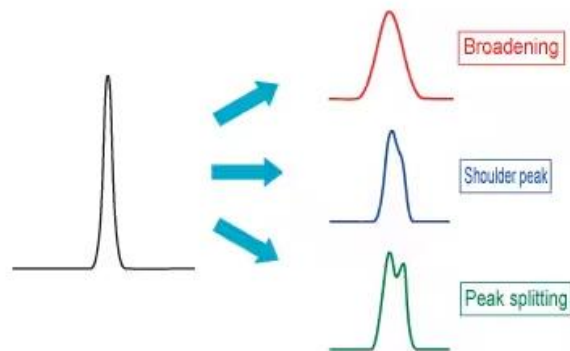


Εικόνα 1.10: Παράδειγμα επίδρασης του τύπου της στατικής φάσης

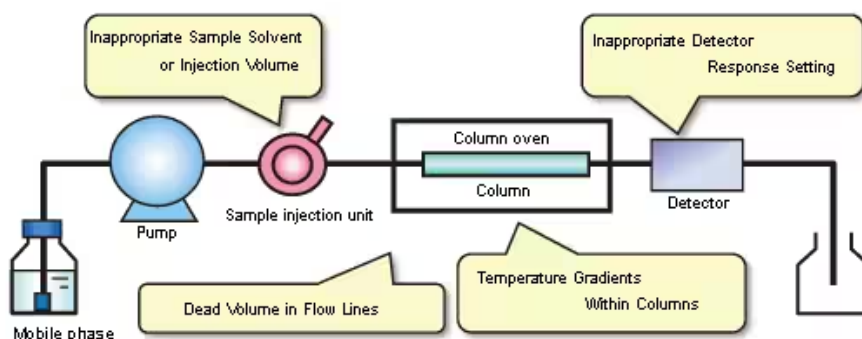


Εικόνα 1.11: Παράδειγμα επίδρασης της θερμοκρασίας της στήλης

Η εμφάνιση μη φυσιολογικών σχημάτων κορυφών μπορεί να οφείλεται σε αρκετούς διαφορετικούς παράγοντες. Ορισμένοι από αυτούς παρουσιάζονται παρακάτω:



Εικόνα 1.12: Παραδείγματα μη ομαλών σχημάτων κορυφής



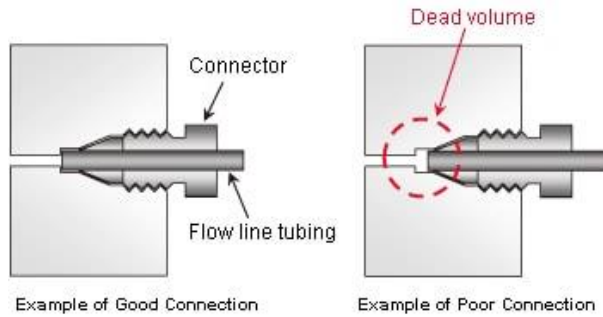
Εικόνα 1.13: Πιθανές αιτίες μη επιθυμητού σχήματος κορυφής

- **Ακατάλληλος όγκος διαλύτη ή όγκος έγχυσης δείγματος**

Αυτό αναφέρεται σε περιπτώσεις όπου εμφανίζονται μη φυσιολογικά σχήματα κορυφής μετά την αλλαγή της σύνθεσης του διαλύτη του δείγματος ή του όγκου έγχυσης, λόγω της προεργασίας ή της συγκέντρωσης της ουσίας που αναλύεται.

- **Νεκρός όγκος στις σωληνώσεις του συστήματος**

Εάν οι κορυφές διευρύνονται μετά τη χρήση διαφορετικών σωλήνων (αλλά με την ίδια εσωτερική διάμετρο), μπορεί να οφείλεται σε νεκρό όγκο στις συνδέσεις των σωλήνων (μεταξύ της μονάδας έγχυσης δείγματος, της στήλης και του ανιχνευτή) μέσω των οποίων διέρχονται τα δείγματα.



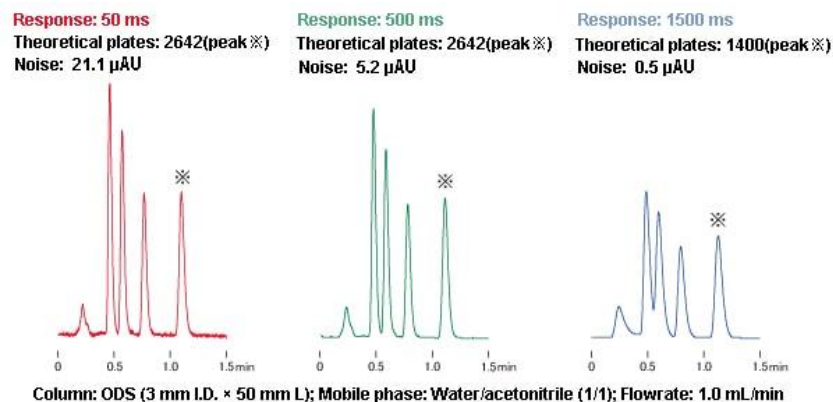
Εικόνα 1.14: Παράδειγμα σωστής (δεξιά) και μη επαρκούς σύνδεσης σωληνώσεων που οδηγεί σε δημιουργία αυξημένου νεκρού όγκου (αριστερά)

- **Διαβαθμίσεις θερμοκρασίας εντός στηλών**

Σε περιπτώσεις υψηλών ταχυτήτων ροής, υψηλών θερμοκρασιών στήλης ή στηλών με μεγάλη εσωτερική διάμετρο η κινητή φάση ρέει μέσα από τη στήλη χωρίς να θερμαίνεται επαρκώς ομοιόμορφα, με αποτέλεσμα να σχηματίζεται μια διαβάθμιση θερμοκρασίας στην κατεύθυνση της διατομής της στήλης. (Η θερμοκρασία είναι χαμηλότερη στο κέντρο της στήλης σε σχέση με τα εσωτερικά τοιχώματα της στήλης.) Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε διεύρυνση της κορυφής.

- **Ακατάλληλη ρύθμιση απόκρισης ανιχνευτή**

Γενικά, ο θόρυβος μπορεί να μειωθεί αλλάζοντας τη ρύθμιση απόκρισης του ανιχνευτή (αναφέρεται και ως σταθερά χρόνου). Μια πιο αργή ρύθμιση απόκρισης μπορεί να μειώσει τον θόρυβο, κάτι που είναι ευεργετικό για ανάλυση υψηλής ευαισθησίας, αλλά έχει επίσης ως αποτέλεσμα τη διεύρυνση της κορυφής. [21]



Εικόνα 1.15: Παραδείγματα διαφορετικής ρύθμισης της απόκρισης του ανιχνευτή

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 2^ο : Αναλυτική διαδικασία

2.1 Αναλυτικός Εξοπλισμός, Πρότυπα, Αντιδραστήρια και Αναλώσιμα

- **Πρότυπες ουσίες**

Metronidazole reference material, Sigma-Aldrich, Lot no. LRAB9725

Metronidazole Impurity A reference material, Simson, Lot no. SP-035-054

Metronidazole Impurity B reference material, Simson, Lot no. SP-036-044

Metronidazole Impurity C reference material, Simson, Lot no. SL-MKR-198-142

Metronidazole Impurity D reference material, Simson, Lot no. SP-1022-062

Metronidazole Impurity E reference material, Simson, Lot no. SL-MKR-198-008

Metronidazole Impurity F reference material, Simson, Lot no. SL-ARU-196-026

Metronidazole Impurity G reference material, Simson, Lot no. SL-VSR-188-144

- **Αντιδραστήρια**

Πίνακας 2.1: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν

Όνομα αντιδραστηρίου	Καθαρότητα/βαθμός	Cas No
Άνυδρο υπερχλωρικό νάτριο	Αναλυτικό	7601-89-0
Υπερχλωρικό οξύ	Αναλυτικό, 70%	7601-90-3
Μεθανόλη	Αναλυτικό	67-56-1
Ακετονιτρίλιο	Αναλυτικό	75-05-8
Νερό	HPLC	7732-18-5

- **Αναλυτικός εξοπλισμός και Αναλώσιμα**

Πίνακας 2.2: Αναλυτικός εξοπλισμός και Αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν

Τύπος	Περιγραφή
HPLC σύστημα	SHIMADZU i-LC-2050 series
HPLC στήλη	ACE 3 C18-PFP, 150 × 4.6 mm, 3 μm, Avantor

Ζυγοί	Αναλυτικοί ζυγοί 4, 5, 6 δεκαδικών ψηφίων
Φίλτρα μεμβράνης	PVDF 0,45 μm
Φίλτρα σύριγγας	PTFE υδρόφιλα, διάμετρος: 25 mm, μέγεθος πόρων: 0,45μm

2.2 Παρασκευή διαλυμάτων

Ρυθμιστικό διάλυμα pH=3,20	Μεταφέρουμε 4,8 γραμμάρια υπερχλωρικού νατρίου σε φιάλη όγκου 1,0 λίτρου και διαλύουμε σε 900 mL νερό. Προσαρμόζουμε το pH στο 3,20 με υπερχλωρικό οξύ και συμπληρώνουμε έως τη χαραγή τον όγκο με τον ίδιο διαλύτη.
Διαλύτης	Ρυθμιστικό διάλυμα pH=3,20/ Μεθανόλη 80/20 v/v
Πυκνό πρότυπο διάλυμα μετρονιδαζόλης (500 μg/mL)	Ζυγίζουμε με ακρίβεια 10 mg του προτύπου υλικού Μετρονιδαζόλης (λαμβάνοντας υπόψη την περιεκτικότητα του υλικού αναφοράς) και το μεταφέρουμε σε ογκομετρική φιάλη των 20,0 mL. Προσθέτουμε 15 mL του διαλύτη, ανακινούμε με βόρτεξ έως ότου διαλυθεί και συμπληρώνουμε μέχρι τελικού όγκου με τον ίδιο διαλύτη.
Ενδιάμεσο πρότυπο διάλυμα μετρονιδαζόλης (20 μg/mL)	Μεταφέρουμε 2,0 mL πυκνού προτύπου διαλύματος μετρονιδαζόλης σε ογκομετρική φιάλη των 50,0 mL και διαλύουμε έως τελικού όγκου με το διαλύτη.
Διάλυμα αναφοράς μετρονιδαζόλης (0,5 μg/mL)	Μεταφέρουμε 2,5 mL ενδιάμεσου προτύπου διαλύματος μετρονιδαζόλης σε ογκομετρική φιάλη των 100,0 mL και διαλύουμε έως τελικού όγκου με το διαλύτη.
Διάλυμα δείγματος (500 μg/mL)	Ζυγίζουμε με ακρίβεια 20 δισκία ή κάψουλες Bismuth/Metronidazole/Tetracycline HCl (140/125/125) mg και υπολογίζουμε το μέσο βάρος. Στη συνέχεια, κονιοποιούμε τα δισκία ή το περιεχόμενο των καψουλών σε λεπτή σκόνη και ζυγίζουμε ποσότητα σκόνης αντίστοιχη των 50 mg μετρονιδαζόλης. Μεταφέρουμε τη σκόνη σε ογκομετρική φιάλη των 100,0 mL και προσθέτουμε 80 mL διαλύτη. Τοποθετούμε σε υπερήχους για 5 min και συμπληρώνουμε

έως τελικού όγκου με το διαλύτη. Φιλτράρουμε μέσω PTFE 0,45μm, απορρίπτοντας τα πρώτα 2 mL του διηθήματος.

Διάλυμα placebo

Ζυγίζουμε με ακρίβεια ποσότητα placebo αντίστοιχη των 50 mg μετρονιδαζόλης. Μεταφέρουμε τη σκόνη σε ογκομετρική φιάλη των 100,0 mL και προσθέτουμε 80 mL διαλύτη. Τοποθετούμε σε υπερήχους για 5 min και συμπληρώνουμε έως τελικού όγκου με το διαλύτη. Φιλτράρουμε μέσω PTFE 0,45μm, απορρίπτοντας τα πρώτα 2 mL του διηθήματος.

Κινητή φάση Α

Ρυθμιστικό διάλυμα pH=3,20/ Μεθανόλη 95/5 v/v. Αναδεύουμε καλά και φιλτράρουμε μέσω PVDF 0,45 μm.

Κινητή φάση Β

Μεθανόλη/ Ακετονιτρίλιο 50/50 v/v. Αναδεύουμε καλά και φιλτράρουμε μέσω PVDF 0,45 μm.

2.3 Οργανολογικές παράμετροι

Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης:

Πίνακας 2.3: Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης

Χρόνος (min)	Κινητή φάση Α (%)	Κινητή φάση Β (%)
0.00	100	0
12.00	100	0
25.00	90	10
33.00	82	18
33.01	20	80
37.01	20	80
37.50	100	0
47.00	100	0

Όγκος έγχυσης: 10 μL

Ταχύτητα ροής κινητής φάσης: 0,6 mL/min

Θερμοκρασία στήλης: 25 °C

Θερμοκρασία αυτόματου δειγματολήπτη: 5 °C

Συνολικός χρόνος έκλουσης: 47 min

Μήκος κύματος: 315 nm

2.4 Ακολουθία ανάλυσης

Εξισορροπούμε τη στήλη με την κινητή φάση έως ότου επιτευχθεί σταθερή γραμμή βάσης και εισάγουμε τα δείγματα με την ακόλουθη σειρά, καταγράφοντας τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα:

Πίνακας 2.4: Ακολουθία αναλυόμενων δειγμάτων και κριτήρια αποδοχής

Διαλύματα προς ανάλυση	Αριθμός ενέσεων	Κριτήρια αποδοχής/ Υπολογισμοί
Διάλυμα αναφοράς	6	<ul style="list-style-type: none">• Το %RSD του εμβαδού των κορυφών της Μετρονιδαζόλης στις έξι επαναλαμβανόμενες ενέσεις δεν πρέπει να ξεπερνά το 2,0.• Το %RSD των χρόνων κατακράτησης της Μετρονιδαζόλης στις έξι επαναλαμβανόμενες ενέσεις δεν πρέπει να ξεπερνά το 2,0.• Ο παράγοντας tailing (TF) των κορυφών της Μετρονιδαζόλης πρέπει να είναι: $0,8 \leq TF \leq 1,5$.• Οι Θεωρητικές Πλάκες δεν πρέπει να είναι λιγότερες από 2000.
Λευκό δείγμα	1	Παραβλέπουμε οποιαδήποτε κορυφή προέρχεται από το λευκό δείγμα στο χρωματογράφημα του δείγματος και στα χρωματογραφήματα του προτύπου. Οποιαδήποτε παρεμπόδιση στο χρόνο κατακράτησης των εξεταζόμενων ουσιών στο τυφλό δείγμα δεν πρέπει να υπερβαίνει το LOQ/3
Διάλυμα placebo	1	Παραβλέπουμε οποιαδήποτε κορυφή προέρχεται από το placebo δείγμα στο χρωματογράφημα του δείγματος και στα χρωματογραφήματα του προτύπου. Οποιαδήποτε παρεμπόδιση στο χρόνο κατακράτησης των εξεταζόμενων ουσιών στο placebo δείγμα δεν πρέπει να υπερβαίνει το LOQ/3
Διάλυμα δείγματος	1	Υπολογίζουμε το % περιεχόμενο της κάθε πρόσμιξης

2.5 Υπολογισμοί

Υπολογίζουμε το % περιεχόμενο της κάθε πρόσμιξης στα δισκία Bismuth/Metronidazole/Tetracycline HCl (140/125/125 mg) χρησιμοποιώντας τον παρακάτω τύπο:

$$\%Content = \frac{A_t}{A_{std}} \times \frac{W_{std} \times P \times 2 \times 2.5}{20 \times 50 \times 100} \times \frac{AW \times 100}{W_{test} \times LC} \times \frac{1}{RRF} \times 100$$

Όπου:

A_t : το εμβαδόν κορυφής της κάθε πρόσμιξης στο χρωματογράφημα του δείγματος

A_{std} : ο μέσος όρος των εμβαδών της κορυφής της μετρονιδαζόλης από τα έξι χρωματογραφήματα του διαλύματος αναφοράς

W_{std} : το βάρος του προτύπου μετρονιδαζόλης σε mg

LC : η περιεκτικότητα του δισκίου σε δραστική ουσία (125 mg)

AW : το μέσο βάρος των 20 δισκίων (mg)

P : η καθαρότητα του προτύπου υλικού αναφοράς σε δεκαδική μορφή

W_{test} : το βάρος της σκόνης που χρησιμοποιήθηκε στο δείγμα σε mg

RRF : ο παράγοντας σχετικής απόκρισης μεταξύ της μετρονιδαζόλης και της εκάστοτε πρόσμιξης

Πίνακας 2.5: Σχετικοί χρόνοι κατακράτησης και παράγοντες σχετικής απόκρισης των προσμίξεων ως προς τη μετρονιδαζόλη

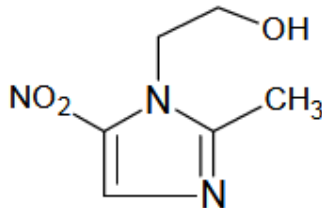
Όνομα	Σχετικός χρόνος κατακράτησης	Παράγοντας σχετικής απόκρισης
Πρόσμιξη A	0,60	1,10
Πρόσμιξη B	0,35	0,92
Πρόσμιξη C	0,42	0,67
Πρόσμιξη D	0,79	0,95
Πρόσμιξη E	0,69	0,84
Πρόσμιξη F	1,11	0,71
Πρόσμιξη G	0,28	0,81
Οποιαδήποτε άγνωστη Πρόσμιξη	-	1,00

Κεφάλαιο 3^ο : Ανάπτυξη νέας μεθόδου προσδιορισμού προσμίξεων μετρονιδαζόλης

3.1 Οι προσμίξεις της μετρονιδαζόλης

Η παρούσα έκθεση παρουσιάζει τη διαδικασία ανάπτυξης μεθόδου για τον προσδιορισμό των προσμίξεων της φαρμακολογικά δραστικής ουσίας (API) μετρονιδαζόλη στο τελικό προϊόν δισκίων Υποκιτρικού καλιούχου βισμούθιου 140 mg/ Μετρονιδαζόλης 125 mg/ Υδροχλωρικής τετρακυκλίνης 125 mg. Το συγκεκριμένο σκεύασμα με τον παραπάνω συνδυασμό δραστικών ουσιών χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του πεπτικού έλκους (δωδεκαδακτυλικό) που προκαλείται από το παθογόνο βακτήριο *Helicobacter pylori*. [22] [23], [24]

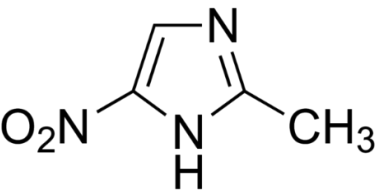
Η μετρονιδαζόλη είναι μια λευκή έως υποκίτρινη κρυσταλλική σκόνη. Η ονομασία κατά IUPAC της μετρονιδαζόλης είναι 2-μεθυλ-5-νιτροϊμιδαζολο-1-αιθανόλη, με μοριακό τύπο $C_6H_9N_3O_3$ και παρουσιάζει την ακόλουθη δομή:

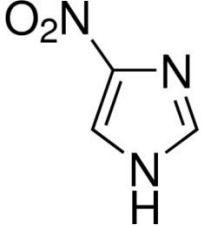
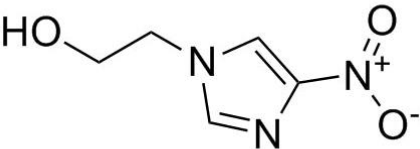
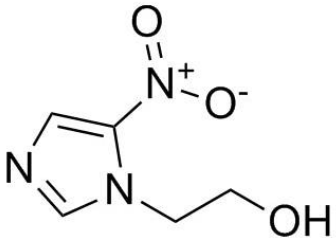
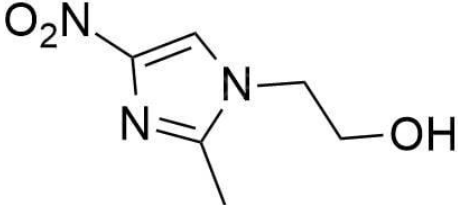
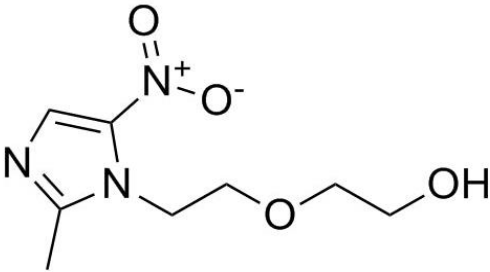
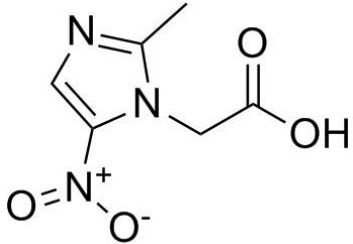


Εικόνα 3.1: Συντακτικός τύπος Μετρονιδαζόλης

Οι προσμίξεις που μελετήθηκαν κατά την ανάπτυξη της αναλυτικής μεθόδου παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.[25] Η πρόσμιξη Α, συγκεκριμένα η 2-μεθυλ-4(5)-νιτροϊμιδαζόλη είναι η μόνη πρόσμιξη που διαθέτει συγκεκριμένο όριο ως γνωστή και specified σύμφωνα με την τρέχουσα Μονογραφία της USP για δισκία Μετρονιδαζόλης.[26]

Πίνακας 3.1: Προσμίξεις μετρονιδαζόλης και προδιαγραφές αυτών

Ένωση	Συντακτικός τύπος	Προδιαγραφή(με βάση τη USP για δισκία Μετρονιδαζόλης)
Πρόσμιξη Α 2-Μεθυλ-4(5)- νιτροϊμιδαζόλη ή ένωση Α που σχετίζεται με την τινιδαζόλη (σύμφωνα με τη USP)		0,5%

<p>Πρόσμιξη Β 4-Νιτροϊμιδαζόλη</p>		<p>Unspecified 0,1%</p>
<p>Πρόσμιξη C 2-(4-Νιτρο-1H-ιμιδαζολ-1-υλ)αιθαν-1-όλη</p>		<p>Unspecified 0,1%</p>
<p>Πρόσμιξη D 2-(5-νιτρο-1H-ιμιδαζολ-1-υλ)αιθαν-1-όλη</p>		<p>Unspecified 0,1%</p>
<p>Πρόσμιξη E 2-(2-Μεθυλ-4-νιτρο-1H-ιμιδαζολ-1-υλ)αιθαν-1-όλη</p>		<p>Unspecified 0,1%</p>
<p>Πρόσμιξη F 2-(2-(2-μεθυλ-5-νιτρο-1H-ιμιδαζολ-1-υλ)αιθοξυ)αιθαν-1-όλη</p>		<p>Unspecified 0,1%</p>
<p>Πρόσμιξη G 2-(2-Μεθυλ-5-νιτρο-1H-ιμιδαζολ-1-υλ)οξικό οξύ</p>		<p>Unspecified 0,1%</p>

Ένας κατάλογος των σχετικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων των εξετασθέντων γνωστών προσμίξεων μετρονιδαζόλης παρουσιάζεται στον παρακάτω Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2: Προσμίξεις μετρονιδαζόλης και φυσικοχημικές ιδιότητες αυτών

Ένωση	CAS Number	pKa	logP	Κατάταξη πολικότητας
Πρόσμιξη A	696-23-1	Ισχυρότερο όξινο: 9,86 Ισχυρότερο βασικό : 2,15	0,512	Υψηλή
Πρόσμιξη B	3034-38-6	Ισχυρότερο όξινο: 9,25 Ισχυρότερο βασικό: 1,52	0,389	Υψηλή
Πρόσμιξη C	5006-69-9	Ισχυρότερο όξινο: 15,43 Ισχυρότερο βασικό: 1,04	-0,077	Υψηλή
Πρόσμιξη D	5006-68-8	Ισχυρότερο όξινο: 15,41 Ισχυρότερο βασικό: 2,48	-0,582	Υψηλή
Πρόσμιξη E	705-19-1	Ισχυρότερο όξινο: 15,43 Ισχυρότερο βασικό: 1,7	0,046	Υψηλή
Πρόσμιξη F	16156-94-8	Ισχυρότερο όξινο: 15,12 Ισχυρότερο βασικό: 3,03	-0,506	Υψηλή
Πρόσμιξη G	1010-93-1	Ισχυρότερο όξινο:	-0,68	Υψηλή

		4,04 Ισχυρότερο βασικό: 3,11		
--	--	------------------------------------	--	--

3.2 Αρχική χρωματογραφική μέθοδος

Μετά από σχετική έρευνα στη βιβλιογραφία[27]–[30] και στην πρότερη εμπειρία του εργαστηρίου στην ανάλυση της μετρονιδαζόλης ως σημείο εκκίνησης των πειραμάτων τέθηκε η μέθοδος HPLC για τον προσδιορισμό των προσμίξεων της μετρονιδαζόλης και της υδροχλωρικής τετρακυκλίνης σε δισκία και κάψουλες υποκιτρικού καλιούχου βισμούθιου 140 mg/ μετρονιδαζόλης 125 mg/ υδροχλωρικής τετρακυκλίνης 125 mg, που είχε αναπτυχθεί προηγουμένως από το ίδιο εργαστήριο.

Κατά τον χρωματογραφικό διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε στήλη C18 αντίστροφης φάσης η οποία χρησιμοποιήθηκε επίσης ως στατική φάση στην ανάπτυξη της παρούσας αναλυτικής μεθόδου.

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες κινητές φάσεις, καθώς και οι ίδιες χρωματογραφικές παράμετροι όπως και στην προηγούμενη μέθοδο. Οι λεπτομέρειες των χρωματογραφικών παραμέτρων που εφαρμόστηκαν στα αρχικά πειράματα περιγράφονται στον ακόλουθο Πίνακα 3.3.

Πίνακας 3.3: Χρωματογραφικές παράμετροι της αρχικής μεθόδου

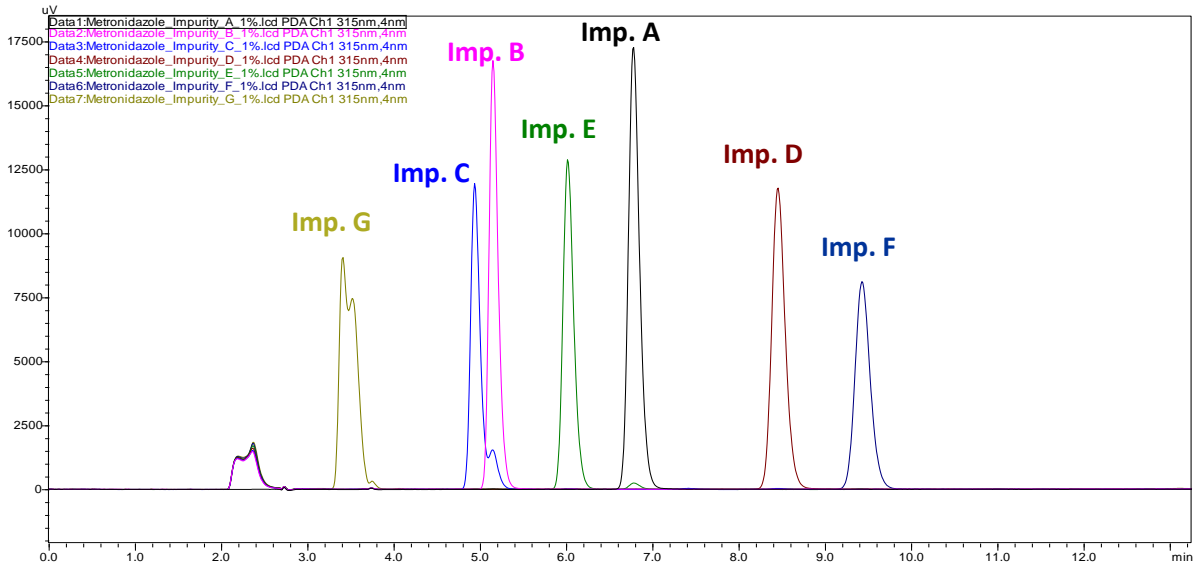
Χρωματογραφικές παράμετροι – Αρχική μέθοδος (Μέθοδος I)	
Αναλυτική στήλη	Kromasil 100-5-C18,250× 4.6 mm, 5 μm
Ρυθμιστικό διάλυμα KH₂PO₄ 10mM	Μεταφέρουμε 1,36 g δισόξινο φωσφορικό κάλιο σε ογκομετρική φιάλη 1,0 L, διαλύουμε σε νερό και αραιώνουμε έως τελικού όγκου με νερό.
Κινητή φάση A1 (MPA_1)	Ρυθμιστικό διάλυμα KH ₂ PO ₄ 10 mM/Μεθανόλη/Ακετονιτρίλιο 85/10/5 v/v/v
Κινητή φάση B	Μεθανόλη/Ακετονιτρίλιο 50/50 v/v
Διαλύτης	Ρυθμιστικό διάλυμα KH ₂ PO ₄ 10 mM/ Μεθανόλη 70/30 v/v
Συνολικός χρόνος έκλουσης	40 min
Ταχύτητα ροής κινητής φάσης	1,0 mL/min
Θερμοκρασία στήλης	25 °C
Μήκος κύματος	315 nm
Θερμοκρασία αυτόματου δειγματολήπτη	5 °C
Όγκος έγχυσης	10 μL

Πρόγραμμα/Λειτουργία α έκλουσης	Βαθμιδωτή		
	Χρόνος (min)	Κινητή φάση Α (%)	Κινητή φάση Β (%)
Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης 1	0.00	100	0
	15.00	100	0
	25.00	90	10
	26.00	20	80
	30.00	20	80
	31.00	100	0
	40.00	100	0

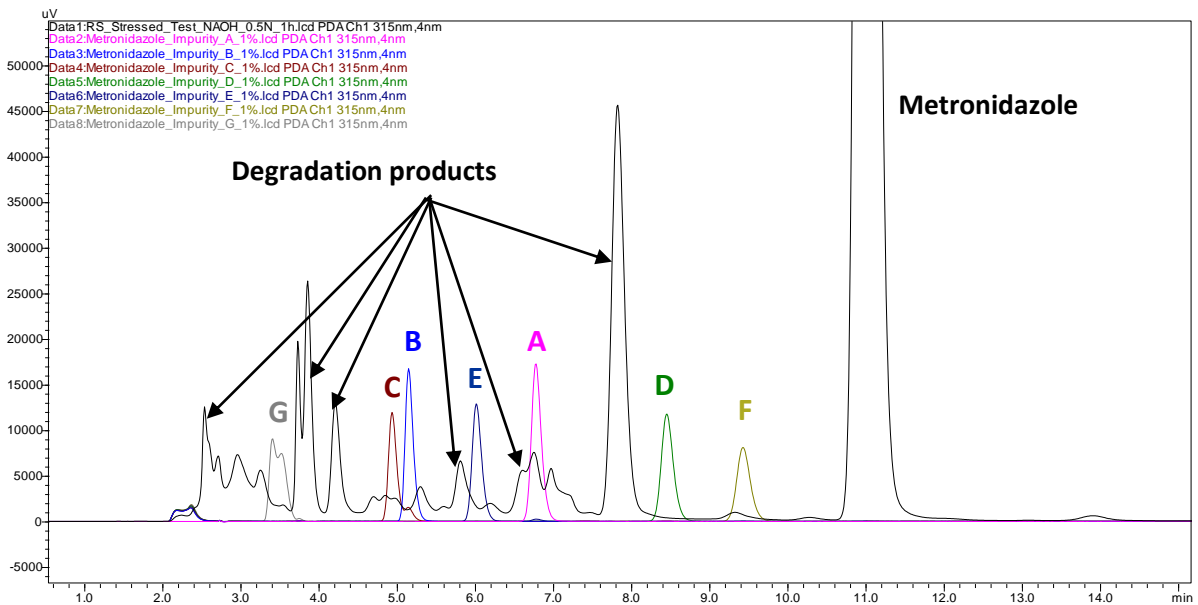
Στην παρούσα μέθοδο όπου ως μήκος κύματος ανίχνευσης ορίζονται τα 315 nm έχει ληφθεί πρόνοια ώστε οι προσμίξεις της μετρονιδαζόλης να διαχωρίζονται από την υδροχλωρική τετρακυκλίνη και τις προσμίξεις αυτής. Προκειμένου να εξεταστεί η ικανότητα της μεθόδου να προσδιορίζει τις γνωστές προσμίξεις με καλά διαχωρισμένες μεταξύ τους χρωματογραφικές κορυφές, πρότυπο διάλυμα στο 1% της συγκέντρωσης εργασίας (working concentration, WC) καθεμίας από τις επτά προσμίξεις Μετρονιδαζόλης εγχύθηκε και αναλύθηκε με τη χρωματογραφική μέθοδο που φαίνεται στον Πίνακα 3.3. Η συγκέντρωση εργασίας ορίστηκε στα 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ με βάση τη Μετρονιδαζόλη, εκτελώντας μία αραιώση από τα πυκνά διαλύματα 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (διαλύματα παρακαταθήκης) των προσμίξεων.

