



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Έλεγχος ποιότητας δισκίων Ρανιτιδίνης»

Επιβλέπων καθηγητής : Μιχαήλ Κουππάρης

Καράϊσκου Άννα (ΑΜ : 201200037)

Φιολιτάκη Ευαγγελία (ΑΜ : 201200107)

ΑΘΗΝΑ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2016



NATIONAL AND KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS

SCHOOL OF SCIENCE

FACULTY OF CHEMISTRY

Laboratory of Analytical Chemistry

DIPLOMA THESIS

«Quality Control of Ranitidine Tablets»

Supervisor : Michael Koupparis

Karaiskou Anna

Fiolitaki Evangelia

ATHENS
September 2016

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία με τίτλο «Έλεγχος Ποιότητας Δισκίων Ρανιτιδίνης» πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας στα πλαίσια του προπτυχιακού προγράμματος σπουδών του τμήματος Χημείας.

Αρχικά παρουσιάζονται γενικές πληροφορίες για τα φαρμάκα, καθώς και τους ελέγχους στους οποίους υπόκεινται. Έπειτα, περιγράφεται αναλυτικά η τεχνική της Υδροχρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) καθώς επίσης και κάποιοι άλλοι τύποι χρωματογραφίας και οι βασικές αρχές και παράμετροι αυτών.

Στη συνέχεια περιγράφεται η προετοιμασία ενός δείγματος φαρμάκου, η οργανολογία της HPLC και οι διαδικασίες που ακολουθήθηκαν για να γίνουν οι απαραίτητοι έλεγχοι.

Τέλος, παρουσιάζονται πληροφορίες για το εξεταζόμενο φάρμακο, την Υδροχλωρική Ρανιτιδίνη, τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της πτυχιακής εργασίας, όλα τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες, η επικυρωμένη μέθοδος για τον έλεγχο της ρανιτιδίνης, καθώς και τα αποτελέσματα που πάρθηκαν και τα συμπεράσματα που εξήχθησαν.

ABSTRACT

This diploma thesis entitled “Quality Control of Ranitidine Tablets” was carried out in the laboratory of Analytical Chemistry in the frame of the undergraduate degree curriculum for Chemistry.

Initially, general information of medicines and their quality control, they are subject to, are presented. Afterwards, the technique of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) is described and some other types of chromatography, as well as their basic principles and their parameters are reported.

Then, the preparation of a drug sample in order to perform all the necessary controls is described.

Finally, the basic knowledge of ranitidine, and the instrumentation which was used during the thesis is presented along with all the reagents and the solvents, the validated method used, as well as the results obtained and the conclusions of the controls.

Ευχαριστίες

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε ιδιαιτέρως τον επιβλέποντα καθηγητή, κ. Μιχαήλ Κουμπάρη, καθηγητή Αναλυτικής Χημείας – Φαρμακευτικής Ανάλυσης του Πανεπιστημίου Αθηνών, για την ανάθεση της εργασίας και για την καθοδήγηση του καθ' όλη τη διάρκειά της.

Επίσης, ευχαριστούμε την κ. Κατερίνα Κάκου και όλους εκείνους που μας βοήθησαν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μας εργασίας.

Τέλος, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τις οικογένειές μας και το φιλικό μας περιβάλλον που πάντα είναι στο πλευρό μας και μας στηρίζουν.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.	Φάρμακο	2
1.1.1.	Ταξινόμηση φαρμάκων	2
1.2.	Έλεγχος Ποιότητας	3
1.3.	Χημικός έλεγχος πρώτων υλών	4
1.3.1.	Ταυτοποίηση	4
1.3.2.	Έλεγχος Καθαρότητας	5
1.3.3.	Έλεγχος περιεκτικότητας πρώτων υλών (Assay)	6
1.4.	Έλεγχος τελικών φαρμακευτικών προϊόντων	7
1.4.1.	Χημικός έλεγχος	7
1.4.2.	Φαρμακοτεχνικός έλεγχος	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)		
2.1.	Ιστορική αναδρομή και εξέλιξη της τεχνικής HPLC	8
2.2.	Αρχή τεχνικής	9
2.3.	Μηχανισμοί και είδη HPLC	11
2.3.1.	Χρωματογραφία προσρόφησης	11
2.3.2.	Χρωματογραφία κατανομής	12
2.3.3.	Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής	12
2.3.4.	Χρωματογραφία Συγγένειας	12
2.4.	Βασικές χρωματογραφικές αρχές και παράμετροι	13
2.4.1.	Σταθερά κατανομής (μερισμού)	13
2.4.2.	Ασυμμετρία κορυφής	13
2.4.3.	Διεύρυνση ζώνης και απόδοση χρωματογραφικής στήλης	15
2.4.3.1.	Η έννοια των θεωρητικών πλακών	15
2.4.3.2.	Κινητικές θεωρίες	17
2.4.