Στην Εικόνα 3.2, παρουσιάζεται ένα συγκριτικό χρωματογράφημα του προαναφερθέντος προτύπου διαλύματος των προσμίξεων στο 1% της συγκέντρωσης εργασίας που φανερώνει ανεπαρκή διαχωρισμό μεταξύ των κορυφών των προσμίξεων C και B. Στην Εικόνα 3.3 παρουσιάζεται ένα συγκριτικό χρωματογράφημα του προτύπου διαλύματος των προσμίξεων στο 1% της WC με ένα διάλυμα στρεσαρισμένου δείγματος σε αλκαλικές συνθήκες (0,5 N NaOH, 1 h). Το συγκεκριμένο διάλυμα 0,5 N NaOH επιλέχθηκε ως το περιβάλλον όπου παρουσιάζεται το μεγαλύτερο ποσοστό διάσπασης, όπως προέκυψε από περιορισμένα προκαταρκτικά πειράματα και θα επιβεβαιωθεί στην συνέχεια κατά τα πειράματα επιταχυνόμενης διάσπασης. Παρατηρείται μια επικάλυψη μεταξύ των προϊόντων διάσπασης και των γνωστών προσμίξεων, υποδηλώνοντας ανεπαρκή διαχωρισμό.

Ως εκ τούτου, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των χρωματογραφικών παραμέτρων προκειμένου να επιτευχθεί επαρκής χρωματογραφικός διαχωρισμός μεταξύ των προσμίξεων, ιδιαίτερα μεταξύ της καθορισμένης πρόσμιξης A και άλλων προϊόντων διάσπασης που εκλύονται σε διαδοχικούς χρόνους κατακράτησης.



Εικόνα 3.2: Συγκριτικό χρωματογράφημα των προτύπων διαλυμάτων των προσμίξεων στο 1% της συγκέντρωσης εργασίας

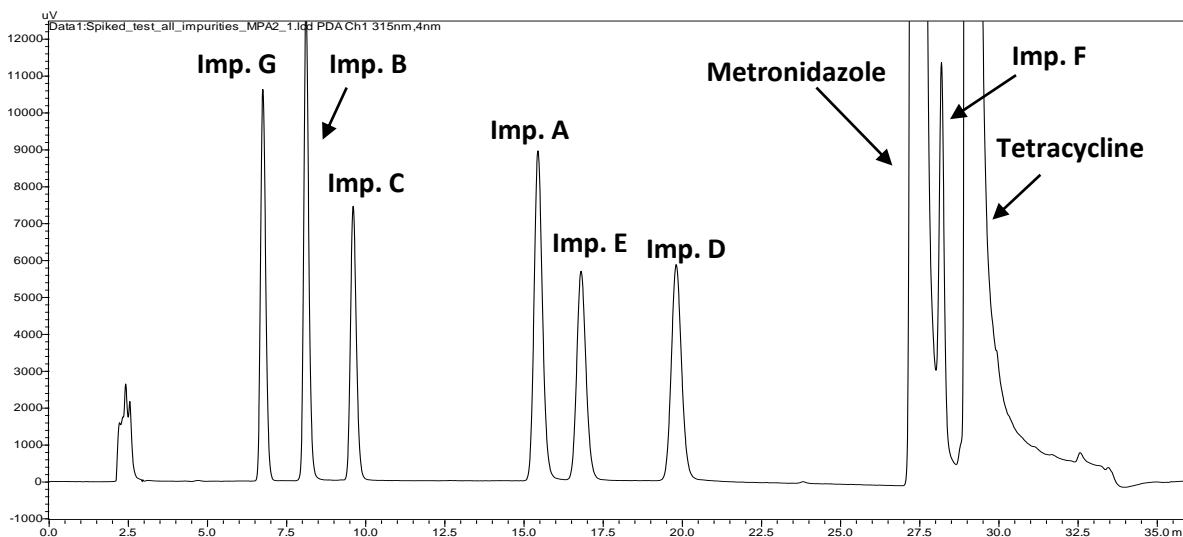


Εικόνα 3.3: Συγκριτικό χρωματογράφημα των προτύπων διαλυμάτων των προσμίξεων στο 1% της συγκέντρωσης εργασίας με ένα διάλυμα στρεσαρισμένου δείγματος σε αλκαλικές συνθήκες (0,5N NaOH, 1 ώρα)

3.2 Βελτιστοποίηση της μεθόδου

Η πρώτη τροποποίηση που εφαρμόστηκε ήταν η απομάκρυνση του ακετονιτριλίου που έχει μεγάλη εκλουστική ισχύ και η μείωση του ποσοστού της μεθανόλης στη σύνθεση της κινητής φάσης A. Στόχος ήταν η αύξηση των χρόνων κατακράτησης των κορυφών ενδιαφέροντος, καθώς και ο επαρκής διαχωρισμός μεταξύ των κρίσιμων ζευγών κορυφών.

Στην Εικόνα 3.4, παρουσιάζεται το χρωματογράφημα ενός διαλύματος δείγματος εμβολιασμένου με τις εξεταζόμενες προσμίξεις σε επίπεδο 1% της συγκέντρωσης εργασίας (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$).



Εικόνα 3.4: Χρωματογράφημα διαλύματος δείγματος εμβολιασμένου με τις εξεταζόμενες προσμίξεις σε επίπεδο 1% της συγκέντρωσης εργασίας

Πίνακας 3.4: Διαχωρισμός μεταξύ των κορυφών του παραπάνω δείγματος

Ζεύγη ενώσεων	Διαχωριστική ικανότητα R_s
Impurity G – Impurity B	4,7
Impurity B – Impurity C	4,8
Impurity C – Impurity A	14,4
Impurity A – Impurity E	2,7
Impurity E – Impurity D	5,4
Impurity D – Metronidazole	16,7
Metronidazole – Impurity F	2,7
Impurity F – Tetracycline HCl	2,4

Παρά τη σημαντική βελτίωση στις τιμές διαχωρισμού και της χρωματογραφικής εικόνας των πρώιμων εκλουόμενων προσμίξεων, ο διαχωρισμός της μετρονιδαζόλης και της πρόσμιξης F, καθώς και ο διαχωρισμός με την υδροχλωρική τετρακυκλίνη φάνηκε να είναι

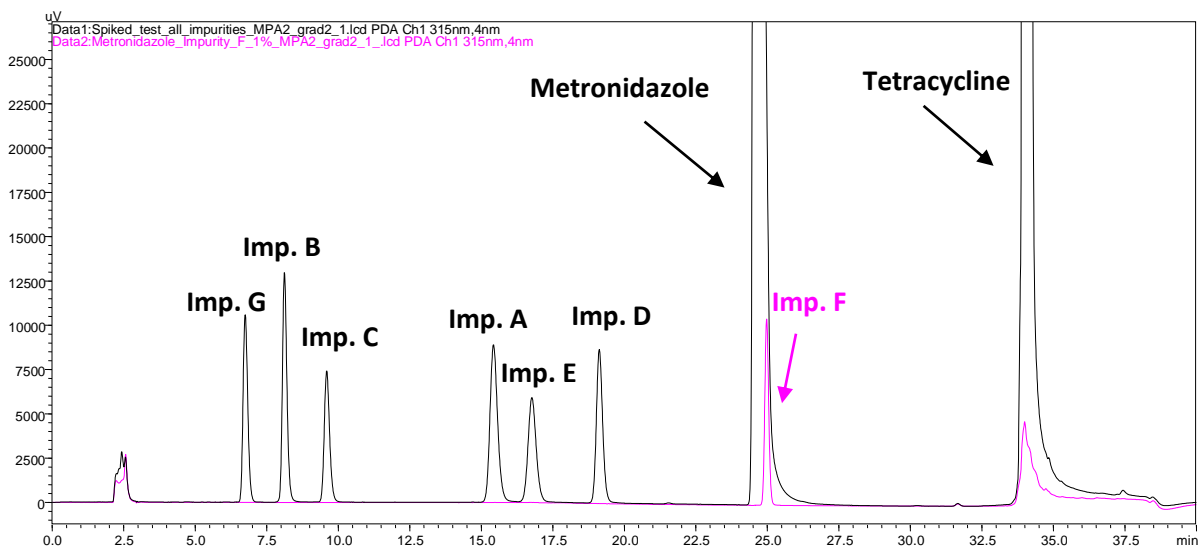
οριακός. Ως εκ τούτου, ένα νέο πρόγραμμα κλίσης αξιολογήθηκε εφαρμόζοντας τις ακόλουθες τροποποιήσεις:

- Ο ρυθμός του πρώτου βήματος κλίσης αυξήθηκε από 1% αύξηση της κινητής φάσης Β (MPB) ανά λεπτό σε 1,15% αύξηση MPB/min.
- Ένα δεύτερο στάδιο βαθμίδωσης προστέθηκε πριν από το στάδιο πλύσης, με ρυθμό 1% αύξηση MPB/min.

Πίνακας 3.5: Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης 2

Χρόνος (min)	Κινητή φάση A (%)	Κινητή φάση B (%)
0.00	100	0
12.00	100	0
25.00	85	15
30.00	80	20
31.00	20	80
35.00	20	80
36.00	100	0
45.00	100	0

Ωστόσο, το νέο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης οδήγησε σε συν-έκλουση της μετρονιδαζόλης και της πρόσμιξης F, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.5.

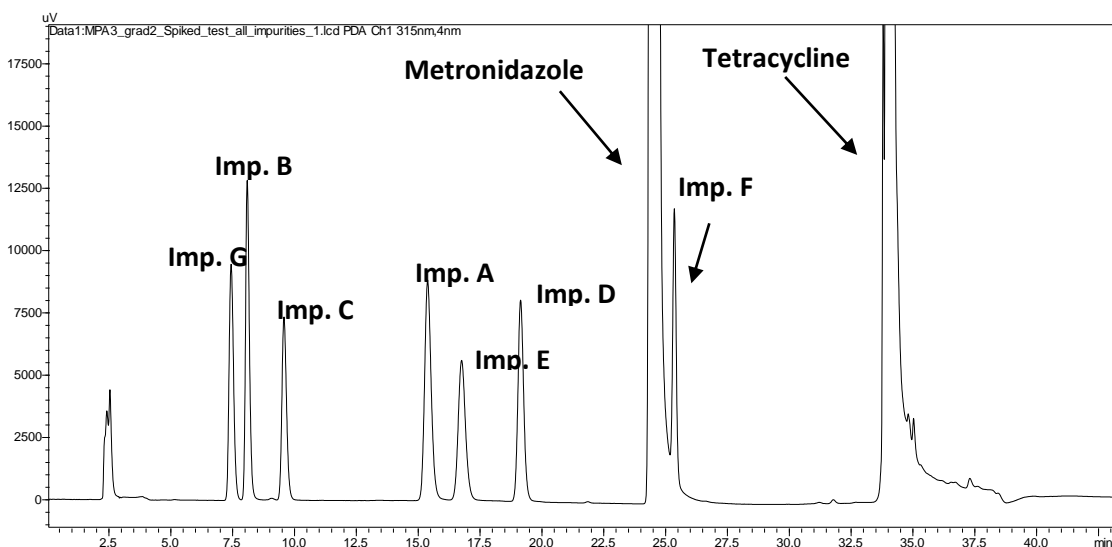


Εικόνα 3.5: Χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος με το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης 2 (μαύρο) σε σχέση με χρωματογράφημα της πρόσμιξης F (ροζ)

Η επόμενη τροποποίηση που εφαρμόστηκε προκειμένου να επιτευχθεί επαρκής χρωματογραφικός διαχωρισμός μεταξύ Μετρονιδαζόλης και πρόσμιξης F ήταν η ρύθμιση του pH της Κινητής Φάσης A στο 3,50. Ο στόχος ήταν να επιτευχθεί ένας βελτιωμένος χρωματογραφικός διαχωρισμός χρησιμοποιώντας ένα ρυθμιστικό pH που είναι λιγότερο από 2 μονάδες υψηλότερο από το pKa των ενώσεων που ενδιαφέρουν και έτσι να ληφθεί ένα χαμηλότερο ποσοστό ιοντισμένων μορίων.

Κινητή φάση A3 (MPA_3) | Ρυθμιστικό διάλυμα KH₂PO₄ 10 mM pH=3,50 /Μεθανόλη 95/5 v/v

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.6, το κρίσιμο ζεύγος κορυφών δεν διαχωρίστηκε αποτελεσματικά και επιπλέον το σύστημα οδηγήθηκε σε φτωχότερο διαχωρισμό μεταξύ των κορυφών των προσμίξεων G και B.



Εικόνα 3.6: Χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος με την κινητή φάση A3

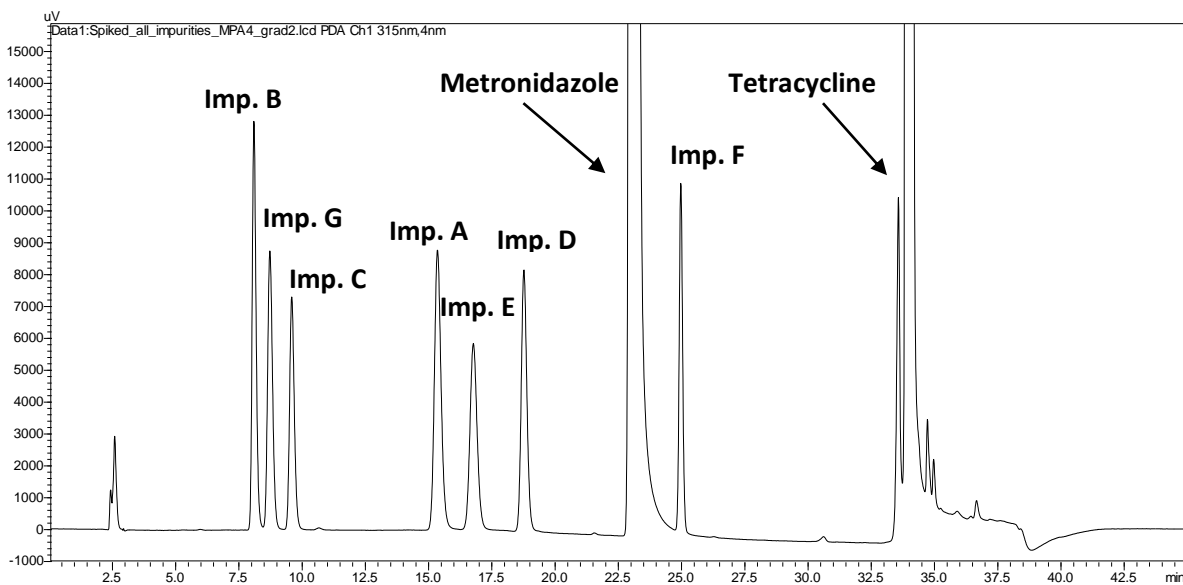
Πίνακας 3.6: Διαχωρισμός μεταξύ των κορυφών του παραπάνω δείγματος

Ζεύγη ενώσεων	Διαχωριστική ικανότητα R_s
Impurity G – Impurity B	2,1
Impurity B – Impurity C	4,8
Impurity C – Impurity A	14,3
Impurity A – Impurity E	2,7
Impurity E – Impurity D	5,0
Impurity D – Metronidazole	15,3

Τρεις διαδοχικές τροποποιήσεις εφαρμόστηκαν στο ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται στην κινητή φάση Α, σχετικά με το pH και τη συγκέντρωσή του. Πιο συγκεκριμένα, το pH του ρυθμιστικού διαλύματος αξιολογήθηκε σε χαμηλότερες τιμές, δηλαδή 3,00 και 2,00 και η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος αυξήθηκε στα 15 mM. Ο στόχος των τροποποιήσεων του pH ήταν να αξιολογηθεί η εξάρτηση των γνωστών προσμίξεων στο pH του ρυθμιστικού και οι αντίστοιχες μεταβολές στους χρόνους κατακράτησης τους. Στόχος της αυξημένης συγκέντρωσης ρυθμιστικού διαλύματος ήταν να αυξηθεί η χωρητικότητα του ρυθμιστικού διαλύματος.

Κινητή φάση A4 (MPA_4)	Ρυθμιστικό διάλυμα KH_2PO_4 10 mM pH 3.00 /Μεθανόλη 95/5 v/v
Κινητή φάση A5 (MPA_5)	Ρυθμιστικό διάλυμα KH_2PO_4 15 mM pH 3.50 /Μεθανόλη 95/5 v/v
Κινητή φάση A6 (MPA_6)	Ρυθμιστικό διάλυμα KH_2PO_4 10 mM pH 2.00 /Μεθανόλη 95/5 v/v

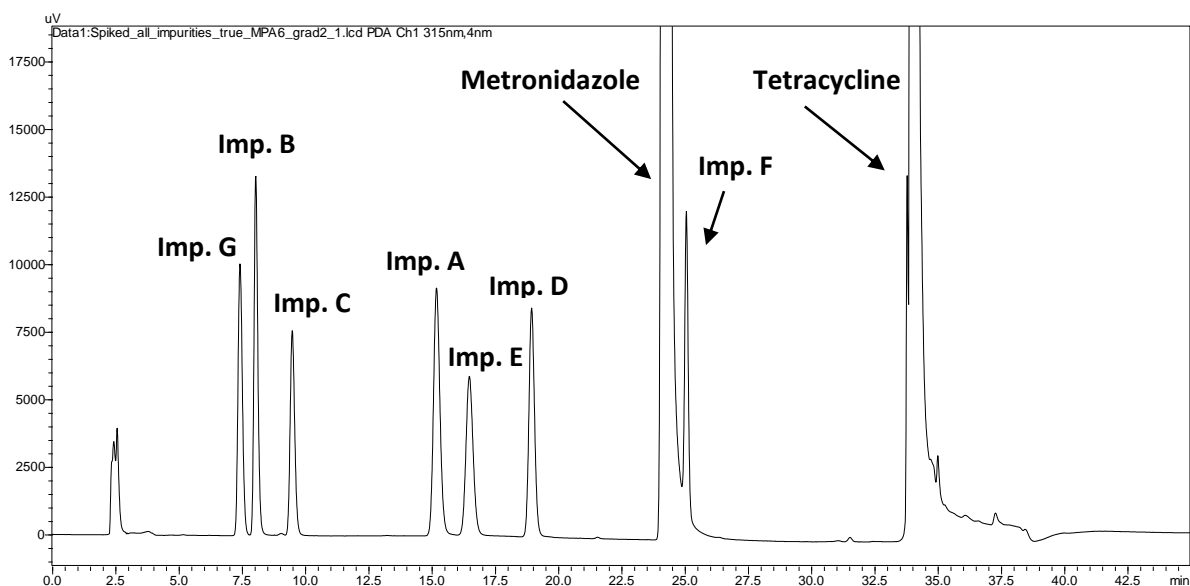
Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.7, η κορυφή της πρόσμιξης F διαχωρίστηκε πιο αποτελεσματικά από την κορυφή της Μετρονιδαζόλης. Ωστόσο, ο διαχωρισμός μεταξύ των προσμίξεων B, G και C μειώθηκε σημαντικά.



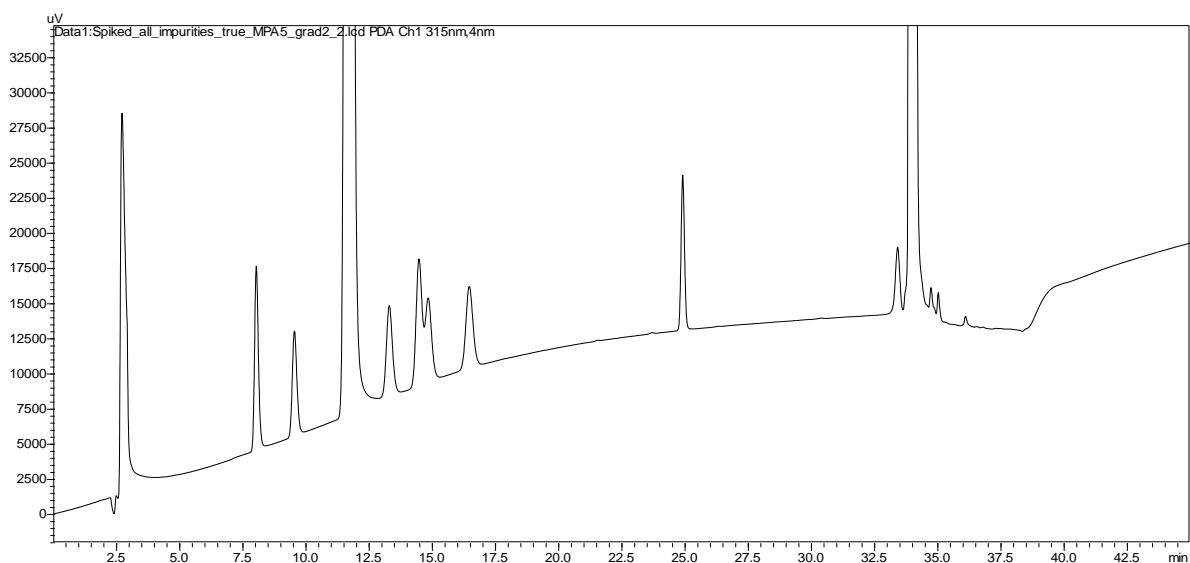
Εικόνα 3.7: Χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος με την κινητή φάση A4 (pH=3,00)

Επιπλέον, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.8, η αυξημένη συγκέντρωση άλατος στο ρυθμιστικό διάλυμα δεν είχε καμία επίδραση στη χρωματογραφία, σε σύγκριση με την MPA_3 (Ρυθμιστικό διάλυμα KH_2PO_4 10 mM pH 3,50 / Μεθανόλη: 95/5 ν/ν) και επομένως η τροποποίηση δεν εφαρμόστηκε.

Στην Εικόνα 3.9, η σημαντική μείωση του pH στο 2,00 προκάλεσε τους μειωμένους χρόνους κατακράτησης όλων των προσμίξεων, καθώς και της μετρονιδαζόλης, εκτός από την πρόσμιξη F και προκάλεσε επίσης τη συν-έκλυση ενός ζεύγους κορυφών προσμίξεων. Ως εκ τούτου, η τρέχουσα τροποποίηση απορρίφθηκε.



Εικόνα 3.8: Χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος με την κινητή φάση A5



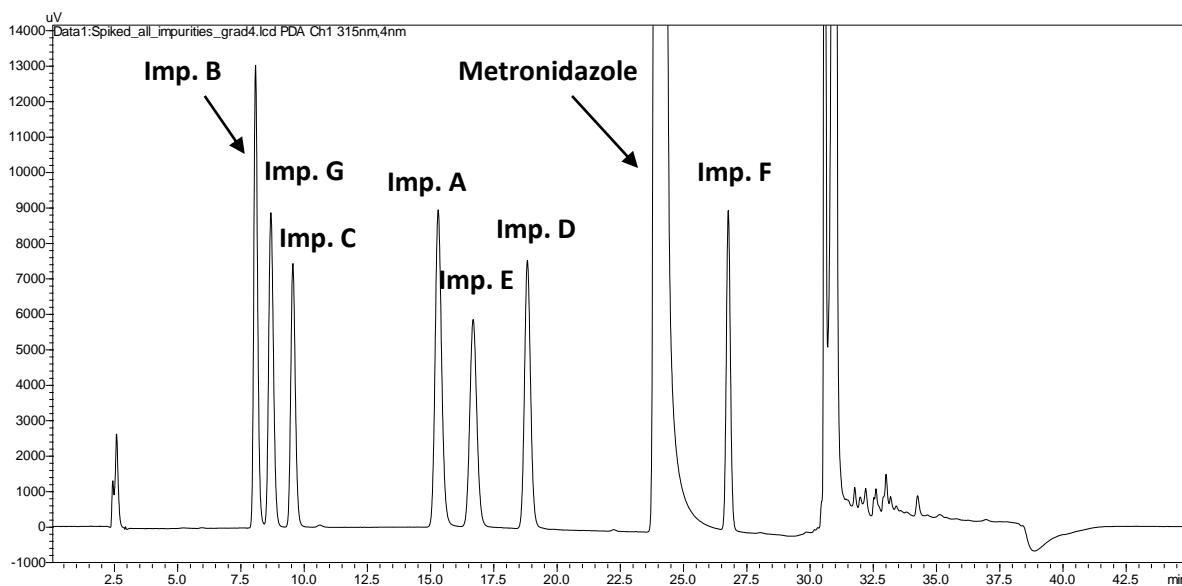
Εικόνα 3.9: Χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος με την κινητή φάση A6 (pH=2,00)

Η κινητή φάση A_4 επιλέχθηκε ως η βέλτιστη κινητή φάση και εξετάστηκε ένα νέο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης αφαιρώντας το δεύτερο βήμα βαθμίδωσης και μειώνοντας τον ρυθμό του πρώτου βήματος σε 0,77% αύξηση MPB/min. Ένα στάδιο βαθμίδωσης που προηγείται του βήματος πλύσης προστέθηκε με ρυθμό 14% αύξηση MPB/min. Ο στόχος ήταν να αυξηθούν οι χρόνοι κατακράτησης των εκλούομενων ενώσεων και να βελτιστοποιηθεί ο διαχωρισμός μεταξύ των προϊόντων αποικοδόμησης της Μετρονιδαζόλης που εκλούνται αργότερα από αυτή.

Πίνακας 3.7: Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης 3

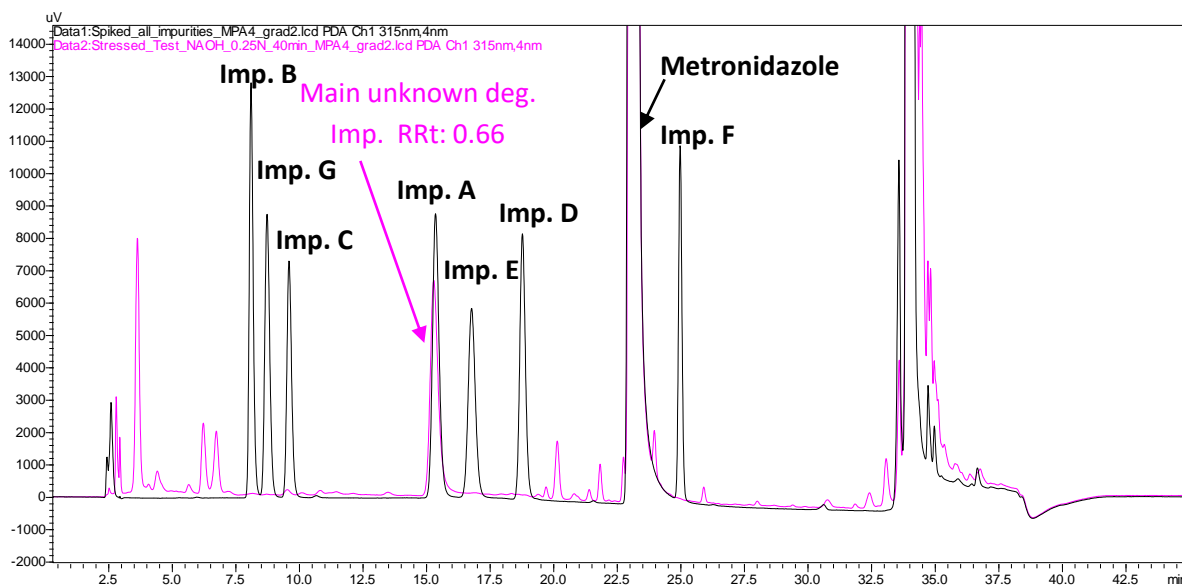
Χρόνος (min)	Κινητή φάση A (%)	Κινητή φάση B (%)
0,00	100	0
12,00	100	0
25,00	90	10
30,00	20	80
35,00	20	80
36,00	100	0
45,00	100	0

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.10, δεν υπήρξε καμία επίδραση από την τροποποίηση του προγράμματος βαθμίδωσης στον χρόνο κατακράτησης των πρώιμων εκλουόμενων προσμίξεων μετρονιδαζόλης. Ωστόσο, ο διαχωρισμός μεταξύ της μετρονιδαζόλης και της πρόσμιξης F βελτιώθηκε. Πιο συγκεκριμένα, η τιμή R αυξήθηκε από 7,0 σε 8,4.



Εικόνα 3.10: Χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος με το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης 3

Ωστόσο, ένα προϊόν αποικοδόμησης που σχηματίστηκε υπό συνθήκες αλκαλικής διάσπασης (0,25 N NaOH, 40 λεπτά) που εφαρμόστηκαν στο υπό δοκιμή προϊόν, συνεκλούστηκε με την πρόσμιξη Α. Η προαναφερθείσα παρατήρηση απεικονίζεται στην Εικόνα 3.11.



Εικόνα 3.11: Χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος με το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης 3 σε σχέση με χρωματογράφημα στρεσαρισμένου δείγματος (0,25 N NaOH, 40 λεπτά)

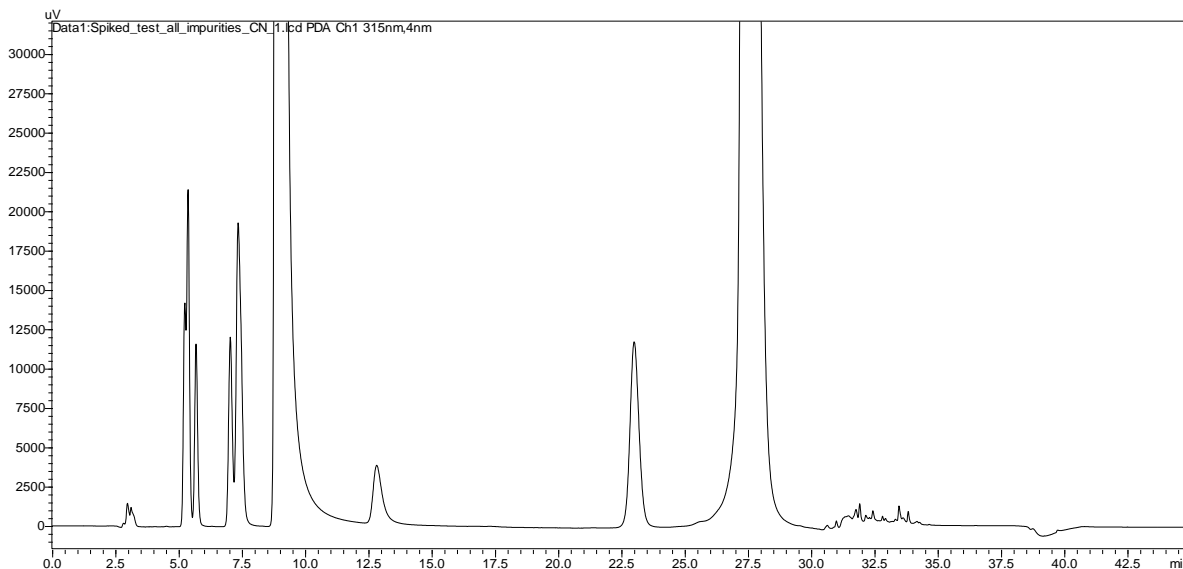
Το επόμενο βήμα ήταν η αξιολόγηση της στατικής φάσης που χρησιμοποιήθηκε στην υπό ανάπτυξη χρωματογραφική μέθοδο. Ως εκ τούτου, αξιολογήθηκαν χρωματογραφικές στήλες με διαφορετικές στατικές φάσεις προκειμένου να επιτευχθεί μια πιο επιλεκτική διατήρηση των ενώσεων συν-έκλυσης και ως εκ τούτου να οδηγήσει στον αποτελεσματικό διαχωρισμό τους. Οι στατικές φάσεις που εξετάστηκαν ήταν οι εξής:

- Χημικά συνδεδεμένη κύανο φάση σε πορώδη μικροσφαιρίδια πυριτίου υψηλής καθαρότητας (SB-CN) και
- Στατική φάση C18 συνδεδεμένη με τμήματα πενταφθοροφαινυλίου (C18-PFP).

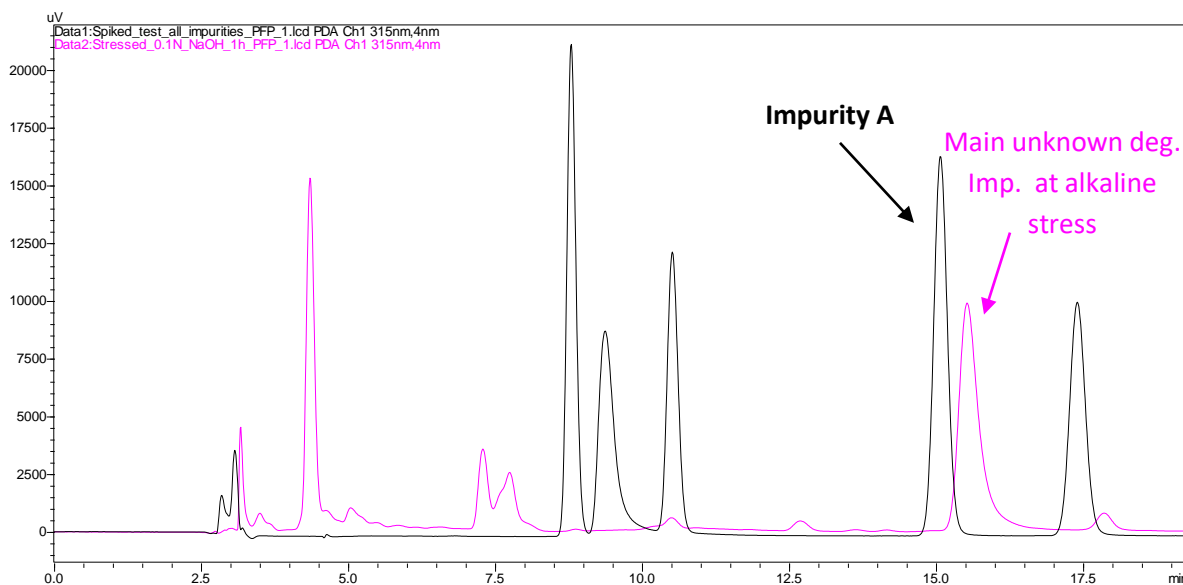
Ο ρυθμός ροής κινητής φάσης προσαρμόστηκε ανάλογα με βάση τις διαστάσεις των εξεταζόμενων χρωματογραφικών στηλών. Πιο συγκεκριμένα, για τη στήλη HPLC με στατική φάση SB-CN χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος ρυθμός ροής (1 mL/min), ενώ για τη στήλη C18-PFP ο ρυθμός ροής μειώθηκε στα 0,6 mL/min.

Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.12, η κυανοδεσμευμένη φάση πυριτίου προκάλεσε τη σημαντική μείωση των χρόνων κατακράτησης των ενώσεων που ενδιαφέρουν, καθώς και μια υποβάθμιση στο διαχωρισμό των αντίστοιχων κορυφών.

Στην Εικόνα 3.13, απεικονίζεται ο σημαντικά βελτιωμένος διαχωρισμός μεταξύ του κρίσιμου ζεύγους κορυφών (πρόσμιξη A και κύριο προϊόν αποικοδόμησης υπό αλκαλικές συνθήκες) που ελήφθη με τη χρήση της χρωματογραφικής στήλης C18-PFP.



Εικόνα 3.12: Χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος με στατική φάση (SB-CN)



Εικόνα 3.13: Χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος με στατική φάση (C18-PFP)

Επιλέχθηκε τελικά η στατική φάση C18-PFP, καθώς προσέφερε το βέλτιστο διαχωρισμό σε σύγκριση με τις άλλες δύο στατικές φάσεις που εξετάστηκαν.

Ωστόσο, προκειμένου να βελτιωθεί περαιτέρω ο διαχωρισμός μεταξύ της πρόσμιξης A και του κύριου άγνωστου προϊόντος αποικοδόμησης που προκύπτει υπό συνθήκες αλκαλικής

διάσπασης, η φύση του ρυθμιστικού που χρησιμοποιήθηκε στην Κινητή Φάση Α άλλαξε. Το υπερχλωρικό ρυθμιστικό διάλυμα εξετάστηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και τιμές pH, καθώς το υπερχλωρικό ανιόν μπορεί να επιδείξει πιο αποτελεσματικό αποτέλεσμα στη δημιουργία ζευγών ιόντων από το φωσφορικό ανιόν.

Αρχικά, το ρυθμιστικό διάλυμα υπερχλωρικού ρυθμίστηκε σε pH 3,0 και χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή Κινητής Φάσης Α όπως περιγράφεται παρακάτω:

Ρυθμιστικό διάλυμα υπερχλωρικού 39,2 mM, pH 3,00	Μεταφέρουμε 4,8 g υπερχλωρικού νατρίου σε ογκομετρική φιάλη 1,0 L και διαλύουμε με 900 mL νερό. Ρυθμίζουμε το pH στο 3,00 με υπερχλωρικό οξύ και αραιώνουμε έως τελικού όγκου με τον ίδιο διαλύτη.
Κινητή φάση A7 (MPA_7)	Ρυθμιστικό διάλυμα pH 3,00/Μεθανόλη 95/5 v/v

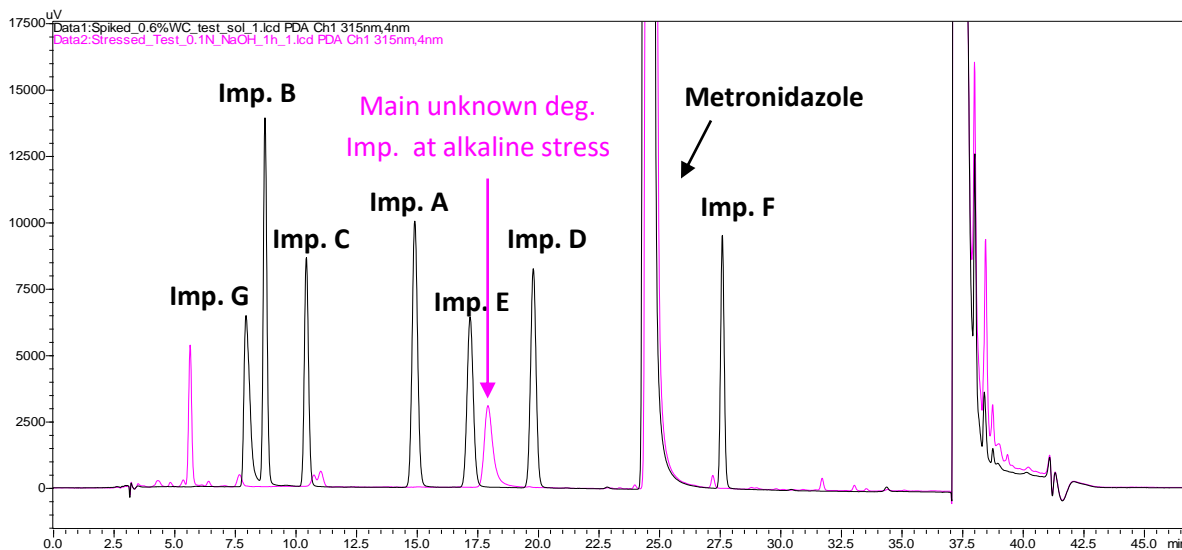
Ταυτόχρονα χρησιμοποιήθηκε ένα νέο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης (Gradient program 4), προσθέτοντας ένα επιπλέον βήμα κλίσης πριν από το στάδιο της πλύσης, με αυξανόμενο ποσοστό της κινητής φάσης Β 1% ανά λεπτό και αφαιρώντας πλήρως το βήμα κλίσης που επαναφέρει το σύστημα στις αρχικές συνθήκες μετά το στάδιο πλύσης. Ο στόχος ήταν να επεκταθεί το πρόγραμμα βαθμίδωσης προκειμένου να αποφευχθεί η συνέκλουση, καθώς και να αυξηθεί ο διαχωρισμός μεταξύ των κορυφών των προϊόντων αποικοδόμησης της Μετρονιδαζόλης που εκκλύονται μετά από αυτή και των προϊόντων αποικοδόμησης της τετρακυκλίνης HCl που εκκλύονται πριν από την τετρακυκλίνη.

Πίνακας 3.7: Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης 4

Χρόνος (min)	Κινητή φάση Α (%)	Κινητή φάση Β (%)
0,00	100	0
12,00	100	0
25,00	90	10
33,00	82	18
33,01	20	80
37,01	20	80
37,50	100	0
47,00	100	0

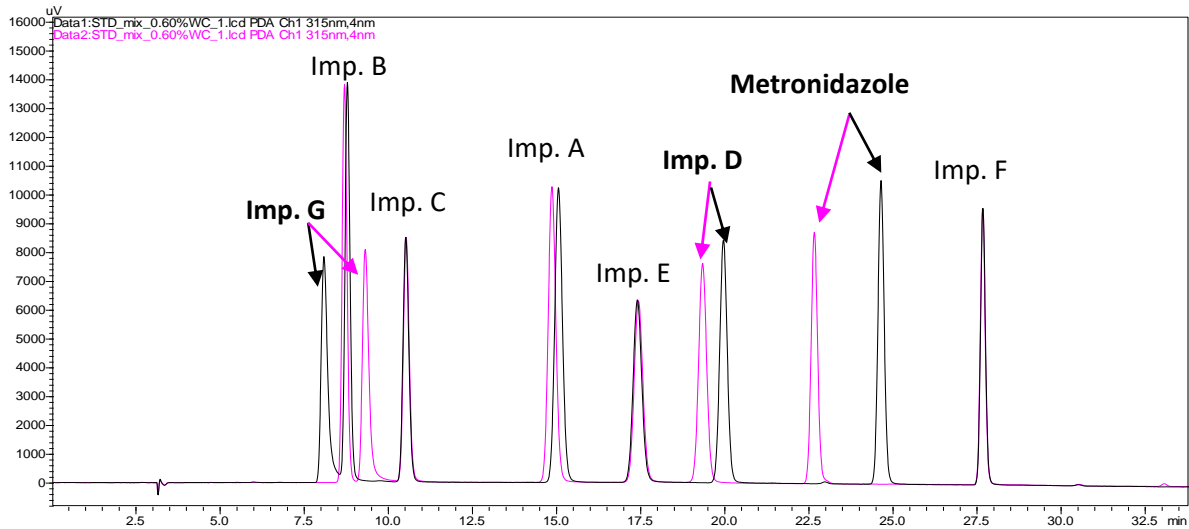
Στην Εικόνα 3.14, παρουσιάζεται μια επικάλυψη των χρωματογραφημάτων του εμβολιασμένου διαλύματος με όλες τις γνωστές προσμίξεις στο 0,6% της συγκέντρωσης εργασίας και του στρεσαρισμένου διαλύματος υπό αλκαλικές συνθήκες (NaOH 0,1 N, 1 h). Όπως φαίνεται, το κύριο προϊόν αποικοδόμησης του στρεσαρισμένου διαλύματος υπό

αλκαλικές συνθήκες NaOH διαχωρίζεται πλήρως από την Πρόσμιξη A, που είναι η μόνη γνωστή και specified πρόσμιξη και επίσης, παρέχεται επαρκής διαχωρισμός μεταξύ των κορυφών όλων των γνωστών προσμίξεων, καθώς και της Μετρονιδαζόλης.



Εικόνα 3.14: Χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος σε σχέση με στρεσαρισμένο δείγμα υπό αλκαλικές συνθήκες με την κινητή φάση A7 και το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης 4

Ως εκ τούτου, η κινητή φάση A_7 επιλέχθηκε ως η βέλτιστη κινητή φάση για να προχωρήσει η αξιολόγηση της μεθόδου που αναπτύχθηκε. Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι ορισμένες ενώσεις, συμπεριλαμβανομένης της πρόσμιξης G, της πρόσμιξης D και της μετρονιδαζόλης εξαρτώνται έντονα από το pH του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή της Κινητής Φάσης A, καθώς το προσαρμοσμένο pH ήταν πολύ κοντά στο ισχυρότερο βασικό pKa αυτών των ενώσεων (ανατρέξτε στην παράγραφο 3.1). Η προαναφερθείσα παρατήρηση έγινε μετά την παρασκευή ενός ρυθμιστικού διαλύματος με pH που δεν ρυθμίστηκε με ακρίβεια στο 3,00 και το αποτέλεσμα είναι εμφανές στην Εικόνα 3.15.

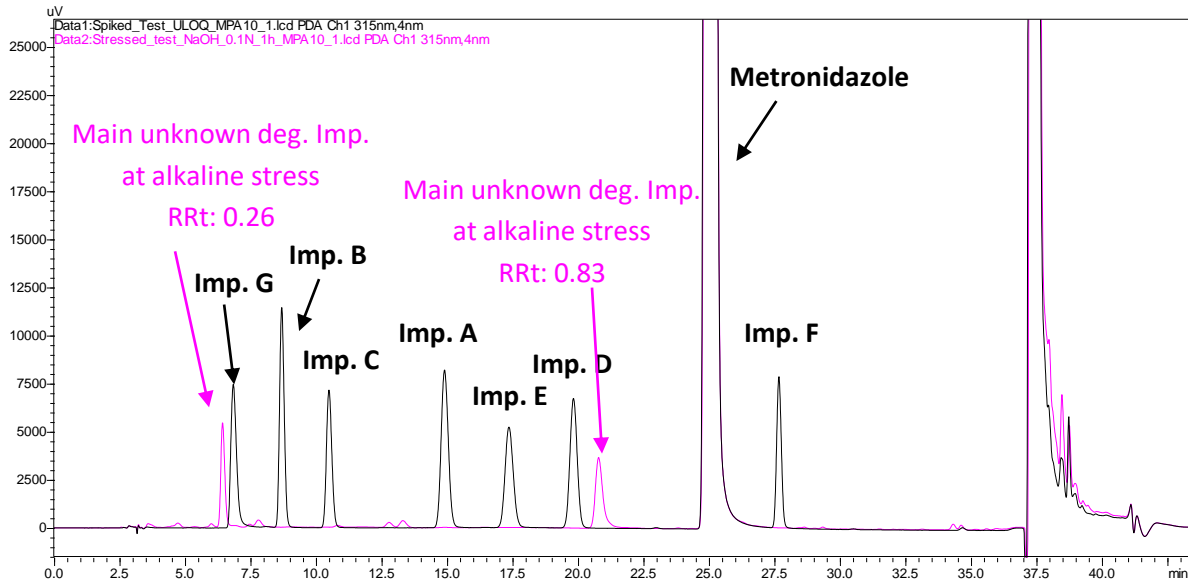


Εικόνα 3.15: Χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος με μη ακριβή ρύθμιση pH (ροζ) σε σχέση με ακριβές pH=3,0 κινητής φάσης (μαύρο)

Η τελική εφαρμοζόμενη τροποποίηση ήταν η προσαρμογή του pH ρυθμιστικού διαλύματος υπερχλωρικών σε 3,2 προκειμένου να υπάρχει διαφορά τουλάχιστον 0,1 από τις κρίσιμες τιμές pKa των εξαρτώμενων από το pH ενώσεων (δηλαδή Πρόσμειξη G και Μετρονιδαζόλη).

Ρυθμιστικό διάλυμα υπερχλωρικού 39,2 mM, pH 3,20	Μεταφέρουμε 4,8 g υπερχλωρικού νατρίου σε ογκομετρική φιάλη 1,0 L και διαλύουμε με 900 mL νερό. Ρυθμίζουμε το pH στο 3,20 με υπερχλωρικό οξύ και αραιώνουμε έως τελικού όγκου με τον ίδιο διαλύτη.
Κινητή φάση A8 (MPA_8)	Ρυθμιστικό διάλυμα pH 3,20/Μεθανόλη 95/5 v/v

Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.16, ο διαχωρισμός μεταξύ όλων των προσμίξεων και της Μετρονιδαζόλης, καθώς και με τα κύρια προϊόντα αποικοδόμησης που προκύπτουν από την αλκαλική διάσπαση του προϊόντος ήταν επαρκής και επομένως η Κινητή Φάση A_8 ήταν η τελική επιλεγμένη Κινητή Φάση για την αναπτυγμένη μέθοδο.



Εικόνα 3.16: Χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος σε σχέση με στρεσαρισμένο δείγμα υπό αλκαλικές συνθήκες με την κινητή φάση A8

Το συμπέρασμα που προέκυψε από την ανάπτυξη της μεθόδου προσδιορισμού ουσιών που σχετίζονται με τη μετρονιδαζόλη ήταν ότι οι κρίσιμοι παράγοντες για την επιλογή των καταλληλότερων χρωματογραφικών παραμέτρων ήταν οι ακόλουθοι:

- Ο επαρκής διαχωρισμός μεταξύ της μετρονιδαζόλης και όλων των γνωστών προσμίξεων
- Ο επαρκής διαχωρισμός μεταξύ όλων των γνωστών προσμίξεων
- Ο επαρκής διαχωρισμός μεταξύ άγνωστων προϊόντων διάσπασης και καθορισμένης πρόσμιξης A.

3.3 Χρωματογραφικές παράμετροι – Τελική μέθοδος (Μέθοδος III)

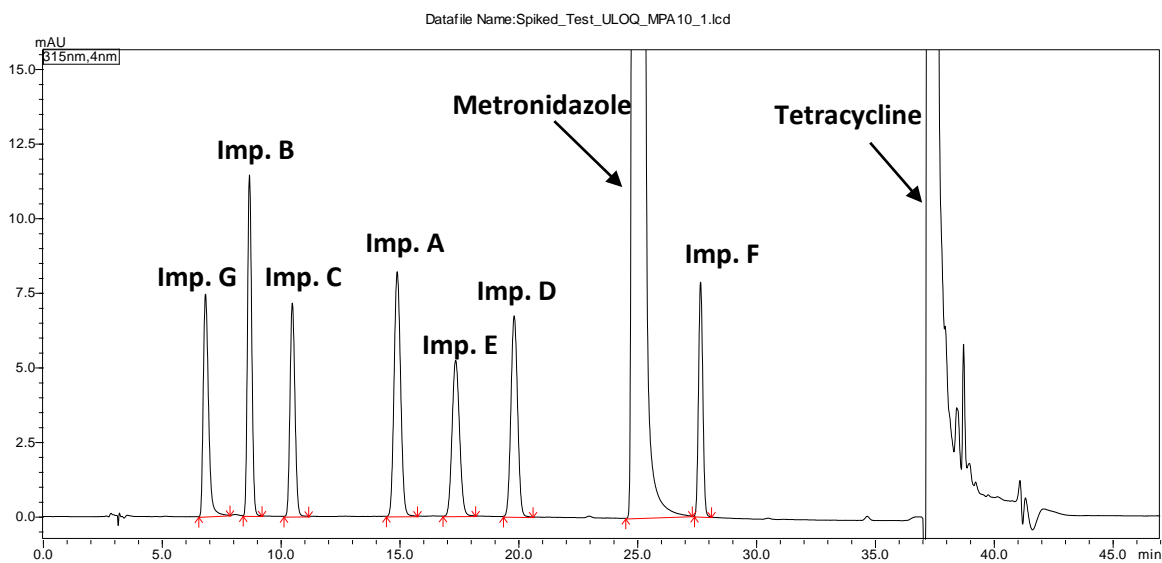
Στον παρακάτω Πίνακα 3.8 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι χρωματογραφικές και οργανολογικές παράμετροι της τελικής ανεπτυγμένης μεθόδου:

Πίνακας 3.8: Τελικές συνθήκες μεθόδου

Αναλυτική στήλη	ACE 3 C18-PFP, 150 × 4.6 mm, 3 μm
Ρυθμιστικό διάλυμα υπερχλωρικού 39,2 mM, pH 3,20	Μεταφέρουμε 4,8 g υπερχλωρικού νατρίου σε ογκομετρική φιάλη 1,0 L και διαλύουμε με 900 mL νερό. Ρυθμίζουμε το pH στο 3,20 με

	υπερχλωρικό οξύ και αραιώνουμε έως τελικού όγκου με τον ίδιο διαλύτη.		
Κινητή φάση A (MPA)	Ρυθμιστικό διάλυμα pH 3,20/Μεθανόλη 95/5 v/v		
Κινητή φάση B	Μεθανόλη/Ακετονιτρίλιο 50/50 v/v		
Διαλύτης	Ρυθμιστικό διάλυμα υπερχλωρικού 39,2 mM, pH 3,20/ Μεθανόλη 80/20 v/v		
Συνολικός χρόνος έκλουσης	47,00 min		
Ταχύτητα ροής κινητής φάσης	0,6 mL/min		
Θερμοκρασία στήλης	25 °C		
Μήκος κύματος	315 nm		
Θερμοκρασία αυτόματου δειγματολήπτη	5 °C		
Όγκος έγχυσης	10 µL		
Πρόγραμμα/λειτουργία έκλουσης	Βαθμιδωτή		
Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης	Χρόνος (min)	Κινητή φάση A (%)	Κινητή φάση B (%)
	0,00	100	0
	12,00	100	0
	25,00	90	10
	33,00	82	18
	33,01	20	80
	37,01	20	80
	37,50	100	0
	47,00	100	0

Στην παρακάτω Εικόνα 3.17, παρουσιάζεται το χρωματογράφημα ενός εμβολιασμένου διαλύματος δείγματος με τις εξεταζόμενες προσμίξεις σε επίπεδο 0,6% της συγκέντρωσης εργασίας.



Εικόνα 3.17: Χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος με όλες τις γνωστές προσμίξεις στο 0,6% της συγκέντρωσης εργασίας

Τα χρωματογραφικά χαρακτηριστικά της τελικής βελτιστοποιημένης μεθόδου συνοψίζονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 3.9: Χρόνος κατακράτησης και καθαρότητα κορυφής μετρονιδαζόλης

Ένωση	Χρόνος κατακράτησης (t_r) σε min	Καθαρότητα κορυφής
Μετρονιδαζόλη	24,938	1,000

Πίνακας 3.10: Διαχωρισμός μεταξύ των κορυφών του παραπάνω χρωματογραφήματος

Ζεύγη ενώσεων	Διαχωριστική ικανότητα R_s
Impurity G – Impurity B	5,1
Impurity B – Impurity C	5,1
Impurity C – Impurity A	9,9
Impurity A – Impurity E	4,5
Impurity E – Impurity D	4,5
Impurity D – Metronidazole	11,9
Metronidazole – Impurity F	7,7

Κεφάλαιο 4^ο : Πειράματα επιταχυνόμενης διάσπασης

4.1 Πειράματα επιταχυνόμενης διάσπασης-Διατήρηση μάζας

Προκειμένου να εξεταστεί η καταλληλότητα της μεθόδου ως προς την ειδικότητα αλλά και τη διακριτική της ικανότητα στην περίπτωση που είναι ταυτόχρονα παρόντα γνωστά και άγνωστα προϊόντα διάσπασης, τελικό προϊόν αλλά και δείγμα placebo ως προς μετρονιδαζόλη αποθηκεύτηκαν κάτω από τις παρούσες συνθήκες:[17], [31]–[39]

Θερμική διάσπαση: Φούρνος 80 °C / 1 ημέρα

Φωτοδιάσπαση: Έκθεση UV / 1 ημέρα

Όξινη υδρόλυση: HCl 1 N / 2 h

Αλκαλική υδρόλυση: NaOH 0,1 N / 1 h

Οξειδωτική διάσπαση: H₂O₂ 0,5% / 1 h

Τα παρασκευασθέντα δείγματα αναλύθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό της Μετρονιδαζόλης χρησιμοποιώντας την υπάρχουσα αναπτυγμένη μέθοδο και για τον έλεγχο των προσμίξεων την τελική βελτιστοποιημένη μέθοδο. Λεπτομέρειες των χρωματογραφικών παραμέτρων της τελικής μεθόδου περιλαμβάνονται στον Πίνακα 3.8.

Το ισοζύγιο μάζας υπολογίστηκε με βάση την παρακάτω εξίσωση:

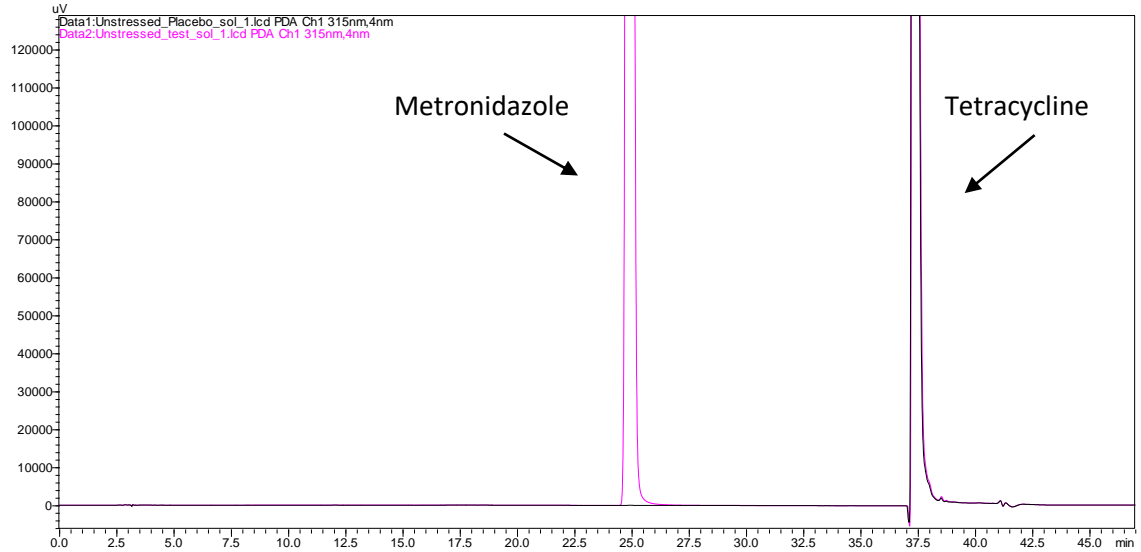
$$\text{Ισοζύγιο μάζας} = \frac{\text{Συνολικό \% Περιεχόμενο Επιβαρυνθέντος δείγματος}}{\text{Συνολικό \% Περιεχόμενο Μη Επεξεργασμένου δείγματος}} \times 100$$

Όπου:

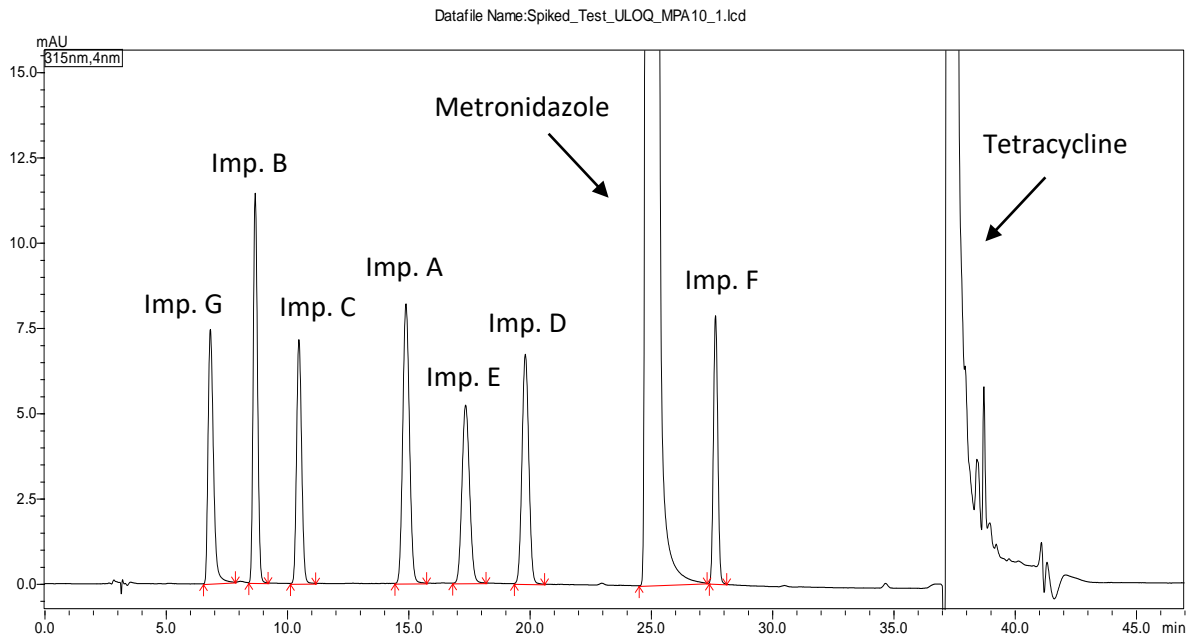
Συνολικό % Περιεχόμενο Μη Επεξεργασμένου δείγματος: Το άθροισμα του % Περιεχομένου της Μετρονιδαζόλης και του % Περιεχομένου των προσμίξεων της Μετρονιδαζόλης στο μη επεξεργασμένο δείγμα

Συνολικό % Περιεχόμενο Επιβαρυνθέντος δείγματος: Το άθροισμα του % Περιεχομένου της Μετρονιδαζόλης και του % Περιεχομένου των προσμίξεων της Μετρονιδαζόλης στο επιβαρυνθέν δείγμα

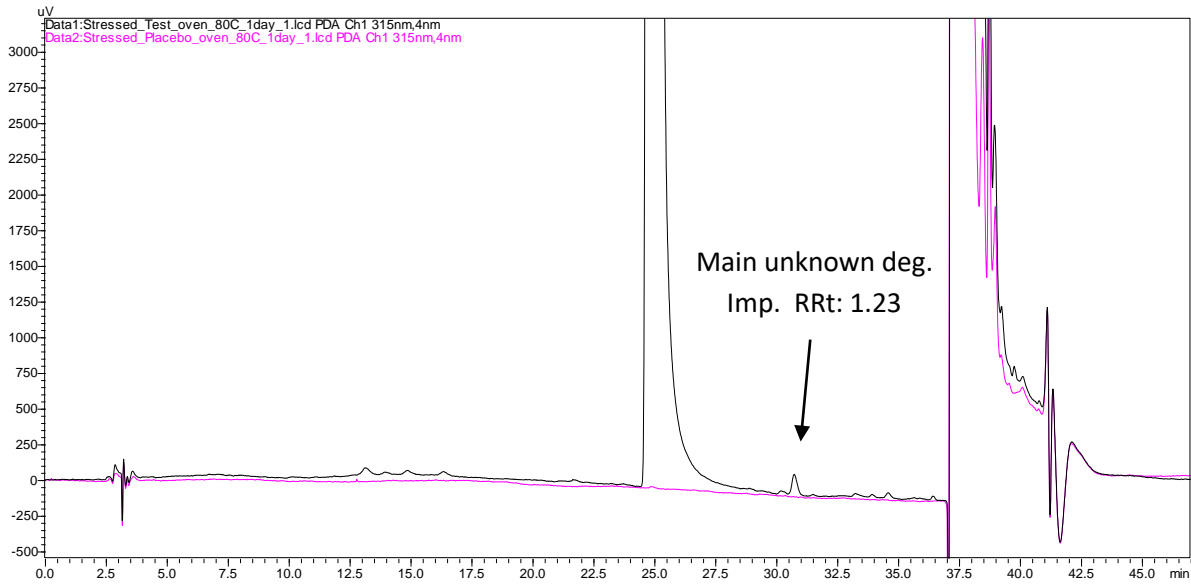
Στα παρακάτω χρωματογράφημα παρουσιάζονται τα διαλύματα που αναλύθηκαν έπειτα από την έκθεσή τους στις συνθήκες επιταχυνόμενης διάσπασης συγκριτικά με δείγμα placebo:



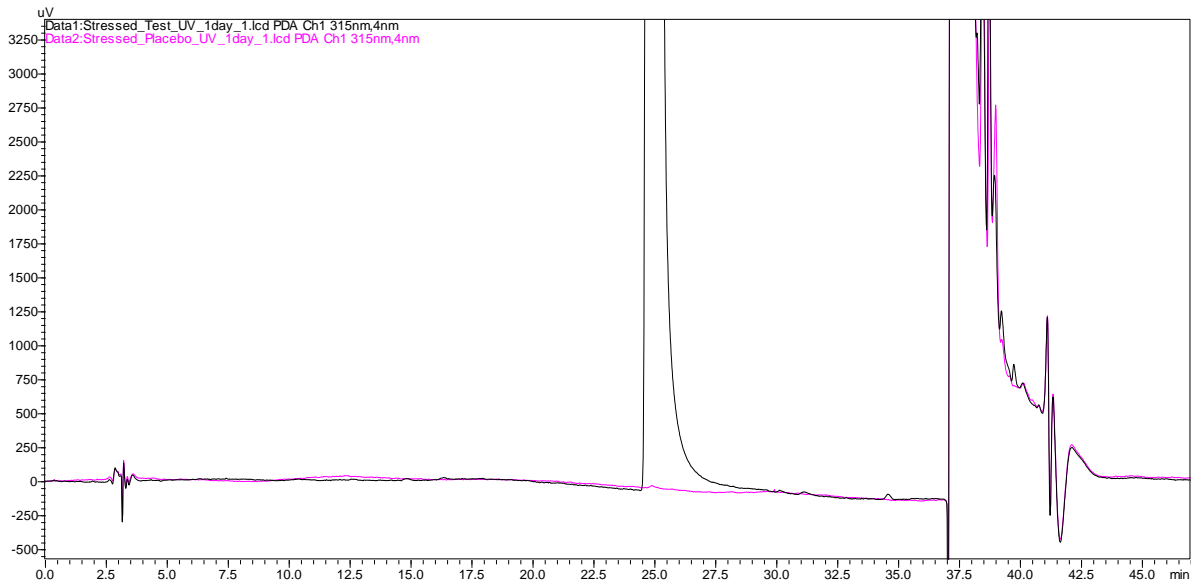
Εικόνα 4.1: Χρωματογράφημα μη επεξεργασμένου δείγματος (ροζ) και δείγματος placebo (μαύρο)



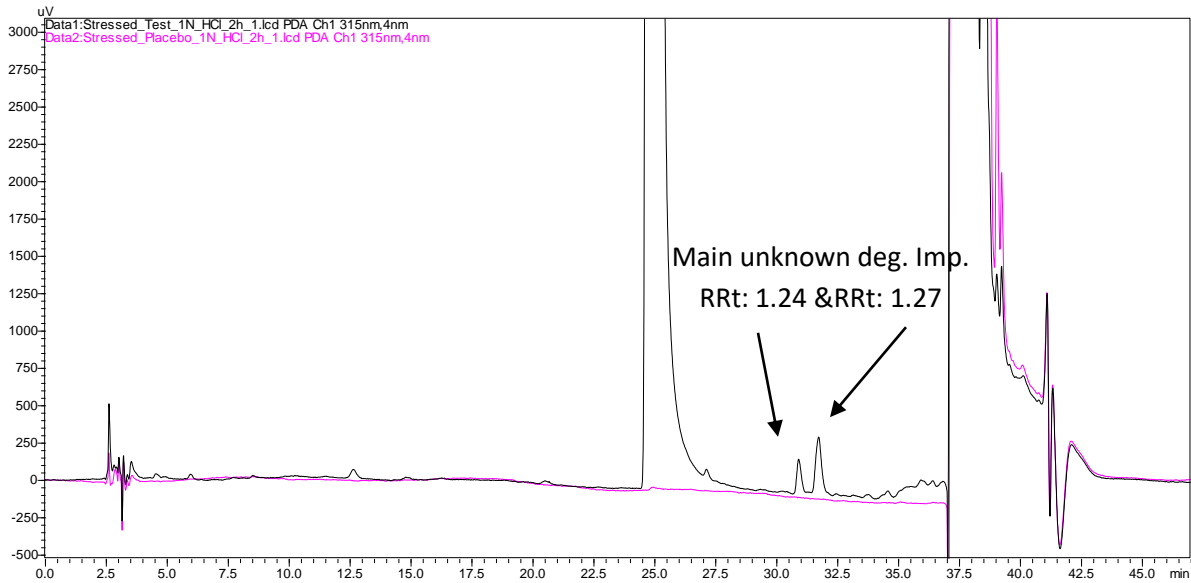
Εικόνα 4.2: Χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος με τις προσμίξεις στο 0,6% της συγκέντρωσης εργασίας (500 µg/mL)



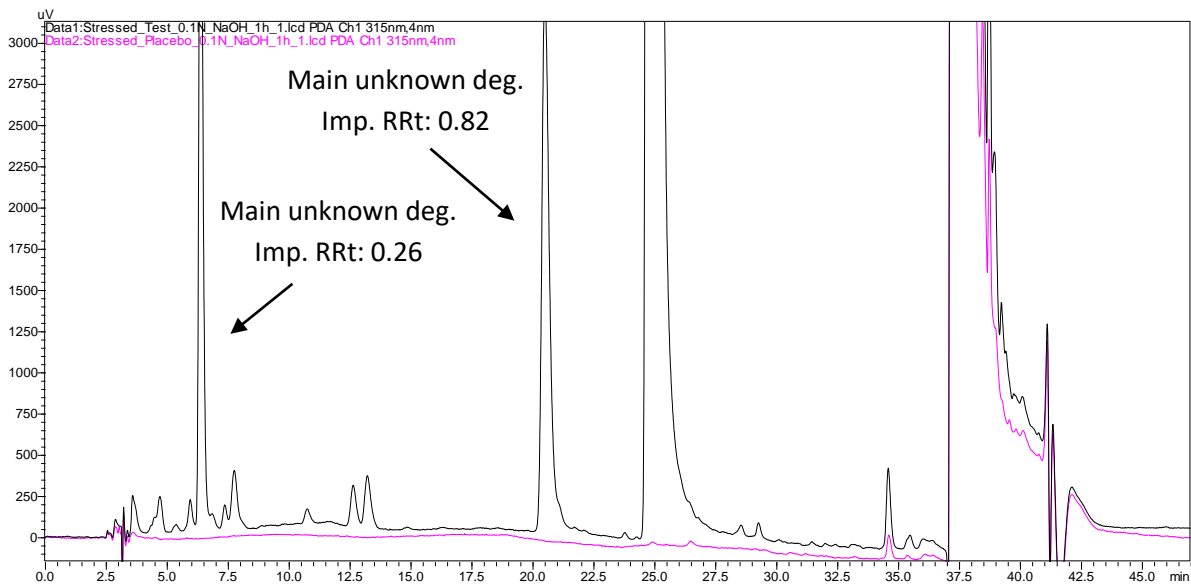
Εικόνα 4.3: Χρωματογράφημα στρεσαρισμένου δείγματος στο φούρνο στους 80 °C για 1 ημέρα (μαύρο) και δείγματος placebo (ροζ)



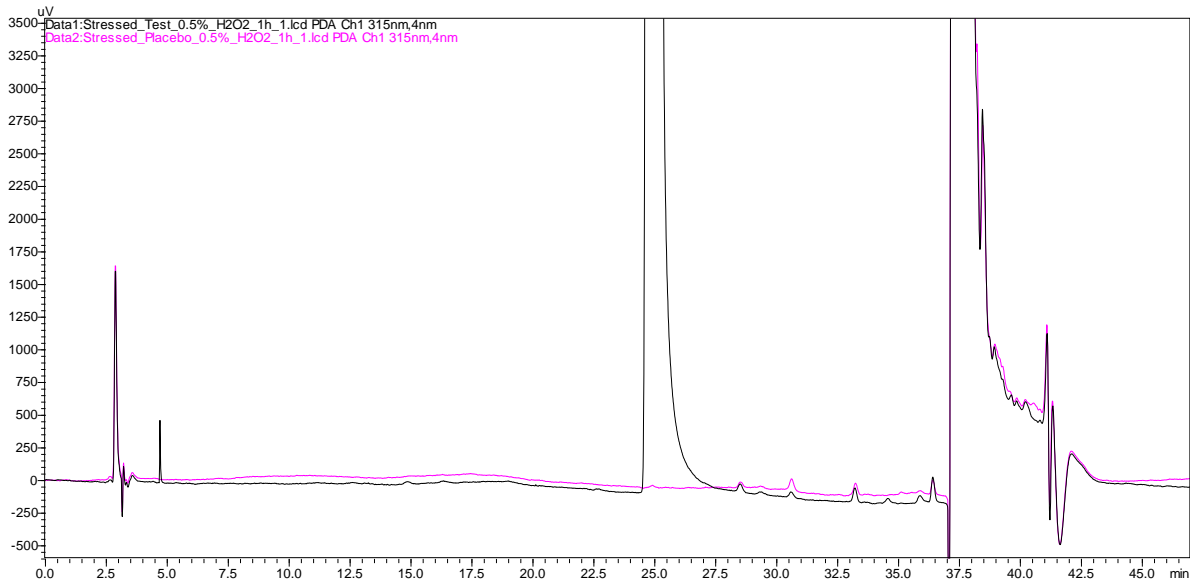
Εικόνα 4.4: Χρωματογράφημα στρεσαρισμένου δείγματος έπειτα από έκθεση στο UV για 1 ημέρα (μαύρο) και δείγματος placebo (ροζ)



Εικόνα 4.5: Χρωματογράφημα στρεσαρισμένου δείγματος έπειτα από έκθεση σε HCl 1 N για 2h (μαύρο) και δείγματος placebo (ροζ)



Εικόνα 4.6: Χρωματογράφημα στρεσαρισμένου δείγματος έπειτα από έκθεση σε NaOH 0,1 N για 1h (μαύρο) και δείγματος placebo (ροζ)



Εικόνα 4.7: Χρωματογράφημα στρεσαρισμένου δείγματος έπειτα από έκθεση σε H₂O₂ 0,5% για 1h (μαύρο) και δείγματος placebo (ροζ)

Τα συνολικά αποτελέσματα των πειραμάτων επιταχυνόμενης διάσπασης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα 4.1:

Πίνακας 4.1: % περιεχόμενο προσμίξεων στα στρεσαρισμένα δείγματα και ισοζύγιο μάζας

Έντονες Συνθήκες	% Περιεκτικότητα δραστικής	% Περιεκτικότητα προσμίξεων Πρόσμιξη / RRT %	Ισοζύγιο μάζας
Unstressed	100,9	% Ολικές προσμίξεις 0,00	-
Θερμική διάσπαση Φούρνος 80 °C / 1 μέρα	102,6	1,23 0,01 % Ολικές προσμίξεις 0,01	102
Φωτοδιάσπαση UV έκθεση/ 1 μέρα	101,3	% Ολικές προσμίξεις 0,00	100
Όξινη υδρόλυση HCl 1 N/ 2 h	103,7	0,14 0,01 1,24 0,01 1,27 0,03 % Ολικές προσμίξεις 0,05	103
Αλκαλική υδρόλυση NaOH 0,1 N/ 1 h	97,4	0,14 0,01 0,19 0,02 0,24 0,01 0,26 0,25 0,30 0,01 0,31 0,03 0,43 0,01	97

		0,51 0,02 0,53 0,01 0,82 0,31 1,39 0,03 1,42 0,01 % Ολικές προσμίξεις 0,74	
Οξειδωτική διάσπαση H₂O₂ 0,5% / 1 h	99,4	% Ολικές προσμίξεις 0,00	98

Κατά τη διάρκεια των παραπάνω περιορισμένων πειραμάτων επιταχυνόμενης διάσπασης, παρατηρήθηκε ότι η διάσπαση του δραστικού συστατικού ήταν σημαντική κυρίως στις αλκαλικές συνθήκες (NaOH 0,1 N / 1 h). Σε όλες τις περιπτώσεις ανακτήθηκαν αποδεκτά αποτελέσματα διατήρησης μάζας.

Κεφάλαιο 5^ο : Επικύρωση μεθόδου

5.1 Εκλεκτικότητα

Εκλεκτικότητα είναι η ικανότητα της μεθόδου να αξιολογεί αξιόπιστα και ανεμπόδιστα των αναλύτη παρουσία άλλων ουσιών που μπορεί να συνυπάρχουν στο δείγμα. Η εκλεκτικότητα της ανεπτυγμένης μεθόδου αξιολογήθηκε με την παρασκευή των παρακάτω διαλυμάτων:

- Διάλυμα αναφοράς μετρονιδαζόλης: όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2
- Λευκό διάλυμα(διαλύτης): όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2
- Διάλυμα δείγματος: όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2
- Πρότυπο διάλυμα πρόσμιξης Α στο 1%: Ζυγίστηκε ποσότητα 1,024 mg πρόσμιξης Α, μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 5,0 mL, διαλύθηκε με διάλυμα ο-Η₃ΡΟ₄ / ACN 90:10 v/v και αραιώθηκε έως τελικού όγκου με τον ίδιο διαλύτη. 0,050 mL από το παραπάνω διάλυμα αραιώθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 2,0 mL με διάλυμα ΚΗ₂ΡΟ₄ 10 mM / MeOH 70:30 v/v.
- Πρότυπο διάλυμα πρόσμιξης Β στο 1%: Ζυγίστηκε ποσότητα 1,025 mg πρόσμιξης Β, μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 5,0 mL, διαλύθηκε με διάλυμα EDTA 20 mM / ACN 80:20 v/v και αραιώθηκε έως τελικού όγκου με τον ίδιο διαλύτη. 0,050 mL από το παραπάνω διάλυμα αραιώθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 2,0 mL με διάλυμα ΚΗ₂ΡΟ₄ 10 mM / MeOH 70:30 v/v.
- Πρότυπο διάλυμα πρόσμιξης C στο 1%: Ζυγίστηκε ποσότητα 1,010 mg πρόσμιξης C, μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 5,0 mL, διαλύθηκε με διάλυμα EDTA 20 mM / ACN 80:20 v/v και αραιώθηκε έως τελικού όγκου με τον ίδιο διαλύτη. 0,050 mL από το παραπάνω διάλυμα αραιώθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 2,0 mL με διάλυμα ΚΗ₂ΡΟ₄ 10 mM / MeOH 70:30 v/v.
- Πρότυπο διάλυμα πρόσμιξης D στο 1%: Ζυγίστηκε ποσότητα 1,003 mg πρόσμιξης D, μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 5,0 mL, διαλύθηκε με διάλυμα EDTA 20 mM / ACN 80:20 v/v και αραιώθηκε έως τελικού όγκου με τον ίδιο διαλύτη. 0,050 mL από το παραπάνω διάλυμα αραιώθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 2,0 mL με διάλυμα ΚΗ₂ΡΟ₄ 10 mM / MeOH 70:30 v/v.
- Πρότυπο διάλυμα πρόσμιξης Ε στο 1%: Ζυγίστηκε ποσότητα 1,060 mg πρόσμιξης Ε, μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 5,0 mL, διαλύθηκε με διάλυμα EDTA 20 mM / ACN 80:20 v/v και αραιώθηκε έως τελικού όγκου με τον ίδιο διαλύτη. 0,050 mL από το

παραπάνω διάλυμα αραιώθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 2,0 mL με διάλυμα KH_2PO_4 10 mM / MeOH 70:30 v/v.

- Πρότυπο διάλυμα πρόσμιξης F στο 1%: Ζυγίστηκε ποσότητα 1,036 mg πρόσμιξης F, μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 5,0 mL, διαλύθηκε με διάλυμα EDTA 20 mM / ACN 80:20 v/v και αραιώθηκε έως τελικού όγκου με τον ίδιο διαλύτη. 0,050 mL από το παραπάνω διάλυμα αραιώθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 2,0 mL με διάλυμα KH_2PO_4 10 mM / MeOH 70:30 v/v.
- Πρότυπο διάλυμα πρόσμιξης G στο 1%: Ζυγίστηκε ποσότητα 1,024 mg πρόσμιξης G, μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 5,0 mL, διαλύθηκε με διάλυμα EDTA 20 mM / ACN 80:20 v/v και αραιώθηκε έως τελικού όγκου με τον ίδιο διαλύτη. 0,050 mL από το παραπάνω διάλυμα αραιώθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 2,0 mL με διάλυμα KH_2PO_4 10 mM / MeOH 70:30 v/v.
- Πρότυπο διάλυμα επιτετρακυκλίνης στο 1%: Ζυγίστηκε ποσότητα 2,674 mg υδροχλωρικής επιτετρακυκλίνης, μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 5,0 mL, διαλύθηκε με διάλυμα H_2O / ACN 80:20 v/v και αραιώθηκε έως τελικού όγκου με τον ίδιο διαλύτη. 0,050 mL από το παραπάνω διάλυμα αραιώθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 5,0 mL με ρυθμιστικό διάλυμα υπερχλωρικών 39,2 mM , pH 3,0 / MeOH 80:20 v/v.
- Πρότυπο διάλυμα 4-επι-ανυδροτετρακυκλίνης στο 1%: Ζυγίστηκε ποσότητα 2,877 mg υδροχλωρικής 4-επι-ανυδροτετρακυκλίνης, μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 5,0 mL, διαλύθηκε με διάλυμα H_2O / ACN 80:20 v/v και αραιώθηκε έως τελικού όγκου με τον ίδιο διαλύτη. 0,050 mL από το παραπάνω διάλυμα αραιώθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 5,0 mL με ρυθμιστικό διάλυμα υπερχλωρικών 39,2 mM , pH 3,0 / MeOH 80:20 v/v.
- Πρότυπο διάλυμα ανυδροτετρακυκλίνης στο 1%: Ζυγίστηκε ποσότητα 2,686 mg υδροχλωρικής ανυδροτετρακυκλίνης, μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 10,0 mL, διαλύθηκε με διάλυμα H_2O / ACN 80:20 v/v και αραιώθηκε έως τελικού όγκου με τον ίδιο διαλύτη. 0,100 mL από το παραπάνω διάλυμα αραιώθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 5,0 mL με ρυθμιστικό διάλυμα υπερχλωρικών 39,2 mM , pH 3,0 / MeOH 80:20 v/v.
- Πρότυπο διάλυμα δεμεκλοκυκλίνης πρόσμιξης A στο 1%: Ζυγίστηκε ποσότητα 2,724 mg δεμεκλοκυκλίνης πρόσμιξης A, μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 10,0 mL, διαλύθηκε με διάλυμα KH_2PO_4 10 mM pH 2,1 / ACN 80:20 v/v και αραιώθηκε έως τελικού όγκου με τον ίδιο διαλύτη. 0,100 mL από το παραπάνω διάλυμα αραιώθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 5,0 mL με ρυθμιστικό διάλυμα υπερχλωρικών 39,2 mM , pH 3,0 / MeOH 80:20 v/v.

- Διάλυμα placebo: όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2
- Εμβολιασμένο δείγμα με τις προσμίξεις C, E στο 0,1% της συγκέντρωσης εργασίας: όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.6
- Εμβολιασμένο δείγμα με την πρόσμιξη A στο 0,5% της συγκέντρωσης εργασίας και τις προσμίξεις B, D, F, G στο 0,1% της συγκέντρωσης εργασίας: όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.6

Τα αποτελέσματα καταλληλότητας του συστήματος παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 5.1:

Πίνακας 5.1: Κριτήρια καταλληλότητας συστήματος

Παράμετρος Καταλληλότητας Συστήματος	Κριτήριο	Τιμή
%RSD εμβαδού κορυφής Μετρονιδαζόλης στο Reference	NMT 2,0	0,32
%RSD χρόνου συγκράτησης Μετρονιδαζόλης στο Reference	NMT 2,0	0,033
Ελάχιστος παράγοντας Tailing Μετρονιδαζόλης στο Reference	NLT 0,8	1,1
Μέγιστος παράγοντας Tailing Μετρονιδαζόλης στο Reference	NMT 1,5	1,1
Θεωρητικές πλάκες Μετρονιδαζόλης στο Reference	NLT 2000	≥63325

i. Ταυτοποίηση

Ο σχετικός χρόνος κατακράτησης (RRt) της κάθε πρόσμιξης παρουσιάζεται στον παρακάτω Πίνακα 5.2:

Πίνακας 5.2: Χρόνοι κατακράτησης και σχετικοί χρόνοι κατακράτησης των προσμίξεων

Όνομα ένωσης	R _t (min)	RR _t σε σχέση με τη Μετρονιδαζόλη
Πρόσμιξη A	14,85	0,60
Πρόσμιξη B	8,67	0,35
Πρόσμιξη C	10,45	0,42
Πρόσμιξη D	19,74	0,79
Πρόσμιξη E	17,27	0,69
Πρόσμιξη F	27,61	1,11
Πρόσμιξη G	6,94	0,28

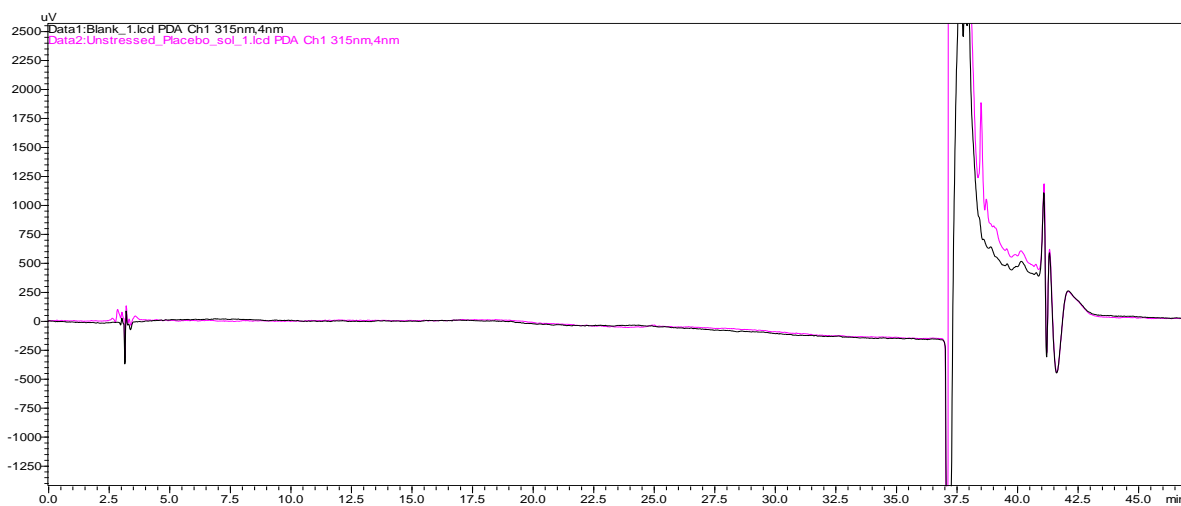
Οι χρόνοι κατακράτησης των εξεταζόμενων προσμίξεων στα εμβολιασμένα δείγματα ήταν σύμφωνοι με αυτούς στα πρότυπα διαλύματα όπως φαίνεται στον παρακάτω Πίνακα 5.3:

Πίνακας 5.3: Σχετικοί χρόνοι κατακράτησης των προσμίξεων σε εμβολιασμένα και πρότυπα διαλύματα

Όνομα ένωσης	R _t σε εμβολιασμένα δείγματα(min)	R _t σε standard δείγματα(min)
Πρόσμιξη Α	14,86	14,85
Πρόσμιξη Β	8,67	8,67
Πρόσμιξη C	10,46	10,45
Πρόσμιξη D	19,75	19,74
Πρόσμιξη E	17,29	17,27
Πρόσμιξη F	27,61	27,61
Πρόσμιξη G	6,91	6,94

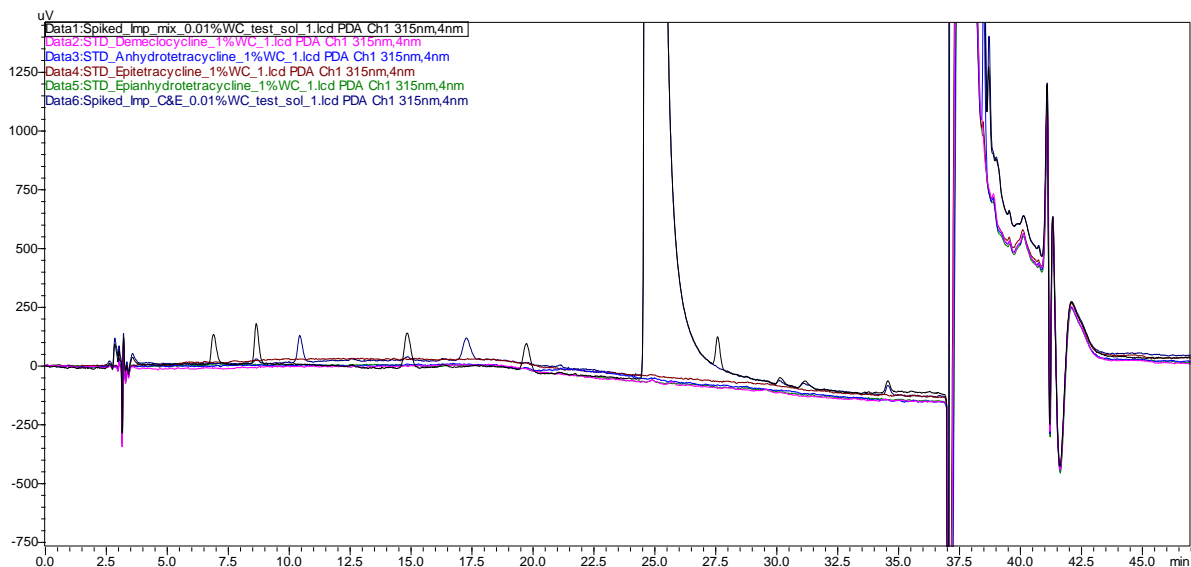
ii. Παρεμπόδιση

Στα χρωματογραφήματα του λευκού δείγματος και του placebo δεν καταγράφηκαν κορυφές στους χρόνους κατακράτησης της μετρονιδαζόλης και των προσμίξεων αυτής (Εικόνα 5.1).



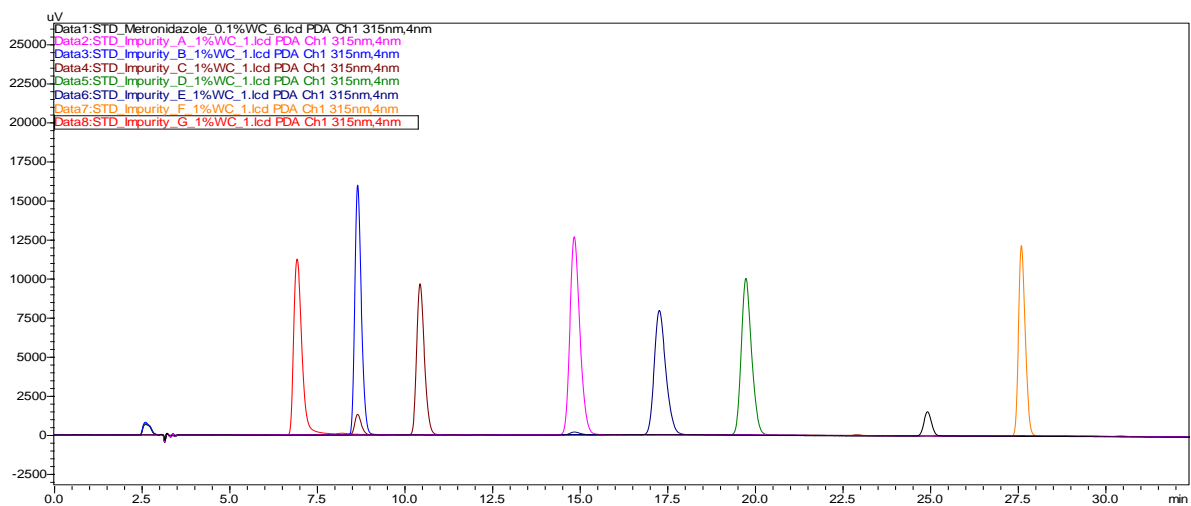
Εικόνα 5.1: Χρωματογραφήματα λευκού διαλύματος(μαύρο) και δείγματος placebo(ροζ)

Δεν καταγράφηκε παρεμπόδιση στους χρόνους κατακράτησης της μετρονιδαζόλης και των προσμίξεων αυτής από τις γνωστές προσμίξεις της υδροχλωρικής τετρακυκλίνης (Εικόνα 5.2).



Εικόνα 5.2: Χρωματογραφήματα εμβολιασμένων δειγμάτων με τις προσμίξεις της μετρονιδαζόλης σε σχέση με πρότυπα διαλύματα των προσμίξεων της υδροχλωρικής τετρακυκλίνης

Στο πρότυπο διάλυμα της πρόσμιξης C καταγράφηκαν μικρές κορυφές στους χρόνους κατακράτησης των προσμίξεων B και D. Επίσης, αντίστοιχο φαινόμενο παρατηρήθηκε στο πρότυπο διάλυμα της πρόσμιξης E στους χρόνους κατακράτησης της μετρονιδαζόλης και των προσμίξεων A, F (Εικόνα 5.3).



Εικόνα 5.3: Χρωματογραφήματα προτύπων διαλυμάτων των προσμίξεων της μετρονιδαζόλης στο 1% της συγκέντρωσης εργασίας

Εξαιτίας των παραπάνω αναφερθέντων παρεμποδίσεων για τον ποσοτικό προσδιορισμό των προσμίξεων αλλά και στη συνέχεια για την επικύρωση της γραμμικότητας, της επαναληψιμότητας και της ακρίβειας της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν

δύο διαφορετικά μίγματα διαλυμάτων. Στο πρώτο περιλαμβάνονταν οι προσμίξεις C και E ενώ στο δεύτερο η μετρονιδαζόλη και οι προσμίξεις A, B, D, F και G.

iii. Καθαρότητα κορυφών

Οι κορυφές όλων των προσμίξεων και της μετρονιδαζόλης που λήφθηκαν από τα εμβολιασμένα δείγματα στο όριο των προδιαγραφών βρέθηκαν καθαρές, με καθαρότητα κορυφής ίση με 1,000.

Συμπέρασμα: με βάση τα παραπάνω δεδομένα η μέθοδος θεωρείται εκλεκτική για τον προσδιορισμό των προσμίξεων της μετρονιδαζόλης.

5.2 Γραμμικότητα

Η γραμμικότητα της αναλυτικής διαδικασίας αναφέρεται στην ικανότητα της μεθόδου να αποσπά αποτελέσματα δοκιμών ανάλογα με τη συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας σε δείγματα εντός ενός συγκεκριμένου εύρους. Πρότυπα διαλύματα μετρονιδαζόλης και των εξεταζόμενων προσμίξεων παρασκευάστηκαν στο LOQ (0,01% της συγκέντρωσης εργασίας) και σε διαφορετικά επίπεδα ανάλογα με το όριο προδιαγραφής κάθε πρόσμιξης. Κάθε πρότυπο διάλυμα εγχύθηκε μία φορά. Τα παρακάτω διαλύματα χρησιμοποιήθηκαν:

Πρότυπο πυκνό διάλυμα Μετρονιδαζόλης (499,7 µg/mL): Λαμβάνοντας υπόψη την καθαρότητα του υλικού αναφοράς μετρονιδαζόλης, 10,014 mg μετρονιδαζόλης ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 20,0 mL, διαλύθηκαν σε διαλύτη και στη συνέχεια αραιώθηκαν έως τελικού όγκου.

Πρότυπο πυκνό διάλυμα πρόσμιξης A (500,3 µg/mL): Λαμβάνοντας υπόψη την καθαρότητα του υλικού αναφοράς της πρόσμιξης A, 2,534 mg πρόσμιξης A ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 5,0 mL, διαλύθηκαν σε διαλύτη και στη συνέχεια αραιώθηκαν έως τελικού όγκου.

Πρότυπο πυκνό διάλυμα πρόσμιξης B (500,0 µg/mL): Λαμβάνοντας υπόψη την καθαρότητα του υλικού αναφοράς της πρόσμιξης B, 2,558 mg πρόσμιξης B ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 5,0 mL, διαλύθηκαν σε MeOH / ACN 80:20 v/v και στη συνέχεια αραιώθηκαν έως τελικού όγκου.

Πρότυπο πυκνό διάλυμα πρόσμιξης C (504,1 µg/mL): Λαμβάνοντας υπόψη την καθαρότητα του υλικού αναφοράς της πρόσμιξης C, 1,023 mg πρόσμιξης C ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 2,0 mL, διαλύθηκαν σε MeOH / ACN 50:50 v/v και στη συνέχεια αραιώθηκαν έως τελικού όγκου.

Πρότυπο πυκνό διάλυμα πρόσμιξης D (500,8 µg/mL): Λαμβάνοντας υπόψη την καθαρότητα του υλικού αναφοράς της πρόσμιξης D, 2,511 mg πρόσμιξης D ζυγίστηκαν και

μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 5,0 mL, διαλύθηκαν σε διαλύτη και στη συνέχεια αραιώθηκαν έως τελικού όγκου.

Πρότυπο πυκνό διάλυμα πρόσμιξης E (500,0 µg/mL): Λαμβάνοντας υπόψη την καθαρότητα του υλικού αναφοράς της πρόσμιξης E, 2,624 mg πρόσμιξης E ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 5,0 mL, διαλύθηκαν σε διαλύτη και στη συνέχεια αραιώθηκαν έως τελικού όγκου.

Πρότυπο πυκνό διάλυμα πρόσμιξης F (501,0 µg/mL): Λαμβάνοντας υπόψη την καθαρότητα του υλικού αναφοράς της πρόσμιξης F, 2,595 mg πρόσμιξης F ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 5,0 mL, διαλύθηκαν σε διαλύτη και στη συνέχεια αραιώθηκαν έως τελικού όγκου.

Πρότυπο πυκνό διάλυμα πρόσμιξης G (500,0 µg/mL): Λαμβάνοντας υπόψη την καθαρότητα του υλικού αναφοράς της πρόσμιξης G, 2,578 mg πρόσμιξης G ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 5,0 mL, διαλύθηκαν σε διαλύτη και στη συνέχεια αραιώθηκαν έως τελικού όγκου.

Λόγω των παρατηρούμενων παρεμποδίσεων που περιγράφησαν παραπάνω (παράγραφος 5.1) η μελέτη αξιολόγησης της γραμμικότητας πραγματοποιήθηκε σε δύο διαφορετικά μίγματα προτύπων διαλυμάτων με τις ακόλουθες συνθέσεις:

Πρότυπο μίγμα 1: πρόσμιξη C και πρόσμιξη E

Πρότυπο μίγμα 2: μετρονιδαζόλη και προσμίξεις A, B, D, F, G

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται οι αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν για τη δημιουργία προτύπων διαλυμάτων σε διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων για τη μελέτη γραμμικότητας.

Πίνακας 5.4: Ενδιάμεσο (intermediate) πρότυπο μίγμα 1 στα 10 ppm

Όνομα ένωσης	Συγκέντρωση stock διαλύματος (µg/mL)	Όγκος από stock διάλυμα (mL)	Τελικός όγκος (mL)	Συγκέντρωση (µg/mL)
Πρόσμιξη C	504,1	0,200	10,0	10,1
Πρόσμιξη E	500,0	0,200	10,0	10,0

Πίνακας 5.5: Πρότυπο μίγμα 1 στο 0,6% της συγκέντρωσης εργασίας – διάλυμα G

Όνομα ένωσης	Συγκέντρωση stock διαλύματος (μg/mL)	Όγκος από intermediate διάλυμα (mL)	Τελικός όγκος (mL)	Συγκέντρωση (μg/mL)	% Ορίου προδιαγραφής
Πρόσμιξη C	504,1	3,00	10,0	3,02	600
Πρόσμιξη E	500,0	3,00	10,0	3,00	600

Πίνακας 5.6: Πρότυπο μίγμα 1 στο 0,5% της συγκέντρωσης εργασίας – διάλυμα F

Όνομα ένωσης	Συγκέντρωση stock διαλύματος (μg/mL)	Όγκος από intermediate διάλυμα (mL)	Τελικός όγκος (mL)	Συγκέντρωση (μg/mL)	% Ορίου προδιαγραφής
Πρόσμιξη C	504,1	2,50	10,0	2,52	500
Πρόσμιξη E	500,0	2,50	10,0	2,50	500

Πίνακας 5.7: Πρότυπο μίγμα 1 στο 0,2% της συγκέντρωσης εργασίας – διάλυμα E

Όνομα ένωσης	Συγκέντρωση stock διαλύματος (μg/mL)	Όγκος από intermediate διάλυμα (mL)	Τελικός όγκος (mL)	Συγκέντρωση (μg/mL)	% Ορίου προδιαγραφής
Πρόσμιξη C	504,1	2,50	25,0	1,01	200
Πρόσμιξη E	500,0	2,50	25,0	1,00	200

Πίνακας 5.8: Πρότυπο μίγμα 1 στο 0,12% της συγκέντρωσης εργασίας – διάλυμα D

Όνομα ένωσης	Συγκέντρωση stock διαλύματος (μg/mL)	Όγκος από διάλυμα G (mL)	Τελικός όγκος (mL)	Συγκέντρωση (μg/mL)	% Ορίου προδιαγραφής
Πρόσμιξη C	504,1	2,00	10,0	0,60	120
Πρόσμιξη E	500,0	2,00	10,0	0,60	120

Πίνακας 5.9: Πρότυπο μίγμα 1 στο 0,10% της συγκέντρωσης εργασίας – διάλυμα C

Όνομα ένωσης	Συγκέντρωση stock διαλύματος (μg/mL)	Όγκος από διάλυμα F (mL)	Τελικός όγκος (mL)	Συγκέντρωση (μg/mL)	% Ορίου προδιαγραφής
Πρόσμιξη C	504,1	2,00	10,0	0,50	100
Πρόσμιξη E	500,0	2,00	10,0	0,50	100

Πίνακας 5.10: Πρότυπο μίγμα 1 στο 0,05% της συγκέντρωσης εργασίας – διάλυμα B

Όνομα ένωσης	Συγκέντρωση stock διαλύματος (μg/mL)	Όγκος από διάλυμα F (mL)	Τελικός όγκος (mL)	Συγκέντρωση (μg/mL)	% Ορίου προδιαγραφής
Πρόσμιξη C	504,1	2,00	20,0	0,25	50
Πρόσμιξη E	500,0	2,00	20,0	0,25	50

Πίνακας 5.11: Πρότυπο μίγμα 1 στο 0,02% της συγκέντρωσης εργασίας – διάλυμα A

Όνομα ένωσης	Συγκέντρωση stock διαλύματος (μg/mL)	Όγκος από διάλυμα E (mL)	Τελικός όγκος (mL)	Συγκέντρωση (μg/mL)	% Ορίου προδιαγραφής
Πρόσμιξη C	504,1	2,00	20,0	0,10	20
Πρόσμιξη E	500,0	2,00	20,0	0,10	20

Πίνακας 5.12: Πρότυπο μίγμα 1 στο 0,01% της συγκέντρωσης εργασίας – LOQ

Όνομα ένωσης	Συγκέντρωση stock διαλύματος (μg/mL)	Όγκος από διάλυμα B (mL)	Τελικός όγκος (mL)	Συγκέντρωση (μg/mL)	% Ορίου προδιαγραφής
Πρόσμιξη C	504,1	2,00	10,0	0,05	10
Πρόσμιξη E	500,0	2,00	10,0	0,05	10

Πίνακας 5.13: Ενδιάμεσο (intermediate) πρότυπο μίγμα 2 στα 10 ppm:

Όνομα ένωσης	Συγκέντρωση stock διαλύματος (μg/mL)	Όγκος από stock διάλυμα (mL)	Τελικός όγκος (mL)	Συγκέντρωση (μg/mL)
Μετρονιδαζόλη	499,7	0,200	10,0	10,0
Πρόσμιξη Α	500,3			
Πρόσμιξη Β	500,0			
Πρόσμιξη D	500,8			
Πρόσμιξη F	501,0			
Πρόσμιξη G	500,0			

Πίνακας 5.14: Πρότυπο μίγμα 2 στο 0,6% της συγκέντρωσης εργασίας – διάλυμα G

Όνομα ένωσης	Συγκέντρωση stock διαλύματος (μg/mL)	Όγκος από intermediate διάλυμα (mL)	Τελικός όγκος (mL)	Συγκέντρωση (μg/mL)	% Ορίου προδιαγραφής
Μετρονιδαζόλη	499,7	3,00	10,0	3,00	n/a
Πρόσμιξη Α	500,3			3,00	120
Πρόσμιξη Β	500,0			3,00	600
Πρόσμιξη D	500,8			3,00	600
Πρόσμιξη F	501,0			3,01	600
Πρόσμιξη G	500,0			3,00	600

Πίνακας 5.15: Πρότυπο μίγμα 2 στο 0,5% της συγκέντρωσης εργασίας – διάλυμα F

Όνομα ένωσης	Συγκέντρωση stock διαλύματος (μg/mL)	Όγκος από intermediate διάλυμα (mL)	Τελικός όγκος (mL)	Συγκέντρωση (μg/mL)	% Ορίου προδιαγραφής
Μετρονιδαζόλη	499,7	2,50	10,0	2,50	n/a
Πρόσμιξη Α	500,3				100
Πρόσμιξη Β	500,0				500
Πρόσμιξη D	500,8				500
Πρόσμιξη F	501,0				500
Πρόσμιξη G	500,0				500

Πίνακας 5.16: Πρότυπο μίγμα 2 στο 0,2% της συγκέντρωσης εργασίας – διάλυμα E

Όνομα ένωσης	Συγκέντρωση stock διαλύματος (μg/mL)	Όγκος από intermediate διάλυμα (mL)	Τελικός όγκος (mL)	Συγκέντρωση (μg/mL)	% Ορίου προδιαγραφής
Μετρονιδαζόλη	499,7	2,50	25,0	1,00	n/a
Πρόσμιξη A	500,3				40
Πρόσμιξη B	500,0				200
Πρόσμιξη D	500,8				200
Πρόσμιξη F	501,0				200
Πρόσμιξη G	500,0				200

Πίνακας 5.17: Πρότυπο μίγμα 2 στο 0,12% της συγκέντρωσης εργασίας – διάλυμα D

Όνομα ένωσης	Συγκέντρωση stock διαλύματος (μg/mL)	Όγκος από διάλυμα G (mL)	Τελικός όγκος (mL)	Συγκέντρωση (μg/mL)	% Ορίου προδιαγραφής
Μετρονιδαζόλη	499,7	2,00	10,0	0,60	n/a
Πρόσμιξη A	500,3				24
Πρόσμιξη B	500,0				120
Πρόσμιξη D	500,8				120
Πρόσμιξη F	501,0				120
Πρόσμιξη G	500,0				120

Πίνακας 5.18: Πρότυπο μίγμα 2 στο 0,10% της συγκέντρωσης εργασίας – διάλυμα C

Όνομα ένωσης	Συγκέντρωση stock διαλύματος (μg/mL)	Όγκος από διάλυμα F (mL)	Τελικός όγκος (mL)	Συγκέντρωση (μg/mL)	% Ορίου προδιαγραφής
Μετρονιδαζόλη	499,7	2,00	10,0	0,50	n/a
Πρόσμιξη A	500,3				20
Πρόσμιξη B	500,0				100
Πρόσμιξη D	500,8				100
Πρόσμιξη F	501,0				100
Πρόσμιξη G	500,0				100

Πίνακας 5.19: Πρότυπο μίγμα 2 στο 0,05% της συγκέντρωσης εργασίας – διάλυμα Β

Όνομα ένωσης	Συγκέντρωση stock διαλύματος (μg/mL)	Όγκος από διάλυμα F (mL)	Τελικός όγκος (mL)	Συγκέντρωση (μg/mL)	% Ορίου προδιαγραφής
Μετρονιδαζόλη	499,7	2,00	20,0	0,25	n/a
Πρόσμιξη Α	500,3				10
Πρόσμιξη Β	500,0				50
Πρόσμιξη D	500,8				50
Πρόσμιξη F	501,0				50
Πρόσμιξη G	500,0				50

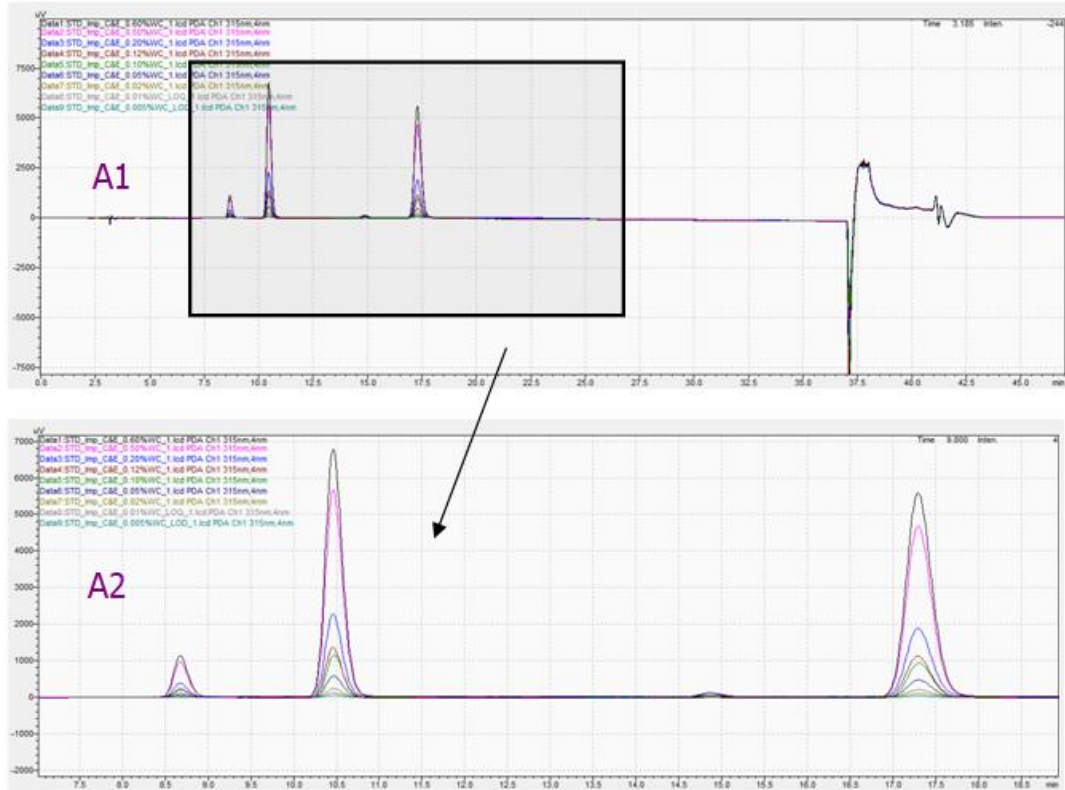
Πίνακας 5.20: Πρότυπο μίγμα 2 στο 0,02% της συγκέντρωσης εργασίας – διάλυμα Α

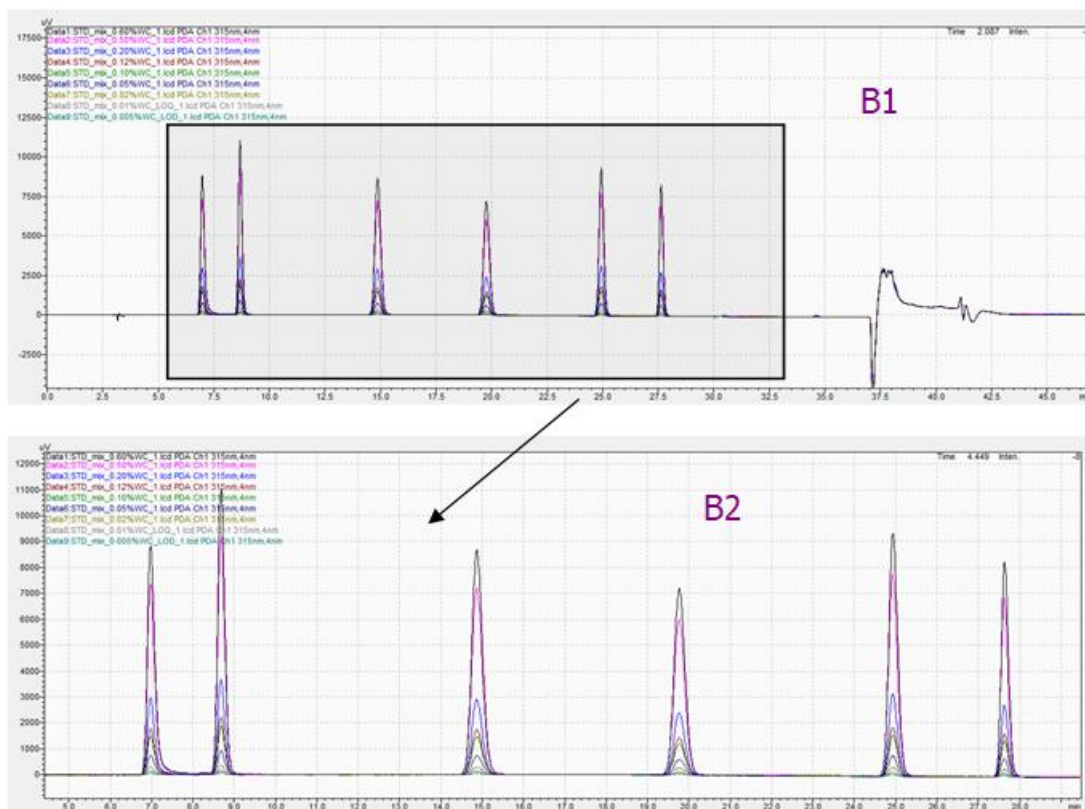
Όνομα ένωσης	Συγκέντρωση stock διαλύματος (μg/mL)	Όγκος από διάλυμα E (mL)	Τελικός όγκος (mL)	Συγκέντρωση (μg/mL)	% Ορίου προδιαγραφής
Μετρονιδαζόλη	499,7	2,00	20,0	0,10	n/a
Πρόσμιξη Α	500,3				4
Πρόσμιξη Β	500,0				20
Πρόσμιξη D	500,8				20
Πρόσμιξη F	501,0				20
Πρόσμιξη G	500,0				20

Πίνακας 5.21: Πρότυπο μίγμα 2 στο 0,01% της συγκέντρωσης εργασίας – LOQ

Όνομα ένωσης	Συγκέντρωση stock διαλύματος (μg/mL)	Όγκος από διάλυμα Β (mL)	Τελικός όγκος (mL)	Συγκέντρωση (μg/mL)	% Ορίου προδιαγραφής
Μετρονιδαζόλη	499,7	2,00	10,0	0,05	n/a
Πρόσμιξη Α	500,3				2
Πρόσμιξη Β	500,0				10
Πρόσμιξη D	500,8				10
Πρόσμιξη F	501,0				10
Πρόσμιξη G	500,0				10

Συγκριτικά χρωματογραφήματα των προτύπων διαλυμάτων στα διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων παρουσιάζονται παρακάτω (Εικόνα 5.4):





Εικόνα 5.4: Συγκριτικά χρωματογραφήματα των προτύπων διαλυμάτων στα διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων, μίγμα 1 επάνω(A) και μίγμα 2 κάτω(B)

Τα συνολικά αποτελέσματα της μελέτης γραμμικότητας της μετρονιδαζόλης παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 5.22: Αποτελέσματα μελέτης γραμμικότητας μετρονιδαζόλης

Standard διάλυμα	Συγκέντρωση (μg/mL)	Εμβαδόν κορυφής
LOQ	0,050	2594
A	0,100	4809
B	0,250	11841
C	0,500	24059
D	0,600	28521
E	0,999	48097
F	2,498	118958
G	2,998	142557

Τα αποτελέσματα της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων για την μετρονιδαζόλη παρουσιάζονται παρακάτω:

Τομή με τον άξονα γ: $-1,8 (\pm 1,1) \times 10^2$ (μονάδες εμβαδού)

Κλίση: $475,3 (\pm 0,7) \times 10^2$ (μονάδες εμβαδού · mL / μg)

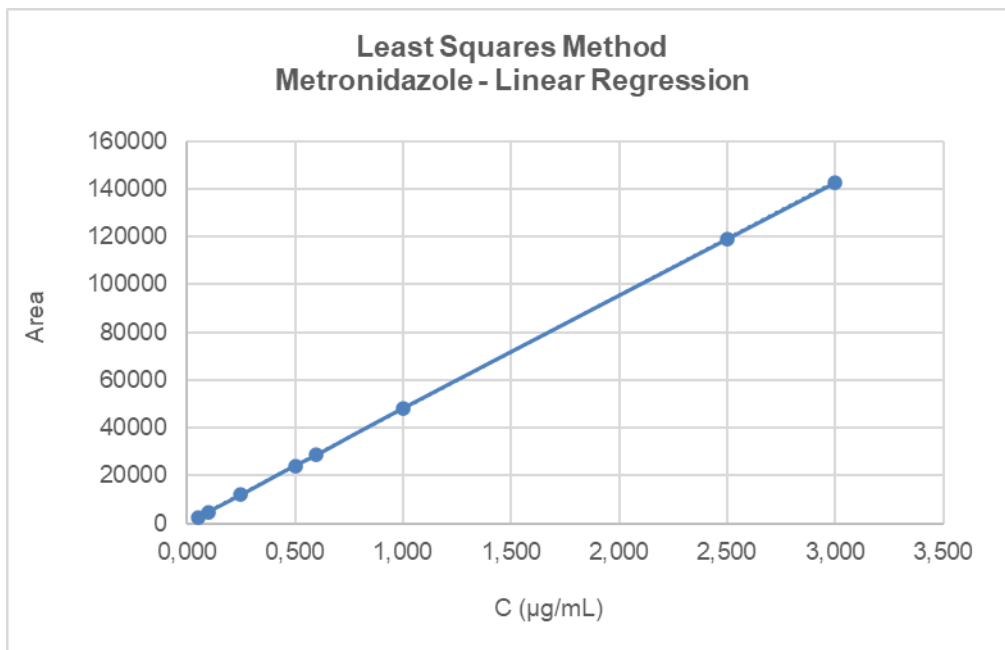
Συντελεστής Συσχέτισης (r): 0,99999

P-value = 0,15 > 0,05

Κάτω όριο 95% = -87, Άνω όριο 95% = 440. Το μηδέν περιλαμβάνεται στο διάστημα εμπιστοσύνης.

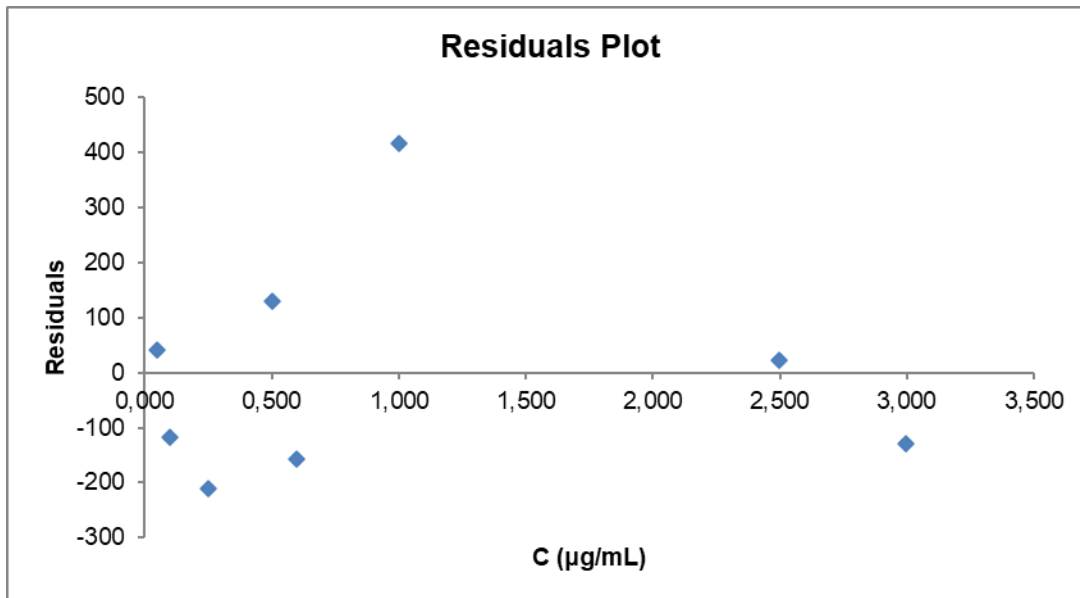
Η τομή με τον άξονα γ θεωρείται στατιστικά μη σημαντική και γι' αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ποσοτικοποίηση με βάση ένα σημείο.

Η καμπύλη βαθμονόμησης της μετρονιδαζόλης παρουσιάζεται παρακάτω:



Εικόνα 5.5: Καμπύλη βαθμονόμησης μετρονιδαζόλης

Διάγραμμα υπολοίπων:



Εικόνα 5.6: Διάγραμμα υπολοίπων μετρονιδαζόλης

Τα συνολικά αποτελέσματα της μελέτης γραμμικότητας της πρόσμιξης Α παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 5.23: Αποτελέσματα μελέτης γραμμικότητας πρόσμιξης Α

Standard διάλυμα	Συγκέντρωση (µg/mL)	Εμβαδόν κορυφής
LOQ	0,050	2729
A	0,100	5408
B	0,250	13369
C	0,500	26838
D	0,600	31721
E	1,001	53124
F	2,501	132974
G	3,002	159821

Τομή με τον άξονα γ: $0,29(\pm 0,76) \times 10^2$ (μονάδες εμβαδού)

Κλίση: $531,9(\pm 0,5) \times 10^2$ (μονάδες εμβαδού · mL / µg)

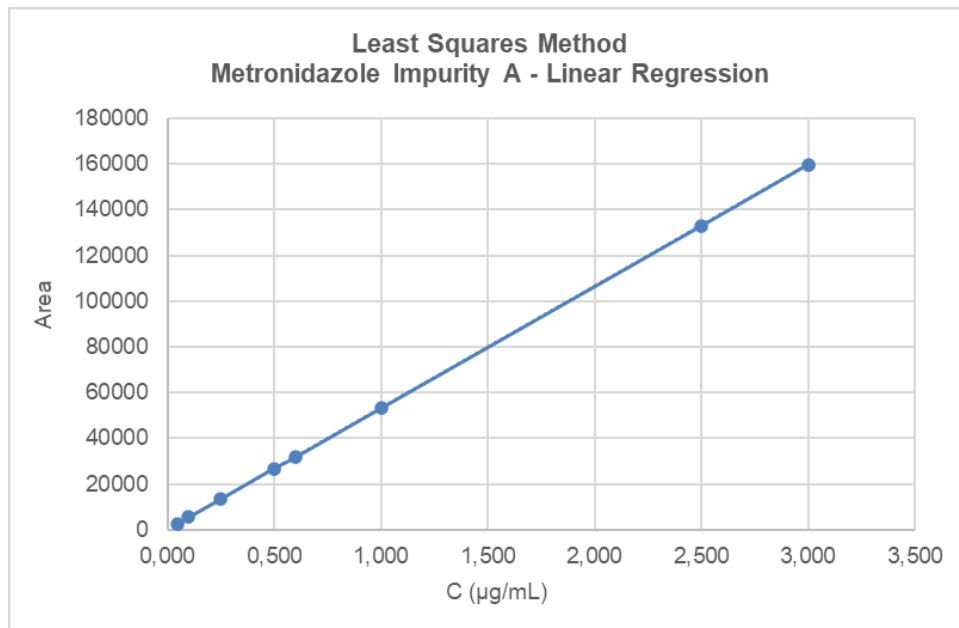
Συντελεστής Συσχέτισης (r): 0,99999

P-value = 0,71 > 0,05

Κάτω όριο 95% = -157, Άνω όριο 95% = 216. Το μηδέν περιλαμβάνεται στο διάστημα εμπιστοσύνης.

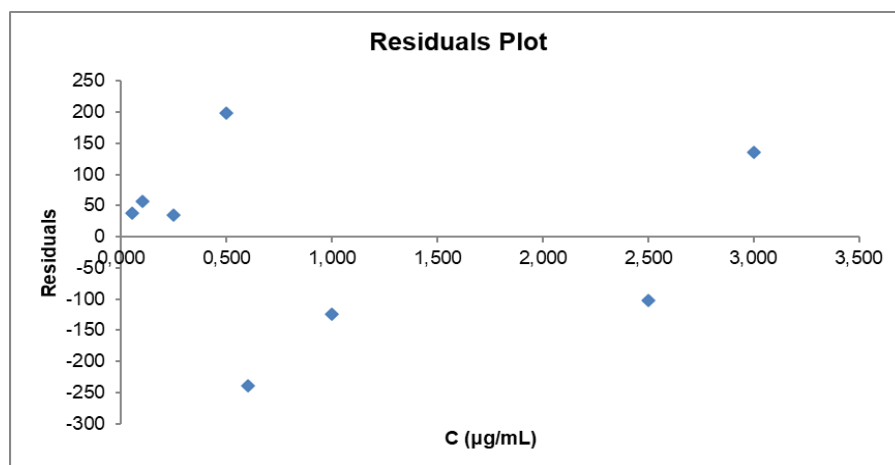
Η τομή με τον άξονα γ θεωρείται στατιστικά μη σημαντική και γι' αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ποσοτικοποίηση με βάση ένα σημείο.

Καμπύλη βαθμονόμησης της πρόσμιξης Α:



Εικόνα 5.7: Καμπύλη βαθμονόμησης πρόσμιξης Α

Διάγραμμα υπολοίπων:



Εικόνα 5.8: Διάγραμμα υπολοίπων πρόσμιξης Α

Τα συνολικά αποτελέσματα της μελέτης γραμμικότητας της πρόσμιξης Β παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 5.24: Αποτελέσματα μελέτης γραμμικότητας πρόσμιξης Β

Standard διάλυμα	Συγκέντρωση (μg/mL)	Εμβαδόν κορυφής
LOQ	0,050	2239
A	0,100	4425
B	0,250	11058
C	0,500	22066
D	0,600	26194
E	1,000	43755
F	2,500	109090
G	3,000	131081

Τομή με τον άξονα γ: $1,0 (\pm 0,4) \times 10^2$ (μονάδες εμβαδού)

Κλίση: $436,3 (\pm 0,3) \times 10^2$ (μονάδες εμβαδού · mL / μg)

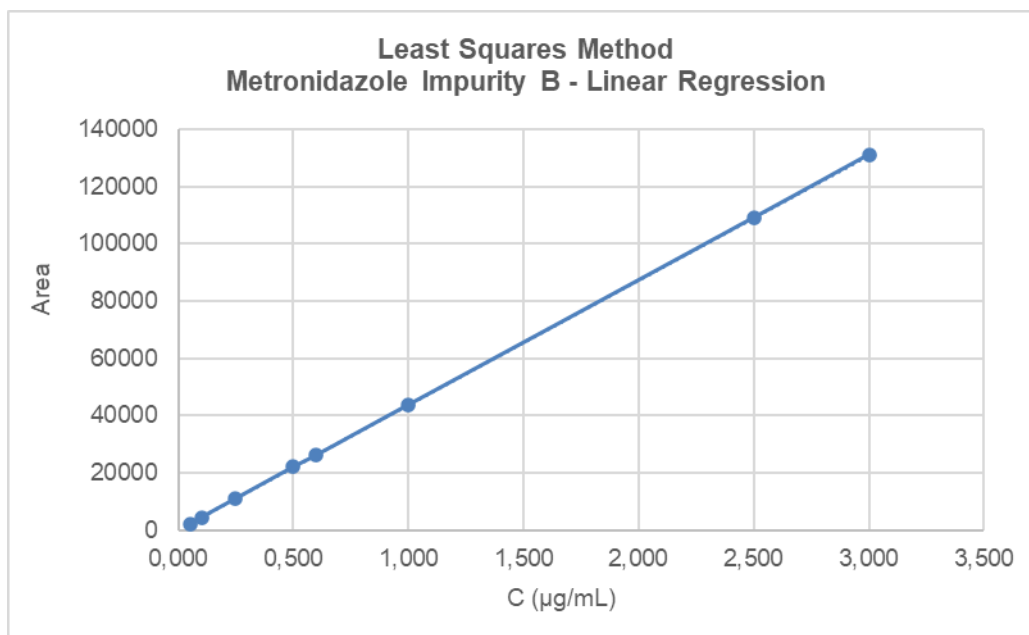
Συντελεστής Συσχέτισης (r): 1,000

P-value = 0,061 > 0,05

Κάτω όριο 95% = -7, Άνω όριο 95% = 213. Το μηδέν περιλαμβάνεται στο διάστημα εμπιστοσύνης.

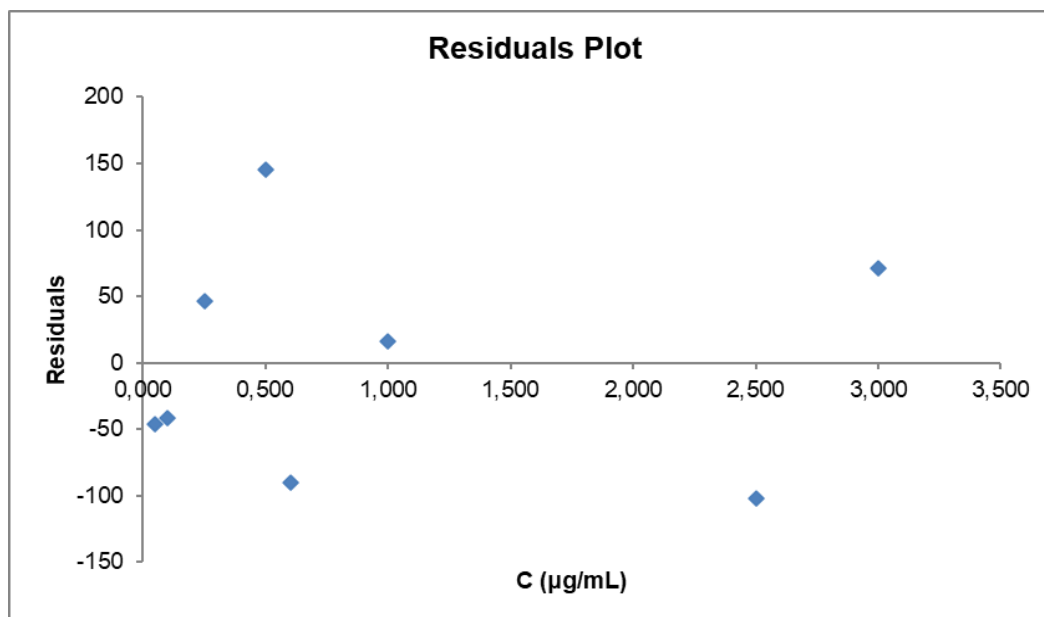
Η τομή με τον άξονα γ θεωρείται στατιστικά μη σημαντική και γι' αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ποσοτικοποίηση με βάση ένα σημείο.

Καμπύλη βαθμονόμησης της πρόσμιξης Β:



Εικόνα 5.9: Καμπύλη βαθμονόμησης πρόσμιξης Β

Διάγραμμα υπολοίπων:



Εικόνα 5.10: Διάγραμμα υπολοίπων πρόσμιξης Β

Τα συνολικά αποτελέσματα της μελέτης γραμμικότητας της πρόσμιξης C παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 5.25: Αποτελέσματα μελέτης γραμμικότητας πρόσμιξης C

Standard διάλυμα	Συγκέντρωση (μg/mL)	Εμβαδόν κορυφής
LOQ	0,050	1613
A	0,101	3195
B	0,252	7899
C	0,504	16037
D	0,605	19060
E	1,008	31890
F	2,520	80141
G	3,024	95715

Τομή με τον άξονα γ: $-0,28(\pm 0,67) \times 10^2$ (μονάδες εμβαδού)

Κλίση: $317,1(\pm 0,5) \times 10^2$ (μονάδες εμβαδού · mL / μg)

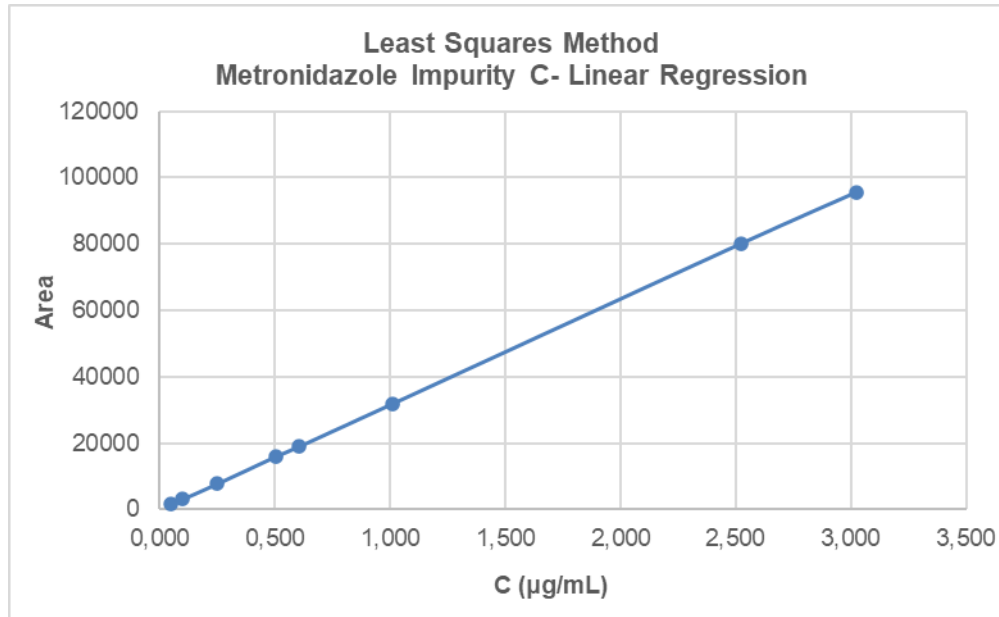
Συντελεστής Συσχέτισης (r): 0,99999

P-value = 0,69 > 0,05

Κάτω όριο 95% = -191, Άνω όριο 95% = 135. Το μηδέν περιλαμβάνεται στο διάστημα εμπιστοσύνης.

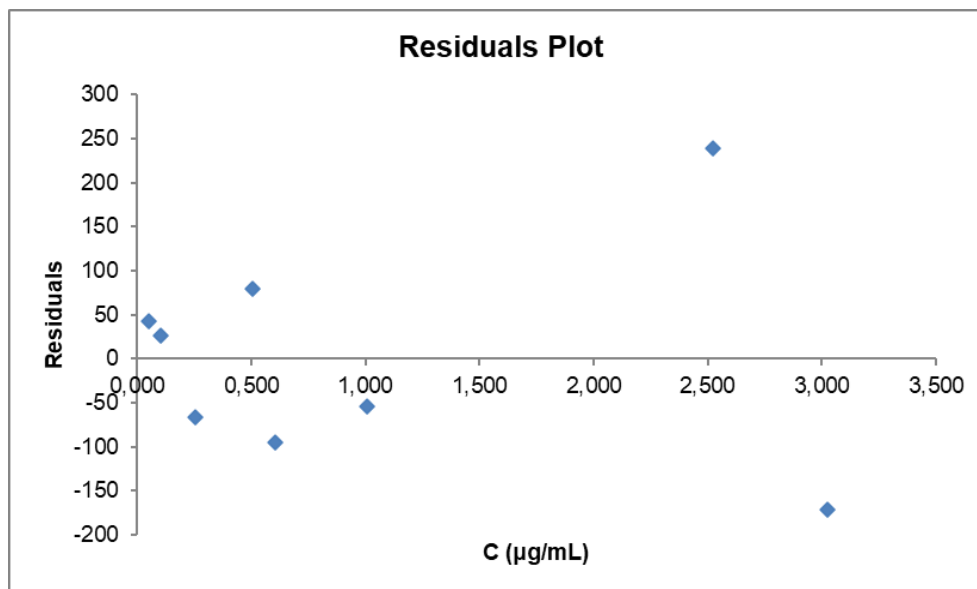
Η τομή με τον άξονα γ θεωρείται στατιστικά μη σημαντική και γι' αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ποσοτικοποίηση με βάση ένα σημείο.

Καμπύλη βαθμονόμησης της πρόσμιξης C:



Εικόνα 5.11: Καμπύλη βαθμονόμησης πρόσμιξης C

Διάγραμμα υπολοίπων:



Εικόνα 5.12: Διάγραμμα υπολοίπων πρόσμιξης C

Τα συνολικά αποτελέσματα της μελέτης γραμμικότητας της πρόσμιξης D παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 5.26: Αποτελέσματα μελέτης γραμμικότητας πρόσμιξης D

Standard διάλυμα	Συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Εμβαδόν κορυφής
LOQ	0,050	2309
A	0,100	4729
B	0,250	11338
C	0,501	22673
D	0,601	26899
E	1,002	45391
F	2,504	113506
G	3,005	136350

Τομή με τον άξονα y : $-0,30(\pm 0,82) \times 10^2$ (μονάδες εμβαδού)

Κλίση: $453,6(\pm 0,6) \times 10^2$ (μονάδες εμβαδού $\cdot \text{mL} / \mu\text{g}$)

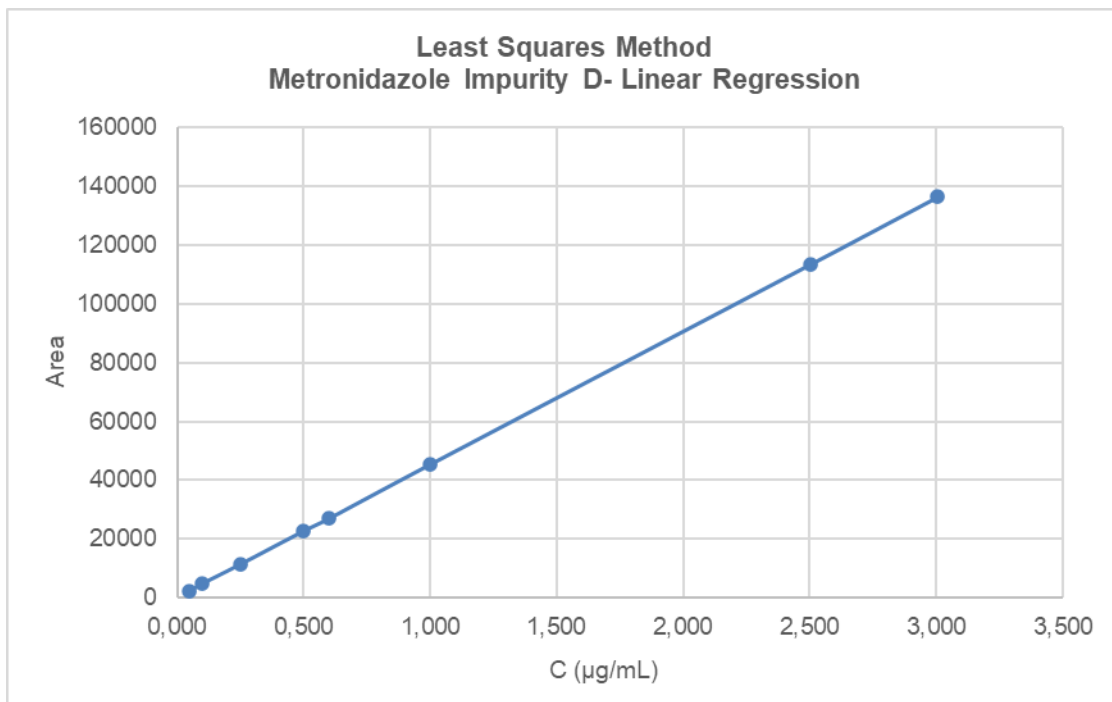
Συντελεστής Συσχέτισης (r): 0,99999

P-value = 0,73 > 0,05

Κάτω όριο 95% = -230, Άνω όριο 95% = 170. Το μηδέν περιλαμβάνεται στο διάστημα εμπιστοσύνης.

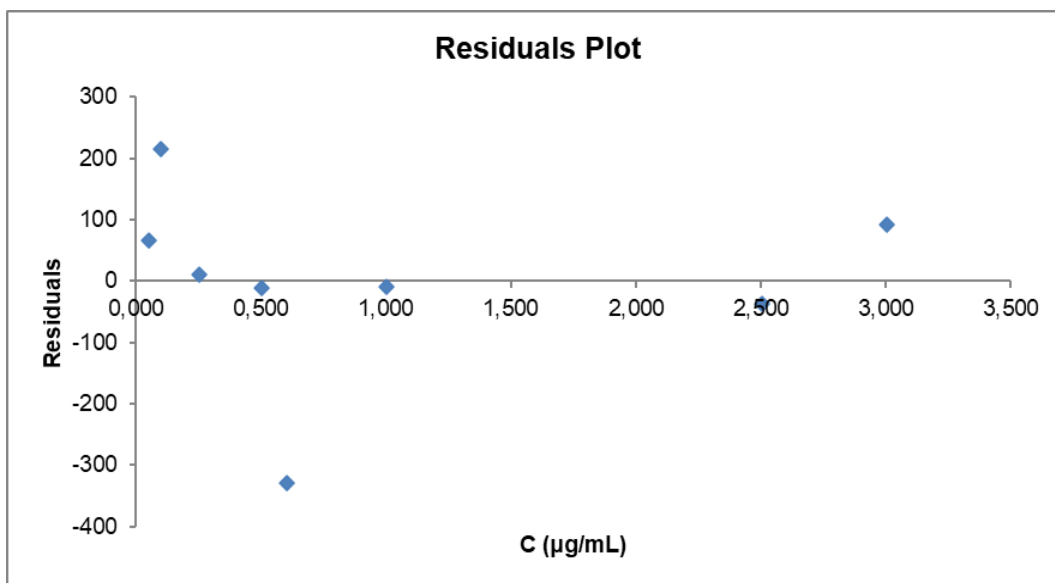
Η τομή με τον άξονα y θεωρείται στατιστικά μη σημαντική και γι' αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ποσοτικοποίηση με βάση ένα σημείο.

Καμπύλη βαθμονόμησης της πρόσμιξης D:



Εικόνα 5.13: Καμπύλη βαθμονόμησης πρόσμιξης D

Διάγραμμα υπολοίπων:



Εικόνα 5.14: Διάγραμμα υπολοίπων πρόσμιξης D

Τα συνολικά αποτελέσματα της μελέτης γραμμικότητας της πρόσμιξης E παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 5.27: Αποτελέσματα μελέτης γραμμικότητας πρόσμιξης E

Standard διάλυμα	Συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Εμβαδόν κορυφής
LOQ	0,050	1978
A	0,100	3924
B	0,250	9730
C	0,500	19617
D	0,600	23671
E	1,000	39463
F	2,500	99607
G	3,000	119033

Τομή με τον άξονα γ: $-1,6(\pm 0,9) \times 10^2$ (μονάδες εμβαδού)

Κλίση: $397,9(\pm 0,6) \times 10^2$ (μονάδες εμβαδού · mL / μg)

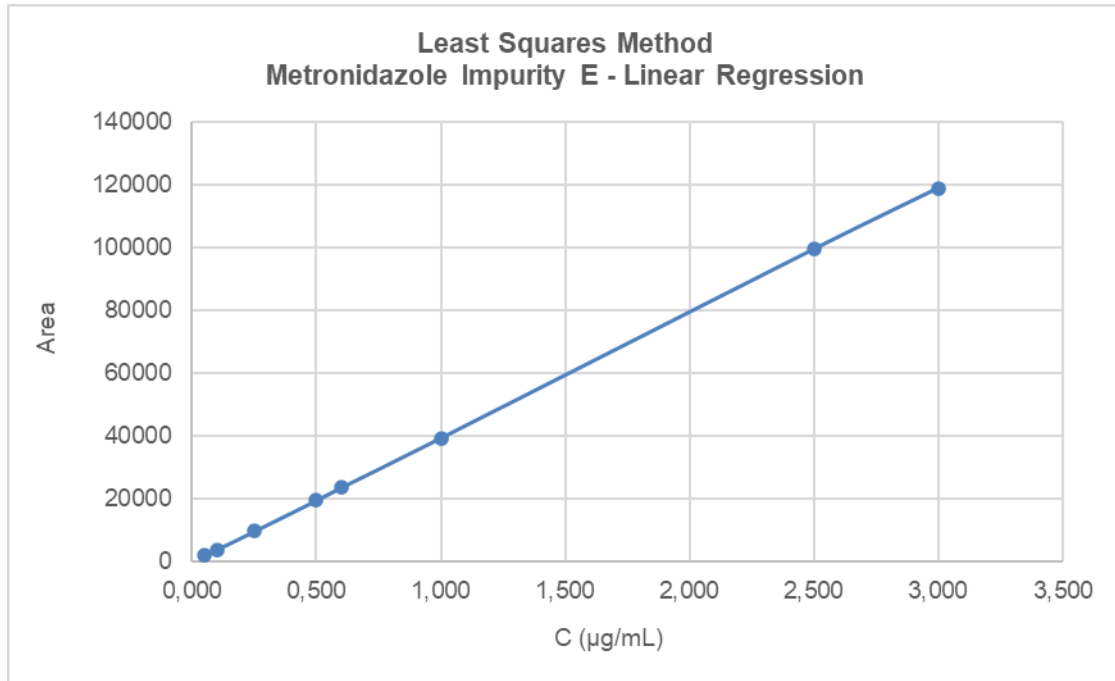
Συντελεστής Συσχέτισης (r): 0,99999

P-value = 0,12 > 0,05

Κάτω όριο 95% = -374, Άνω όριο 95% = 57. Το μηδέν περιλαμβάνεται στο διάστημα εμπιστοσύνης.

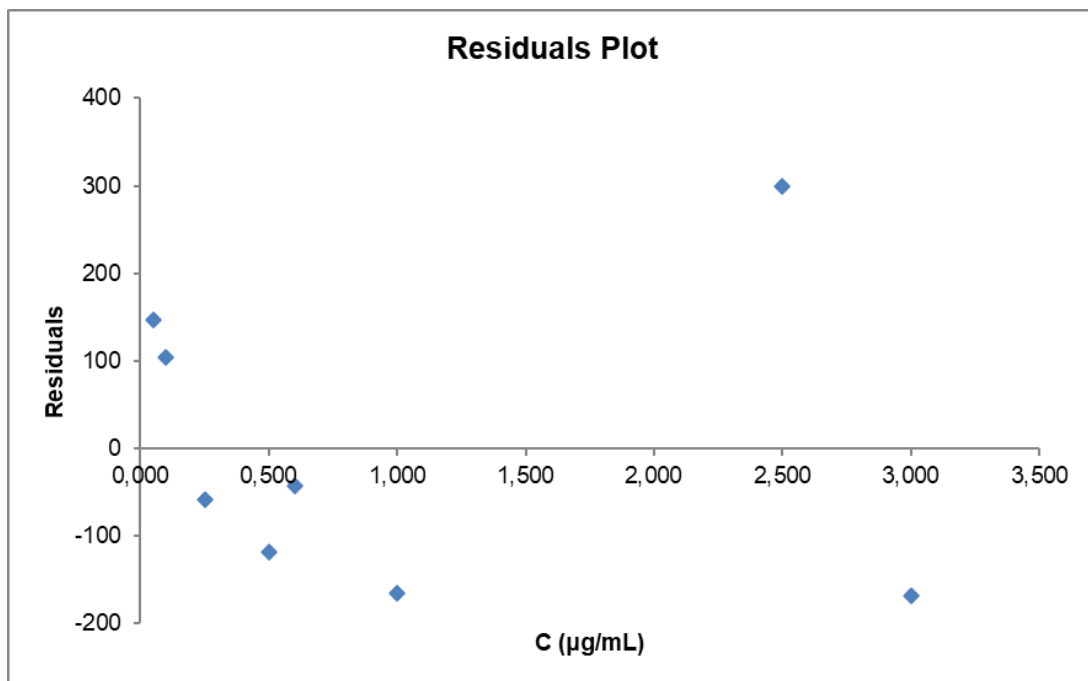
Η τομή με τον άξονα γ θεωρείται στατιστικά μη σημαντική και γι' αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ποσοτικοποίηση με βάση ένα σημείο.

Καμπύλη βαθμονόμησης της πρόσμιξης E:



Εικόνα 5.15: Καμπύλη βαθμονόμησης πρόσμιξης E

Διάγραμμα υπολοίπων:



Εικόνα 5.16: Διάγραμμα υπολοίπων πρόσμιξης E

Τα συνολικά αποτελέσματα της μελέτης γραμμικότητας της πρόσμιξης F παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 5.28: Αποτελέσματα μελέτης γραμμικότητας πρόσμιξης F

Standard διάλυμα	Συγκέντρωση (μg/mL)	Εμβαδόν κορυφής
LOQ	0,050	1685
A	0,100	3353
B	0,250	8436
C	0,501	16994
D	0,601	20214
E	1,002	33619
F	2,505	84809
G	3,006	101807

Τομή με τον άξονα γ: $-0,80(\pm 0,58) \times 10^2$ (μονάδες εμβαδού)

Κλίση: $338,8(\pm 0,4) \times 10^2$ (μονάδες εμβαδού · mL / μg)

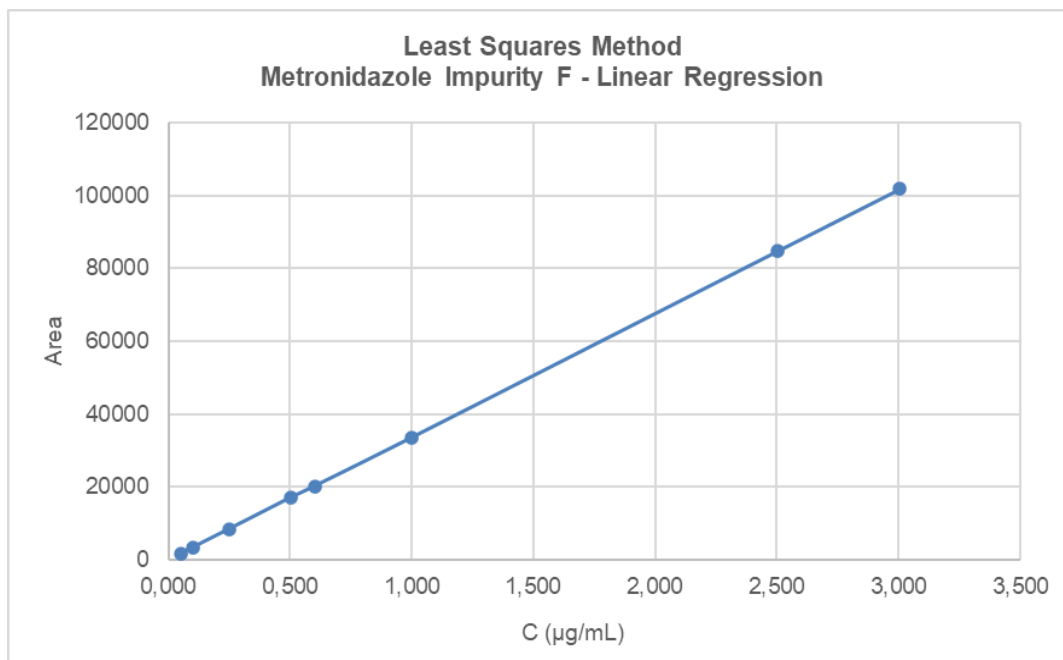
Συντελεστής Συσχέτισης (r): 0,99999

P-value = 0,22 > 0,05

Κάτω όριο 95% = -223, Άνω όριο 95% = 63. Το μηδέν περιλαμβάνεται στο διάστημα εμπιστοσύνης.

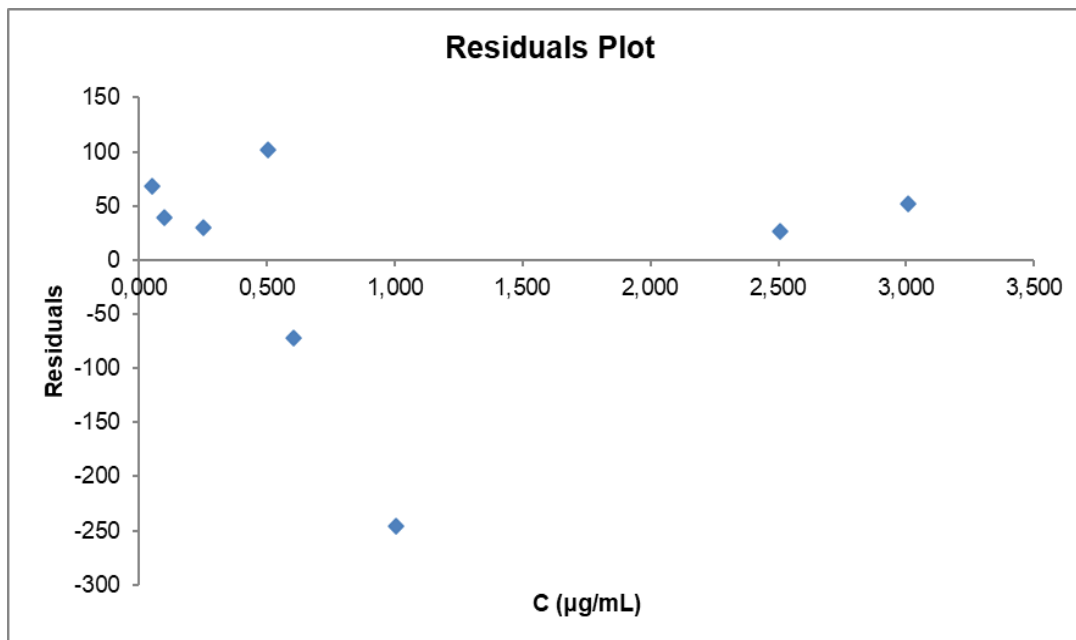
Η τομή με τον άξονα γ θεωρείται στατιστικά μη σημαντική και γι' αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ποσοτικοποίηση με βάση ένα σημείο.

Καμπύλη βαθμονόμησης της πρόσμιξης F:



Εικόνα 5.17: Καμπύλη βαθμονόμησης πρόσμιξης F

Διάγραμμα υπολοίπων:



Εικόνα 5.18: Διάγραμμα υπολοίπων πρόσμιξης F

Τα συνολικά αποτελέσματα της μελέτης γραμμικότητας της πρόσμιξης G παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 5.29: Αποτελέσματα μελέτης γραμμικότητας πρόσμιξης G

Standard διάλυμα	Συγκέντρωση (μg/mL)	Εμβαδόν κορυφής
LOQ	0,050	1919
A	0,100	3708
B	0,250	9445
C	0,500	19239
D	0,600	22741
E	1,000	38412
F	2,500	96386
G	3,000	115903

Τομή με τον άξονα y: $-1,9(\pm 0,7) \times 10^2$ (μονάδες εμβαδού)

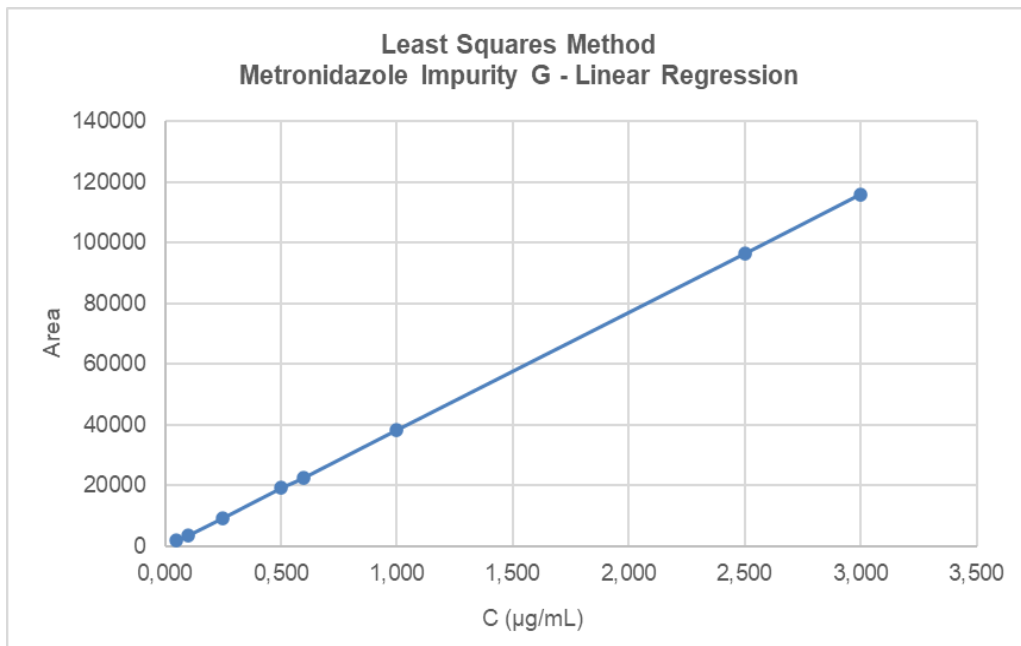
Κλίση: $386,6(\pm 0,5) \times 10^2$ (μονάδες εμβαδού · mL / μg)

Συντελεστής Συσχέτισης (r): 0,99999

P-value = 0,04 < 0,05

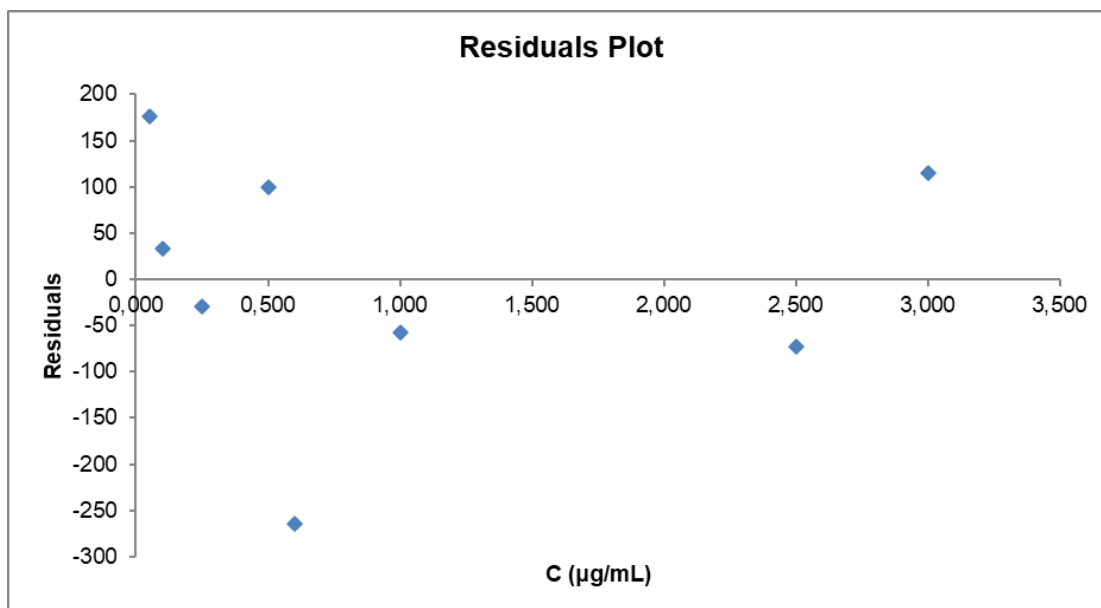
Κάτω όριο 95% = -369, Άνω όριο 95% = -12. Το μηδέν δεν περιλαμβάνεται στο διάστημα εμπιστοσύνης.

Καμπύλη βαθμονόμησης της πρόσμιξης G:



Εικόνα 5.19: Καμπύλη βαθμονόμησης πρόσμιξης G

Διάγραμμα υπολοίπων:



Εικόνα 5.20: Διάγραμμα υπολοίπων πρόσμιξης G

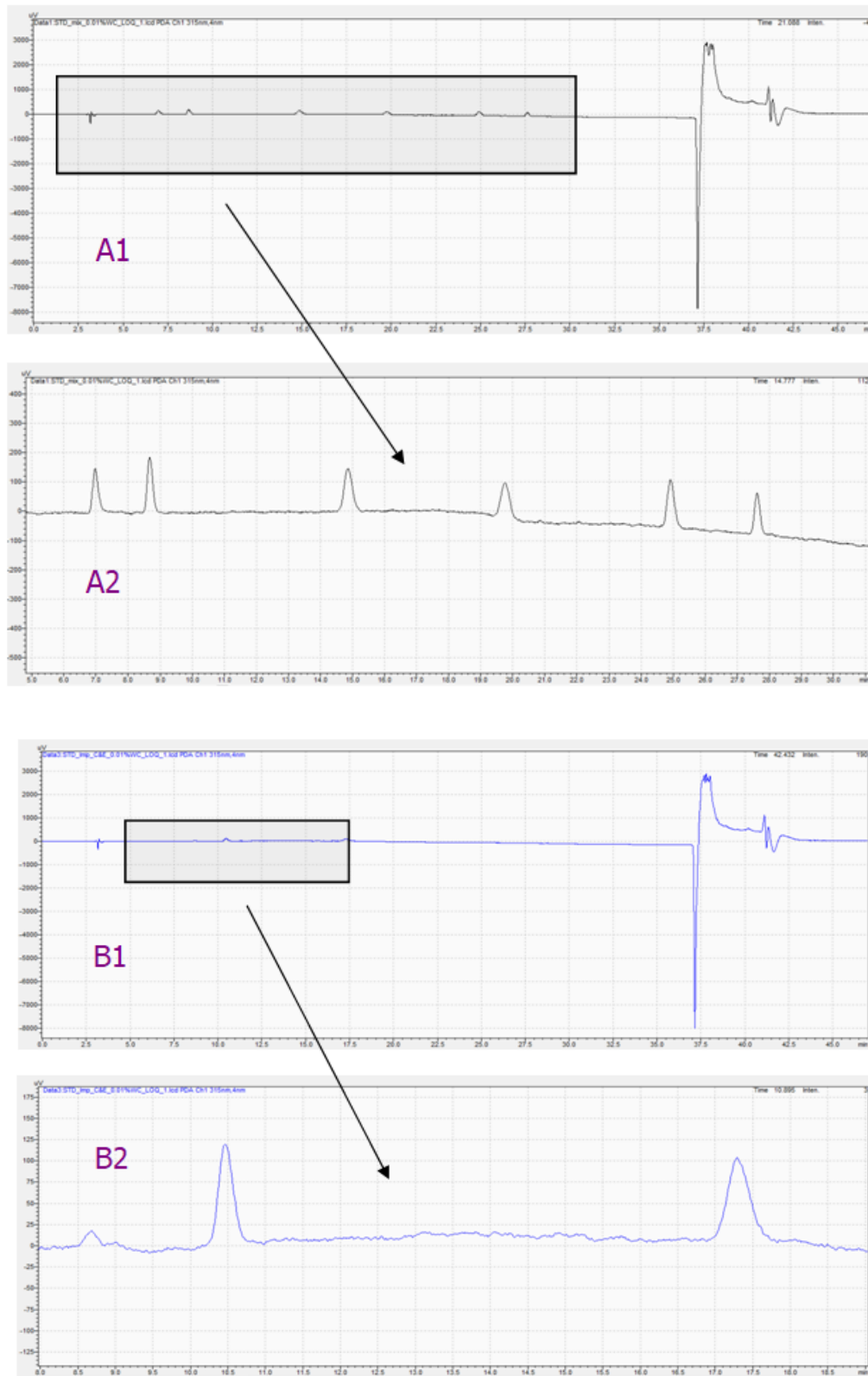
5.3 Προσδιορισμός του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ)

Η συγκέντρωση στο όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) , όπου ικανοποιείται το κριτήριο για το λόγο σήμα/θόρυβο (s/n ratio) πάνω από 10, για τη μετρονιδαζόλη και τις προσμίξεις αυτής ορίστηκε στα 0,05 μg/mL, το οποίο αντιστοιχεί στο 0,01% της συγκέντρωσης εργασίας.

Παρακάτω παρουσιάζεται ο λόγος του σήματος προς το θόρυβο στο LOQ των προτύπων διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη γραμμικότητας:

Πίνακας 5.30: Λόγος σήματος προς θόρυβο στο LOQ

Όνομα ένωσης	Signal to noise ratio
Μετρονιδαζόλη	29
Πρόσμιξη A	26
Πρόσμιξη B	33
Πρόσμιξη C	22
Πρόσμιξη D	21
Πρόσμιξη E	18
Πρόσμιξη F	24
Πρόσμιξη G	27



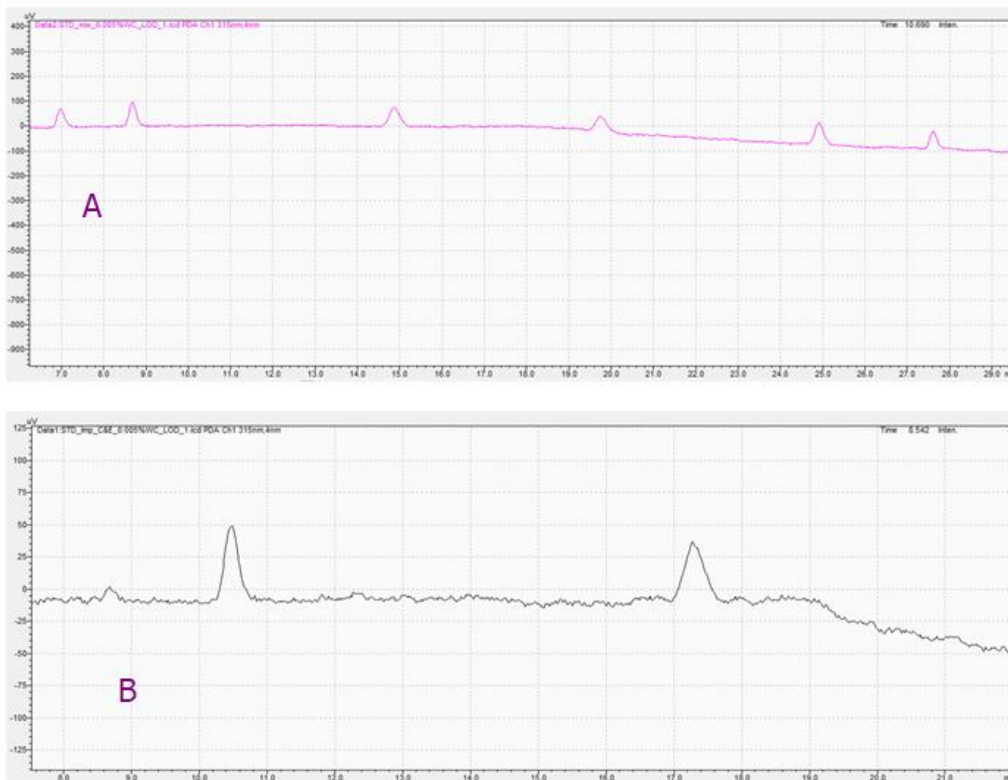
Εικόνα 5.21: Χρωματογραφήματα του πρότυπου μίγματος 2 (επάνω, A) και του πρότυπου μίγματος 1 (κάτω, B) στο όριο ποσοτικοποίησης (LOQ)

5.4 Προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης (LOD)

Το όριο ανίχνευσης (LOD) και οι αντίστοιχοι λόγοι σήματος προς θόρυβο παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 5.31: Λόγος σήματος προς θόρυβο στο LOD

Όνομα ένωσης	LOD (μg/mL)	% συγκέντρωσης εργασίας	Signal to noise ratio
Μετρονιδαζόλη	0,025	0,005	17
Πρόσμιξη Α			15
Πρόσμιξη Β			18
Πρόσμιξη C			12
Πρόσμιξη D			12
Πρόσμιξη E			10
Πρόσμιξη F			13
Πρόσμιξη G			14



Εικόνα

5.22: Χρωματογραφήματα του πρότυπου μίγματος 2 (επάνω, A) και του πρότυπου μίγματος 1 (κάτω, B) στο όριο ποσοτικοποίησης (LOD)

5.5 Παράγοντας σχετικής απόκρισης (RRF)

Πρόσμιξη A:

$$RRF_{Impurity\ A} = \frac{S_{Impurity\ A}}{S_{Metronidazole}} = \frac{53190.8}{47531.7} = 1.10$$

Πρόσμιξη B:

$$RRF_{Impurity\ B} = \frac{S_{Impurity\ B}}{S_{Metronidazole}} = \frac{43632.2}{47531.7} = 0.92$$

Πρόσμιξη C:

$$RRF_{Impurity\ C} = \frac{S_{Impurity\ C}}{S_{Metronidazole}} = \frac{31712.7}{47531.7} = 0.67$$

Πρόσμιξη D:

$$RRF_{Impurity\ D} = \frac{S_{Impurity\ D}}{S_{Metronidazole}} = \frac{45357.2}{47531.7} = 0.95$$

Πρόσμιξη E:

$$RRF_{Impurity\ E} = \frac{S_{Impurity\ E}}{S_{Metronidazole}} = \frac{39788.2}{47531.7} = 0.84$$

Πρόσμιξη F:

$$RRF_{Impurity\ F} = \frac{S_{Impurity\ F}}{S_{Metronidazole}} = \frac{33878.0}{47531.7} = 0.71$$

Πρόσμιξη G:

$$RRF_{Impurity\ G} = \frac{S_{Impurity\ G}}{S_{Metronidazole}} = \frac{38657.5}{47531.7} = 0.81$$

5.6 Επαναληψιμότητα

Η επαναληψιμότητα της συγκεκριμένης μεθόδου εξετάστηκε μέσω της σχετικής τυπικής απόκλισης της % ανάκτησης από μία εξάδα εμβολιασμένων δειγμάτων στο όριο της προδιαγραφής για την κάθε πρόσμιξη.

- Γνωστές προσμίξεις (specified πρόσμιξη A και unspecified προσμίξεις B, D, F, G)

Διάλυμα δείγματος ελέγχου: όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2

Πυκνό πρότυπο διάλυμα πρόσμιξης A (500,3 µg/mL): όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2

Πυκνό πρότυπο διάλυμα πρόσμιξης B (500,0 µg/mL): όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2

Πυκνό πρότυπο διάλυμα πρόσμιξης D (500,8 µg/mL): όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2

Πυκνό πρότυπο διάλυμα πρόσμιξης F (501,0 µg/mL): όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2

Πυκνό πρότυπο διάλυμα πρόσμιξης G (500,0 µg/mL): όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2

Εμβολιασμένο δείγμα με πρόσμιξη A στο 0,5% της συγκέντρωσης εργασίας και προσμίξεις B,D,F,G στο 0,1% της συγκέντρωσης εργασίας: ποσότητα σκόνης Bismuth/Metronidazole/Tetracycline HCl (140/125/125 mg) που αντιστοιχεί σε 25 mg μετρονιδαζόλης ζυγίστηκε με ακρίβεια και μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 50,0 mL. Στη συνέχεια προστέθηκαν 0,250 mL πυκνού διαλύματος πρόσμιξης A και 0,050 mL από κάθε πυκνό διάλυμα των προσμίξεων B, D, F, G. Ακολούθως προστέθηκαν 40 mL διαλύτη και το διάλυμα τοποθετήθηκε στους υπερήχους για 5 min. Τέλος το διάλυμα αραιώθηκε με διαλύτη έως τελικού όγκου και φιλτραρίστηκε μέσω PTFE 0,45 µm απορρίπτοντας τα πρώτα 2 mL.

- Γνωστές προσμίξεις (unspecified προσμίξεις C, E)

Διάλυμα δείγματος ελέγχου: όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2

Πυκνό πρότυπο διάλυμα πρόσμιξης C (504,1 µg/mL): όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2

Πυκνό πρότυπο διάλυμα πρόσμιξης E (500,0 µg/mL): όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2

Εμβολιασμένο δείγμα με προσμίξεις C και E στο 0,1% της συγκέντρωσης εργασίας: ποσότητα σκόνης Bismuth/Metronidazole/Tetracycline HCl (140/125/125 mg) που αντιστοιχεί σε 25 mg μετρονιδαζόλης ζυγίστηκε με ακρίβεια και μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 50,0 mL. Στη συνέχεια προστέθηκαν 0,050 mL από κάθε πυκνό διάλυμα των προσμίξεων C και E. Ακολούθως προστέθηκαν 40 mL διαλύτη και το διάλυμα τοποθετήθηκε στους υπερήχους για 5 min. Τέλος το διάλυμα αραιώθηκε με διαλύτη έως τελικού όγκου και φιλτραρίστηκε μέσω PTFE 0,45 µm απορρίπτοντας τα πρώτα 2 mL.

- Unspecified προσμίξεις

Πυκνό πρότυπο διάλυμα μετρονιδαζόλης (499,7 $\mu\text{g/mL}$): λαμβάνοντας υπ' όψιν την καθαρότητα του προτύπου υλικού αναφοράς της μετρονιδαζόλης, 10,014 mg μετρονιδαζόλης ζυγίστηκαν με ακρίβεια και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 20,0mL. Διαλύθηκαν και αραιώθηκαν έως τελικού όγκου με το διαλύτη.

Εμβολιασμένο δείγμα με μετρονιδαζόλη στο 0,1% της συγκέντρωσης εργασίας: ποσότητα σκόνης placebo που αντιστοιχεί σε 25 mg μετρονιδαζόλης ζυγίστηκε με ακρίβεια και μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 50,0 mL. Στη συνέχεια προστέθηκαν 0,050 mL από το πυκνό πρότυπο διάλυμα μετρονιδαζόλης. Ακολούθως προστέθηκαν 40 mL διαλύτη και το διάλυμα τοποθετήθηκε στους υπερήχους για 5 min. Τέλος το διάλυμα αραιώθηκε με διαλύτη έως τελικού όγκου και φιλτραρίστηκε μέσω PTFE 0,45 μm απορρίπτοντας τα πρώτα 2 mL.

Τα αποτελέσματα της μελέτης επαναληψιμότητας για την πρόσμιξη Α παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 5.32: Αποτελέσματα επαναληψιμότητας για την πρόσμιξη Α

Εμβαδόν κορυφής πρόσμιξης Α στα εμβολιασμένα δείγματα	Control (%)	Συγκέντρωση που προστέθηκε ($\mu\text{g/mL}$)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\mu\text{g/mL}$)	Ανάκτηση (%)	Μέση τιμή ($\pm\text{SD}$)/ RSD %
131405	0,001	2,501	2,565	102,4	102,3(\pm0,2)/ 0,2
131429			2,566	102,4	
131507			2,567	102,4	
130851			2,554	101,9	
131015			2,558	102,1	
131397			2,565	102,4	

Η % σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) της % ανάκτησης της πρόσμιξης Α στα έξι δείγματα βρέθηκε ίση με 0,2.

Τα αποτελέσματα της μελέτης επαναληψιμότητας για την πρόσμιξη Β παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 5.33: Αποτελέσματα επαναληψιμότητας για την πρόσμιξη Β

Εμβαδόν κορυφής πρόσμιξης Β στα εμβολιασμένα δείγματα	Control (%)	Συγκέντρωση που προστέθηκε (μg/mL)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	Ανάκτηση (%)	Μέση τιμή (±SD)/ RSD %
21513	n/a	0,500	0,502	100,4	99,7 (±0,5)/ 0,5
21208			0,495	99,0	
21335			0,498	99,6	
21335			0,498	99,6	
21448			0,501	100,1	
21368			0,499	99,7	

Η % σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) της % ανάκτησης της πρόσμιξης Β στα έξι δείγματα βρέθηκε ίση με 0,5.

Τα αποτελέσματα της μελέτης επαναληψιμότητας για την πρόσμιξη C παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 5.34: Αποτελέσματα επαναληψιμότητας για την πρόσμιξη C

Εμβαδόν κορυφής πρόσμιξης C στα εμβολιασμένα δείγματα	Control (%)	Συγκέντρωση που προστέθηκε (μg/mL)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	Ανάκτηση (%)	Μέση τιμή (±SD)/ RSD %
15329	n/a	0,504	0,491	97,5	97,2 (±0,6)/ 0,6
15214			0,488	96,7	
15373			0,493	97,7	
15389			0,493	97,8	
15238			0,488	96,9	
15147			0,485	96,3	

Η % σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) της % ανάκτησης της πρόσμιξης C στα έξι δείγματα βρέθηκε ίση με 0,6.

Τα αποτελέσματα της μελέτης επαναληψιμότητας για την πρόσμιξη D παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 5.35: Αποτελέσματα επαναληψιμότητας για την πρόσμιξη D

Εμβαδόν κορυφής πρόσμιξης D στα εμβολιασμένα δείγματα	Control (%)	Συγκέντρωση που προστέθηκε (μg/mL)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	Ανάκτηση (%)	Μέση τιμή (±SD)/ RSD %
22038	n/a	0,501	0,498	99,5	99,2 (±0,3)/ 0,3
22038			0,498	99,5	
21956			0,496	99,1	
21897			0,495	98,8	
21961			0,496	99,1	
21967			0,497	99,1	

Η % σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) της % ανάκτησης της πρόσμιξης D στα έξι δείγματα βρέθηκε ίση με 0,3.

Τα αποτελέσματα της μελέτης επαναληψιμότητας για την πρόσμιξη E παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 5.36: Αποτελέσματα επαναληψιμότητας για την πρόσμιξη E

Εμβαδόν κορυφής πρόσμιξης E στα εμβολιασμένα δείγματα	Control (%)	Συγκέντρωση που προστέθηκε (μg/mL)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	Ανάκτηση (%)	Μέση τιμή (±SD)/ RSD %
19227	n/a	0,500	0,492	98,3	98,7 (±0,6)/ 0,6
19421			0,496	99,3	
19481			0,498	99,6	
19284			0,493	98,6	
19203			0,491	98,2	
19188			0,491	98,1	

Η % σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) της % ανάκτησης της πρόσμιξης E στα έξι δείγματα βρέθηκε ίση με 0,6.

Τα αποτελέσματα της μελέτης επαναληψιμότητας για την πρόσμιξη F παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 5.37: Αποτελέσματα επαναληψιμότητας για την πρόσμιξη F

Εμβασόν κορυφής πρόσμιξης F στα εμβολιασμένα δείγματα	Control (%)	Συγκέντρωση που προστέθηκε (μg/mL)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	Ανάκτηση (%)	Μέση τιμή (±SD)/ RSD %
16592	n/a	0,501	0,502	100,2	100,6 (±1,6)/ 1,6
16261			0,492	98,2	
17067			0,516	103,0	
16559			0,501	100,0	
16817			0,509	101,5	
16657			0,504	100,6	

Η % σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) της % ανάκτησης της πρόσμιξης F στα έξι δείγματα βρέθηκε ίση με 1,6.

Τα αποτελέσματα της μελέτης επαναληψιμότητας για την πρόσμιξη G παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 5.38: Αποτελέσματα επαναληψιμότητας για την πρόσμιξη G

Εμβασόν κορυφής πρόσμιξης G στα εμβολιασμένα δείγματα	Control (%)	Συγκέντρωση που προστέθηκε (μg/mL)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	Ανάκτηση (%)	Μέση τιμή (±SD)/ RSD %
19731	n/a	0,500	0,523	104,6	101,3 (±2,2)/ 2,1
19197			0,509	101,8	
19371			0,514	102,7	
18811			0,499	99,7	
18755			0,497	99,4	
18734			0,497	99,3	

Η % σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) της % ανάκτησης της πρόσμιξης G στα έξι δείγματα βρέθηκε ίση με 2,1.

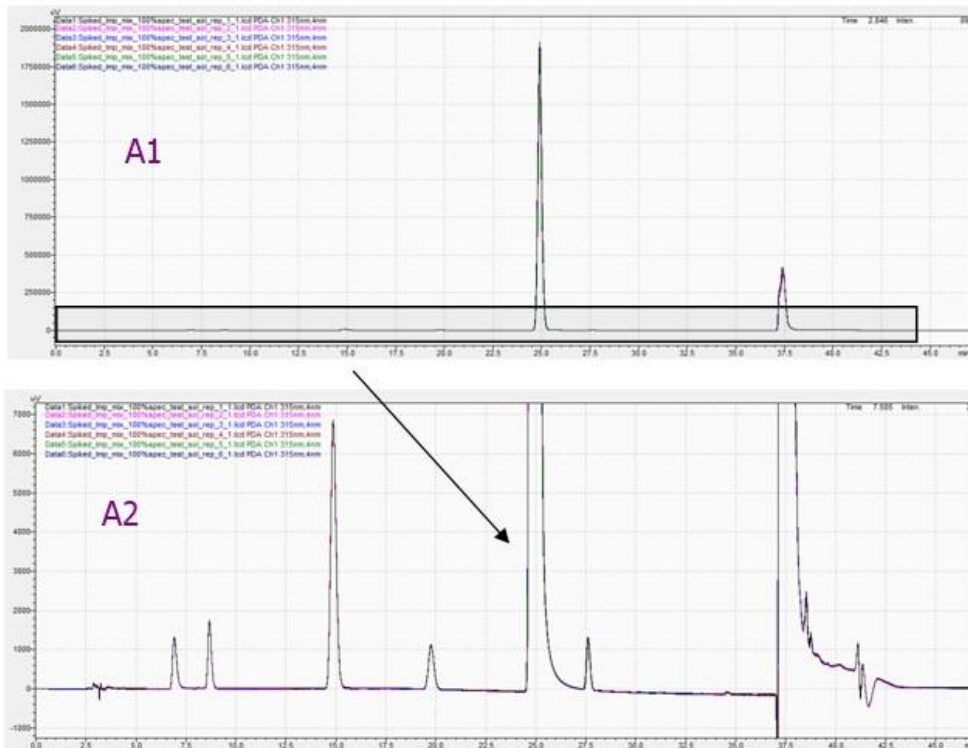
Τα αποτελέσματα της μελέτης επαναληψιμότητας για τις unspecified προσμίξεις παρουσιάζονται παρακάτω:

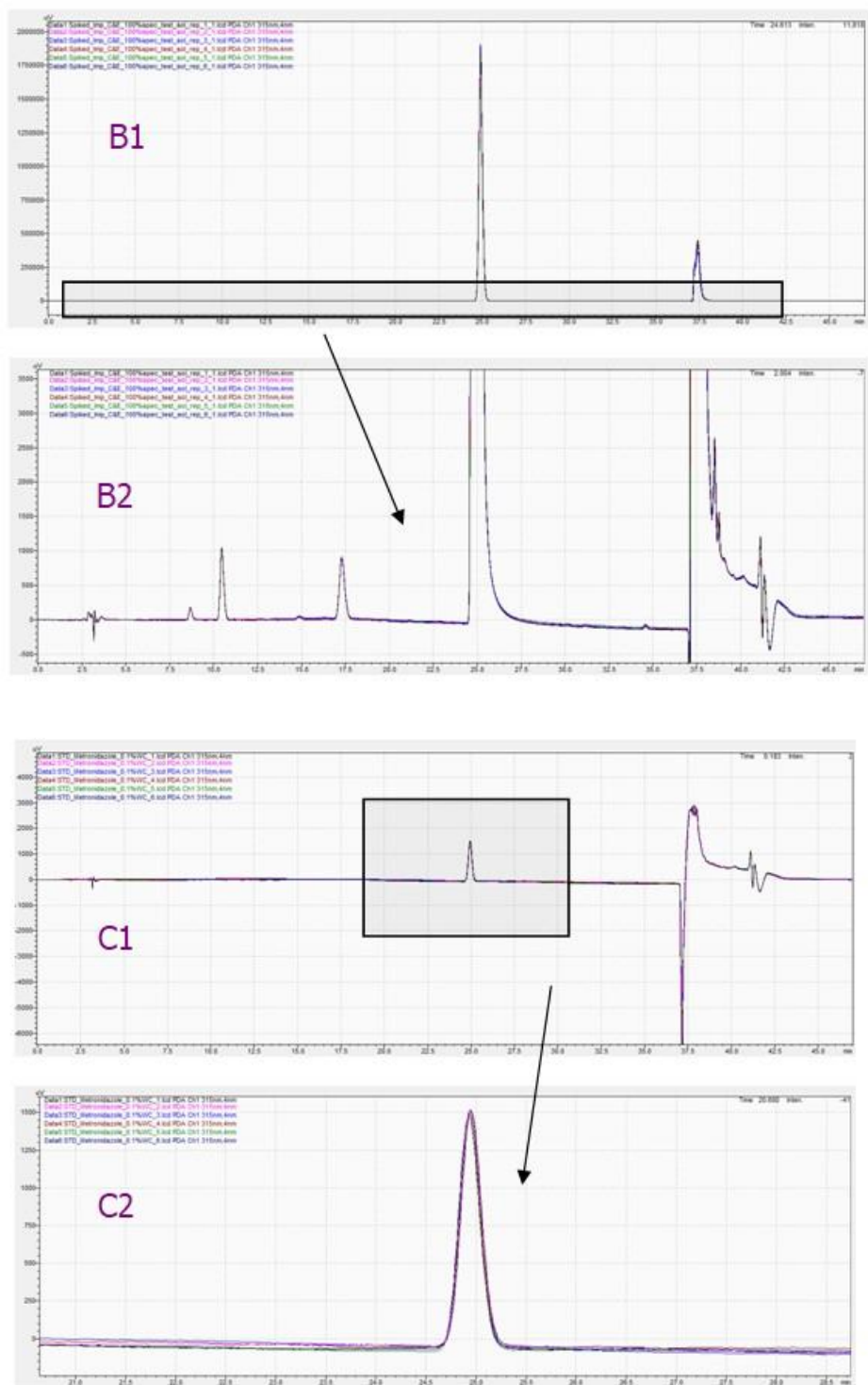
Πίνακας 5.39: Αποτελέσματα επαναληψιμότητας για τις unspecified προσμίξεις

Εμβαδόν κορυφής μετρονιδαζόλης στα εμβολιασμένα δείγματα	Συγκέντρωση που προστέθηκε (μg/mL)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	Ανάκτηση (%)	Μέση τιμή (±SD)/ RSD %
23504	0,500	0,505	101,0	101,5 (±1,1)/ 1,1
23950		0,514	102,9	
23586		0,506	101,4	
23428		0,503	100,7	
23325		0,501	100,2	
23925		0,514	102,8	

Η % σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) της % ανάκτησης των unspecified προσμίξεων στα έξι δείγματα βρέθηκε ίση με 1,1.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα των εμβολιασμένων δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη επαναληψιμότητας:





Εικόνα 5.23: Χρωματογραφήματα εμβολιασμένου δείγματος με πρόσμιξη A στο 0,5% της συγκέντρωσης εργασίας και προσμίξεις B,D,F,G στο 0,1% της συγκέντρωσης εργασίας (A), εμβολιασμένο δείγμα με προσμίξεις C και E στο 0,1% της συγκέντρωσης εργασίας (B), εμβολιασμένο δείγμα με μετρονιδαζόλη στο 0,1% της συγκέντρωσης εργασίας (C)

5.7 Πιστότητα

Η πιστότητα της αναλυτικής μεθόδου για κάθε πρόσμιξη αξιολογήθηκε σε τρία διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων. Ως μεσαίο επίπεδο επιλέχθηκε το όριο της προδιαγραφής για την κάθε πρόσμιξη και παρασκευάστηκε από ένα εμβολιασμένο δείγμα όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.6 της επαναληψιμότητας. Επιπλέον, παρασκευάστηκαν εμβολιασμένα δείγματα στο όριο ποσοτικοποίησης (LOQ, 0.01% της συγκέντρωσης εργασίας) και στο υψηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης από τη μελέτη γραμμικότητας. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω:

Πυκνό πρότυπο διάλυμα πρόσμιξης A (500,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$): όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2

Πυκνό πρότυπο διάλυμα πρόσμιξης B (500,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$): όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2

Πυκνό πρότυπο διάλυμα πρόσμιξης D (500,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$): όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2

Πυκνό πρότυπο διάλυμα πρόσμιξης F (501,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$): όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2

Πυκνό πρότυπο διάλυμα πρόσμιξης G (500,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$): όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2

Πρότυπο μίγμα 1 (10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$): μεταφέρετε 0,200 mL από κάθε πυκνό πρότυπο διάλυμα πρόσμιξης A, B, D, F, G σε ογκομετρική φιάλη των 10,0 mL και αραιώστε έως τελικού όγκου με διαλύτη.

Πυκνό πρότυπο διάλυμα πρόσμιξης C (504,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$): όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2

Πυκνό πρότυπο διάλυμα πρόσμιξης E (500,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$): όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2

Πρότυπο μίγμα 2 (10,1 και 10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$): μεταφέρετε 0,200 mL από κάθε πυκνό πρότυπο διάλυμα πρόσμιξης C, E σε ογκομετρική φιάλη των 10,0 mL και αραιώστε έως τελικού όγκου με διαλύτη.

Πυκνό πρότυπο διάλυμα μετρονιδαζόλης (499,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$): λαμβάνοντας υπ' όψιν την καθαρότητα του προτύπου υλικού αναφοράς της μετρονιδαζόλης, 10,014 mg μετρονιδαζόλης ζυγίστηκαν με ακρίβεια και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 20,0 mL. Διαλύθηκαν και αραιώθηκαν έως τελικού όγκου με το διαλύτη.

Ενδιάμεσο πρότυπο διάλυμα μετρονιδαζόλης (20,0 µg/mL): όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2

- Εμβολιασμένα δείγματα στο LOQ

Εμβολιασμένο δείγμα με τις προσμίξεις A, B, D, F, G στο 0,01% της συγκέντρωσης εργασίας: ποσότητα σκόνης Bismuth/Metronidazole/Tetracycline HCl (140/125/125 mg) που αντιστοιχεί σε 25 mg μετρονιδαζόλης ζυγίστηκε με ακρίβεια και μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 50,0 mL. Στη συνέχεια προστέθηκαν 0,250 mL από το πρότυπο μίγμα 1. Ακολούθως προστέθηκαν 40 mL διαλύτη και το διάλυμα τοποθετήθηκε στους υπερήχους για 5 min. Τέλος το διάλυμα αραιώθηκε με διαλύτη έως τελικού όγκου και φιλτραρίστηκε μέσω PTFE 0,45 µm απορρίπτοντας τα πρώτα 2 mL.

Εμβολιασμένο δείγμα με τις προσμίξεις C, E στο 0,01% της συγκέντρωσης εργασίας: ποσότητα σκόνης Bismuth/Metronidazole/Tetracycline HCl (140/125/125 mg) που αντιστοιχεί σε 25 mg μετρονιδαζόλης ζυγίστηκε με ακρίβεια και μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 50,0 mL. Στη συνέχεια προστέθηκαν 0,250 mL από το πρότυπο μίγμα 2. Ακολούθως προστέθηκαν 40 mL διαλύτη και το διάλυμα τοποθετήθηκε στους υπερήχους για 5 min. Τέλος το διάλυμα αραιώθηκε με διαλύτη έως τελικού όγκου και φιλτραρίστηκε μέσω PTFE 0,45 µm απορρίπτοντας τα πρώτα 2 mL.

Εμβολιασμένο δείγμα με μετρονιδαζόλη στο 0,01% της συγκέντρωσης εργασίας: ποσότητα σκόνης placebo που αντιστοιχεί σε 25 mg μετρονιδαζόλης ζυγίστηκε με ακρίβεια και μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 50,0 mL. Στη συνέχεια προστέθηκαν 0,125 mL από το ενδιάμεσο πρότυπο διάλυμα μετρονιδαζόλης (20,0 µg/mL). Ακολούθως προστέθηκαν 40 mL διαλύτη και το διάλυμα τοποθετήθηκε στους υπερήχους για 5 min. Τέλος το διάλυμα αραιώθηκε με διαλύτη έως τελικού όγκου και φιλτραρίστηκε μέσω PTFE 0,45 µm απορρίπτοντας τα πρώτα 2 mL.

- Εμβολιασμένα δείγματα στο υψηλό επίπεδο συγκέντρωσης

Εμβολιασμένο δείγμα με τις προσμίξεις A, B, D, F, G στο 0,6% της συγκέντρωσης εργασίας: ποσότητα σκόνης Bismuth/Metronidazole/Tetracycline HCl (140/125/125 mg) που αντιστοιχεί σε 25 mg μετρονιδαζόλης ζυγίστηκε με ακρίβεια και μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 50,0 mL. Στη συνέχεια προστέθηκαν 0,300 mL από το κάθε πυκνό διάλυμα πρόσμιξης A, B, D, F, G . Ακολούθως προστέθηκαν 38 mL διαλύτη και το διάλυμα τοποθετήθηκε στους υπερήχους για 5 min. Τέλος το διάλυμα αραιώθηκε με διαλύτη έως τελικού όγκου και φιλτραρίστηκε μέσω PTFE 0,45 µm απορρίπτοντας τα πρώτα 2 mL.

Εμβολιασμένο δείγμα με τις προσμίξεις C, E στο 0,6% της συγκέντρωσης εργασίας: ποσότητα σκόνης Bismuth/Metronidazole/Tetracycline HCl (140/125/125 mg) που αντιστοιχεί σε 25 mg μετρονιδαζόλης ζυγίστηκε με ακρίβεια και μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 50,0 mL. Στη συνέχεια προστέθηκαν 0,300 mL από το κάθε πυκνό διάλυμα πρόσμιξης C, E. Ακολούθως προστέθηκαν 40 mL διαλύτη και το διάλυμα τοποθετήθηκε στους υπερήχους για 5 min. Τέλος το διάλυμα αραιώθηκε με διαλύτη έως τελικού όγκου και φιλτραρίστηκε μέσω PTFE 0,45 μm απορρίπτοντας τα πρώτα 2 mL.

Εμβολιασμένο δείγμα με μετρονιδαζόλη στο 0,12% της συγκέντρωσης εργασίας: ποσότητα σκόνης placebo που αντιστοιχεί σε 25 mg μετρονιδαζόλης ζυγίστηκε με ακρίβεια και μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 50,0 mL. Στη συνέχεια προστέθηκαν 0,060 mL από το πυκνό πρότυπο διάλυμα μετρονιδαζόλης (499,7 μg/mL). Ακολούθως προστέθηκαν 40 mL διαλύτη και το διάλυμα τοποθετήθηκε στους υπερήχους για 5 min. Τέλος το διάλυμα αραιώθηκε με διαλύτη έως τελικού όγκου και φιλτραρίστηκε μέσω PTFE 0,45 μm απορρίπτοντας τα πρώτα 2 mL.

Τα αποτελέσματα της μελέτης πιστότητας για την πρόσμιξη A παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 5.40: Αποτελέσματα πιστότητας για την πρόσμιξη A

Εμβολιασμένο δείγμα (% συγκέντρωσης εργασίας)	Εμβαδόν κορυφής πρόσμιξης A στα εμβολιασμένα δείγματα	Control (%)	Συγκέντρωση που προστέθηκε (μg/mL)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	Ανάκτηση (%)
0,01 (LOQ)	2850	0,001	0,050	0,056	102,0
0,5	131405	0,001	2,501	2,565	102,4
0,6	157384	0,001	3,002	3,072	102,2

Τα αποτελέσματα της μελέτης πιστότητας για την πρόσμιξη B παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 5.41: Αποτελέσματα πιστότητας για την πρόσμιξη B

Εμβολιασμένο δείγμα (% συγκέντρωσης εργασίας)	Εμβαδόν κορυφής πρόσμιξης B στα εμβολιασμένα δείγματα	Control (%)	Συγκέντρωση που προστέθηκε (μg/mL)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	Ανάκτηση (%)
0,01 (LOQ)	2130	n/a	0,050	0,050	99,4
0,1	21513	n/a	0,500	0,502	100,4
0,6	129192	n/a	3,000	3,015	100,5

Τα αποτελέσματα της μελέτης πιστότητας για την πρόσμιξη C παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 5.42: Αποτελέσματα πιστότητας για την πρόσμιξη C

Εμβολιασμένο δείγμα (% συγκέντρωσης εργασίας)	Εμβαδόν κορυφής πρόσμιξης C στα εμβολιασμένα δείγματα	Control (%)	Συγκέντρωση που προστέθηκε (μg/mL)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	Ανάκτηση (%)
0,01 (LOQ)	1592	n/a	0,050	0,051	101,2
0,1	15329	n/a	0,504	0,491	97,5
0,6	92061	n/a	3,024	2,951	97,6

Τα αποτελέσματα της μελέτης πιστότητας για την πρόσμιξη D παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 5.43: Αποτελέσματα πιστότητας για την πρόσμιξη D

Εμβολιασμένο δείγμα (% συγκέντρωσης εργασίας)	Εμβαδόν κορυφής πρόσμιξης D στα εμβολιασμένα δείγματα	Control (%)	Συγκέντρωση που προστέθηκε (μg/mL)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	Ανάκτηση (%)
0,01 (LOQ)	2144	n/a	0,050	0,048	96,8
0,1	22038	n/a	0,501	0,498	99,5
0,6	133973	n/a	3,005	3,028	100,8

Τα αποτελέσματα της μελέτης πιστότητας για την πρόσμιξη E παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 5.44: Αποτελέσματα πιστότητας για την πρόσμιξη E

Εμβολιασμένο δείγμα (% συγκέντρωσης εργασίας)	Εμβαδόν κορυφής πρόσμιξης E στα εμβολιασμένα δείγματα	Control (%)	Συγκέντρωση που προστέθηκε (μg/mL)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	Ανάκτηση (%)
0,01 (LOQ)	1957	n/a	0,050	0,050	100,1
0,1	19227	n/a	0,500	0,492	98,3
0,6	116188	n/a	3,000	2,970	99,0

Τα αποτελέσματα της μελέτης πιστότητας για την πρόσμιξη F παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 5.45: Αποτελέσματα πιστότητας για την πρόσμιξη F

Εμβολιασμένο δείγμα (% συγκέντρωσης εργασίας)	Εμβαδόν κορυφής πρόσμιξης F στα εμβολιασμένα δείγματα	Control (%)	Συγκέντρωση που προστέθηκε (μg/mL)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	Ανάκτηση (%)
0,01 (LOQ)	1555	n/a	0,050	0,047	93,9
0,1	16592	n/a	0,501	0,502	100,2

0,6	99492	n/a	3,006	3,009	100,1
------------	-------	-----	-------	-------	--------------

Τα αποτελέσματα της μελέτης πιστότητας για την πρόσμιξη G παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 5.46: Αποτελέσματα πιστότητας για την πρόσμιξη G

Εμβολιασμένο δείγμα (% συγκέντρωσης εργασίας)	Εμβαδόν κορυφής πρόσμιξης G στα εμβολιασμένα δείγματα	Control (%)	Συγκέντρωση που προστέθηκε (μg/mL)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	Ανάκτηση (%)
0,01 (LOQ)	1751	n/a	0,050	0,046	92,8
0,1	19731	n/a	0,500	0,523	104,6
0,6	115318	n/a	3,000	3,057	101,9

Τα αποτελέσματα της μελέτης πιστότητας για τις unspecified προσμίξεις παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 5.47: Αποτελέσματα πιστότητας για τις unspecified προσμίξεις

Εμβολιασμένο δείγμα (% συγκέντρωσης εργασίας)	Εμβαδόν κορυφής μετρονιδαζόλης στα εμβολιασμένα δείγματα	Συγκέντρωση που προστέθηκε (μg/mL)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	Ανάκτηση (%)
0,01 (LOQ)	2777	0,050	0,060	119,3
0,1	23504	0,500	0,505	101,0
0,12	28278	0,600	0,607	101,3

Συμπέρασμα: Η % ανάκτηση των εμβολιασμένων δειγμάτων στο LOQ βρέθηκε εντός του 80,0-120,0%. Η % ανάκτηση των εμβολιασμένων δειγμάτων στο μεσαίο επίπεδο (όριο προδιαγραφής) και στο υψηλό επίπεδο συγκεντρώσεων βρέθηκε εντός του εύρους 90,0-110,0%.

5.8 Σταθερότητα διαλυμάτων

A. Πρότυπα διαλύματα

Ένα διάλυμα αναφοράς μετρονιδαζόλης παρασκευάστηκε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2 για τη μελέτη σταθερότητας.

Το παραπάνω διάλυμα εγχύθηκε πέντε φορές μετά την παρασκευή του (φρέσκο πρότυπο διάλυμα) και μία φορά έπειτα από 48 h αποθήκευσης στον αυτόματο δειγματολήπτη στους 5 °C (πρότυπο διάλυμα σταθερότητας). Ο παράγοντας similarity μεταξύ των δύο διαλυμάτων υπολογίστηκε σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{Similarity Factor} = \frac{Area_s}{Area_f} \times 100$$

Όπου:

A_s : το εμβαδόν της κορυφής του προτύπου διαλύματος σταθερότητας (48 h)

A_f : ο μέσος όρος των εμβαδών της κορυφής στις πέντε ενέσεις του φρέσκου προτύπου διαλύματος

Πίνακας 5.48: Αποτελέσματα σταθερότητας του προτύπου διαλύματος

Εμβαδόν κορυφής μετρονιδαζόλης στα φρέσκα παρασκευασμένα δείγματα	Εμβαδόν κορυφής μετρονιδαζόλης στο δείγμα σταθερότητας	% παράγοντας similarity
23313	23124	99,4
23342		
23267		
23141		
23239		
Μέσος όρος: 23271		

Συμπέρασμα: Ο παράγοντας similarity βρέθηκε εντός του εύρους 98,0 -102,0 %. Επομένως, το πρότυπο διάλυμα μετρονιδαζόλης παρουσιάζεται να παραμένει σταθερό για έως 48 h στους 5 °C.

B. Διάλυμα δείγματος

Ένα διάλυμα δείγματος παρασκευάστηκε και εγχύθηκε αμέσως (φρέσκο παρασκευασθέν δείγμα) και μία φορά έπειτα από 48 h αποθήκευσης στον αυτόματο δειγματολήπτη στους 5 °C (διάλυμα δείγματος σταθερότητας).

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης και ο υπολογισμός της απόλυτης διαφοράς του % περιεχομένου κάθε πρόσμιξης μεταξύ του φρέσκου και του διαλύματος σταθερότητας (48 h) παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 5.49: Αποτελέσματα σταθερότητας του δείγματος

% περιεχόμενο πρόσμιξης στο φρέσκο παρασκευασθέν δείγμα		% περιεχόμενο πρόσμιξης στο δείγμα σταθερότητας		Απόλυτη διαφορά έναντι του φρέσκου δείγματος	Κριτήριο αποδοχής (μέγιστη απόλυτη διαφορά)
Πρόσμιξη/RRT	%	Πρόσμιξη/RRT	%		
0,51	0,001	0,17	0,001	n/a	0,1
Impurity A	0,001	Impurity A	0,001	0,000	0,5
1,39	0,003	1,39	0,002	0,001	0,1

Συμπέρασμα: Η απόλυτη διαφορά του % περιεχομένου κάθε πρόσμιξης μεταξύ του φρέσκου και του διαλύματος σταθερότητας (48 h) βρέθηκε κάτω από το 20% του αντίστοιχου ορίου προδιαγραφής της εκάστοτε πρόσμιξης. Κατά συνέπεια τα διαλύματα του δείγματος μπορούν να θεωρηθούν σταθερά για έως 48 h στους 5 °C.

Συμπέρασμα

Με βάση την παρούσα διπλωματική εργασία αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μία μέθοδος για τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό πιθανών γνωστών αλλά και αγνώστων προσμίξεων της μετρονιδαζόλης σε σκεύασμα Υποκιτρικού καλιούχου βισμούθιου 140 mg/ Μετρονιδαζόλης 125 mg/ Υδροχλωρικής τετρακυκλίνης 125 mg. Η βελτιστοποίηση της αρχικής μεθόδου απαίτησε πολλές πειραματικές αλλαγές έως την επίτευξη του τελικού επιθυμητού αποτελέσματος. Η στρατηγική που ακολουθήθηκε μπορεί να εφαρμοστεί επιτυχώς και στην περίπτωση άλλων ενώσεων και των προσμίξεων αυτών με μεθόδους χρωματογραφίας αντιστρόφου φάσεως. Έπειτα από την αξιολόγηση της μεθόδου, η οποία μπορεί να θεωρηθεί και ως μία μικρή επικύρωση αυτής καθώς στηρίχθηκε στις διεθνείς οδηγίες του ICH [40], η μέθοδος φαίνεται να είναι ειδική, γραμμική, ακριβής και επαναλήψιμη, με τα διαλύματα να παρουσιάζουν επαρκή σταθερότητα για 48 h. Το επόμενο στάδιο θα είναι η πλήρης διεξαγωγή όλων των απαιτούμενων πειραμάτων για την επίσημη επικύρωση της μεθόδου.

Βιβλιογραφικές αναφορές:

- [1] J. Anderson, A. Berthod, V. Pino, and A. M. Stalcup, *Analytical Separation Science, 5 Volume Set*. John Wiley & Sons, 2016.
- [2] “HPLC - Definition, Principle, Parts, Types, Uses, Diagram,” Unacademy. Accessed: Jan. 10, 2024. [Online]. Available: <https://unacademy.com/content/nta-ugc/study-material/pharmaceutical-analysis/hplc-definition-principle-parts-types-uses-diagram/>
- [3] “Chromatography Fundamentals, Part VIII: The Meaning and Significance of Chromatographic Resolution.” Accessed: Jan. 10, 2024. [Online]. Available: <https://www.chromatographyonline.com/view/chromatography-fundamentals-part-viii-meaning-and-significance-chromatographic-resolution>
- [4] “[No title found],” *Res. J. Life Sci. Bioinforma. Pharm. Chem. Sci.*, vol. 2, no. 6.
- [5] “ k' – Retention or Capacity Factor,” Chemistry LibreTexts. Accessed: Jan. 10, 2024. [Online]. Available: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Analytical_Sciences_Digital_Library/Courseware/Separation_Science/02_Text/04_Fundamental_Resolution_Equation/03_k__Retention_or_Capacity_Factor](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Analytical_Sciences_Digital_Library/Courseware/Separation_Science/02_Text/04_Fundamental_Resolution_Equation/03_k__Retention_or_Capacity_Factor)
- [6] S. S. H. Solutions, “Back-to-Basics: Selectivity,” Separation Science. Accessed: Jan. 10, 2024. [Online]. Available: <https://www.sepscience.com/back-to-basics-3-selectivity/>
- [7] H. Barth, “Chromatography Fundamentals, Part V: Theoretical Plates: Significance, Properties, and Uses,” *LCGC N. Am.*, vol. 36, no. 11, pp. 830–835, Nov. 2018.
- [8] “Factors Affecting Resolution in HPLC.” Accessed: Jan. 10, 2024. [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/small-molecule-hplc/factors-affecting-resolution-in-hplc>
- [9] C. Today, “What is Peak Tailing?,” Chromatography Today. Accessed: Jan. 10, 2024. [Online]. Available: <https://www.chromatographytoday.com/news/autosamplers/36/breaking-news/what-is-peak-tailing/31253>
- [10] “What Causes Peak Tailing in HPLC,” Chrom Tech, Inc. Accessed: Jan. 10, 2024. [Online]. Available: <https://chromtech.com/what-causes-peak-tailing-in-hplc/>
- [11] Dr. S. Bhardwaj, “A Review: HPLC Method Development and Validation,” Nov. 2015.
- [12] S. Kromidas, *HPLC Made to Measure: A Practical Handbook for Optimization*. John Wiley & Sons, 2008.
- [13] S. Schuster, W. Johnson, J. DeStefano, and J. Kirkland, “Methods for Changing Peak Resolution in HPLC: Advantages and Limitations,” *LCGC Suppl.*, vol. 31, no. 4, pp. 10–18, Apr. 2013.
- [14] S. Kromidas, *Optimization in HPLC: Concepts and Strategies*. John Wiley & Sons, 2021.
- [15] K. M. Kalili and A. de Villiers, “Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds,” *J. Sep. Sci.*, vol. 34, no. 8, pp. 854–876, 2011, doi: 10.1002/jssc.201000811.
- [16] M. Locatelli, D. Melucci, G. Carlucci, and C. Locatelli, “Recent Hplc Strategies to Improve Sensitivity and Selectivity for the Analysis of Complex Matrices,” *Instrum. Sci. Technol.*, vol. 40, no. 2–3, pp. 112–137, Mar. 2012, doi: 10.1080/10739149.2011.651668.
- [17] S. Karmarkar, R. Garber, Y. Genchanok, S. George, X. Yang, and R. Hammond, “Quality by Design (QbD) Based Development of a Stability Indicating HPLC Method for Drug and Impurities,” *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 49, no. 6, pp. 439–446, Jul. 2011, doi: 10.1093/chrscl/49.6.439.
- [18] A. Staff, “Real Solutions to Improve Your HPLC Peak Resolution,” AnalyteGuru. Accessed: Jan. 10, 2024. [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/blog/analyteguru/real-solutions-to-improve-your-hplc-peak-resolution/>

- [19] J. Clark, "Using High Temperature HPLC for Improved Analysis," *Pharm. Technol. Eur.*, vol. 16, no. 5, May 2004, Accessed: Jan. 06, 2024. [Online]. Available: <https://www.pharmtech.com/view/using-high-temperature-hplc-improved-analysis>
- [20] C. Today, "Using Different HPLC Column Chemistries To Maximise Selectivity For Method Development," *Chromatography Today*. Accessed: Jan. 10, 2024. [Online]. Available: <http://www.chromatographytoday.com/article/hplc-uhplc/31/advanced-chromatography-technologies/using-different-hplc-column-chemistries-to-maximise-selectivity-for-method-development/2432>
- [21] K. G. Kraiczek, G. P. Rozing, and R. Zengerle, "Relation between Chromatographic Resolution and Signal-to-Noise Ratio in Spectrophotometric HPLC Detection," *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 10, pp. 4829–4835, May 2013, doi: 10.1021/ac4004387.
- [22] "Γαληνός - Δραστική ουσία - Μετρονιδαζόλη - Χορήγηση." Accessed: Jan. 10, 2024. [Online]. Available: <https://www.galinos.gr/web/drugs/main/substances/metronidazole/usage>
- [23] S. Veldhuyzen Van Zanten *et al.*, "Bismuth-based triple therapy with bismuth subcitrate, metronidazole and tetracycline in the eradication of *Helicobacter pylori*: a randomized, placebo controlled, double-blind study," *Can. J. Gastroenterol. J. Can. Gastroenterol.*, vol. 14, no. 7, pp. 599–602, 2000, doi: 10.1155/2000/690307.
- [24] "Bismuth subcitrate potassium / Metronidazole / Tetracycline hydrochloride - paediatric investigation plan | European Medicines Agency." Accessed: Jan. 10, 2024. [Online]. Available: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/paediatric-investigation-plans/bismuth-subcitrate-potassium-metronidazole-tetracycline-hydrochloride>
- [25] D. Matmour, N. Hamoum, K. F. E. Hassam, Y. Merad, and N. H. Ziani, "Analysis of Seven Drug Related Impurities in Six Samples of Metronidazole API by High Performance Liquid Chromatography," *J. Trace Elem. Miner.*, vol. 3, p. 100048, Mar. 2023, doi: 10.1016/j.jtemin.2023.100048.
- [26] "Metronidazole Tablets USP." Accessed: Jan. 10, 2024. [Online]. Available: <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/fda/fdaDrugXsl.cfm?setid=9219588b-0a99-40b9-bdd4-ced6d6efebed&type=display>
- [27] A. Kashif, Safdar, S. Baqir, S. Naqvi, S. Gauhar, and A. Jabbar, "DEVELOPMENT AND VALIDATION OF RP-HPLC-UV ANALYTICAL METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF METRONIDAZOLE," *J. Chem. Soc. Pak.*, vol. 3, Jun. 2014.
- [28] R. Nogueira *et al.*, "Development studies of a new metronidazole certified reference material," *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 23, pp. 435–444, Mar. 2012, doi: 10.1590/S0103-50532012000300009.
- [29] "Quantitation of Metronidazole in Pharmaceutical Suspension Using High Performance Liquid Chromatographic Method - ProQuest." Accessed: Jan. 06, 2024. [Online]. Available: <https://www.proquest.com/openview/eb9c4b4c214074d6f9f2ecda50395f85/1?pq-origsite=gscholar&cbl=616534>
- [30] M. Piponski, T. Bakovska, M. Naumoska, T. Rusevska, G. T. Serafimovska, and H. Andonoska, "Preliminary Investigation of the Possibility for Implementation of Modified Pharmacopoeial HPLC Methods For Quality Control Of Metronidazole And Ciprofloxacin In Medicinal Products Used In Veterinary Medicine," *Maced. Vet. Rev.*, vol. 38, no. 1, pp. 31–42, Mar. 2015, doi: 10.14432/j.macvetrev.2014.11.029.
- [31] F. S. Aleanizy, H. Al-Eid, E. El Tahir, F. Alqahtani, and O. Al-Gohary, "Stability and in vitro dissolution studies of metronidazole tablets and infusions," *Dissolution Technol.*, vol. 24, no. 2, pp. 22–27, 2017, doi: 10.14227/DT240217P22.
- [32] T. E. Rivers, H. A. McBride, and J. M. Trang, "Stability of cefazolin sodium and metronidazole at 8°C for use as an IV admixture," *J. Parenter. Sci. Technol.*, vol. 47, no. 3, pp. 135–137, 1993.

- [33] S. Zietsman, G. Kilian, M. Worthington, and C. Stubbs, "Formulation development and stability studies of aqueous metronidazole benzoate suspensions containing various suspending agents," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 33, no. 2, pp. 191–197, 2007, doi: 10.1080/03639040601011215.
- [34] Y. V. Pramar, T. K. Mandal, L. A. Bostanian, G. Le, T. C. Morris, and R. A. Graves, "Physicochemical and Microbiological Stability of Compounded Metronidazole Suspensions in PCCA SuspendIt," *Int. J. Pharm. Compd.*, vol. 25, no. 2, pp. 169–175, 2021.
- [35] N. T. Vu *et al.*, "Stability of metronidazole benzoate in SyrSpend SF one-step suspension system," *Int. J. Pharm. Compd.*, vol. 12, no. 6, pp. 558–564, 2008.
- [36] M. Blessy, R. D. Patel, P. N. Prajapati, and Y. K. Agrawal, "Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs—A review," *J. Pharm. Anal.*, vol. 4, no. 3, pp. 159–165, Jun. 2014, doi: 10.1016/j.jpha.2013.09.003.
- [37] K. Chandramore and S. Sonawane, "Overview on Development and Validation of Force degradation studies with Stability Indicating Methods.," *Biosci. Biotechnol. Res. Asia*, vol. 19, no. 4, pp. 881–894, Dec. 2022, doi: 10.13005/bbra/3039.
- [38] M. Sharma and M. Murugesan, "Forced Degradation Study an Essential Approach to Develop Stability Indicating Method," *J. Chromatogr. Sep. Tech.*, vol. 08, Jan. 2017, doi: 10.4172/2157-7064.1000349.
- [39] D. N. Venkatesh, "Forced Degradation – A Review," *Biomed. J. Sci. Tech. Res.*, vol. 47, no. 3, Nov. 2022, doi: 10.26717/BJSTR.2022.47.007492.
- [40] J. Abraham, "International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use," in *Handbook of Transnational Economic Governance Regimes*, C. Tietje and A. Brouder, Eds., Brill | Nijhoff, 2010, pp. 1041–1053. doi: 10.1163/ej.9789004163300.i-1081.897.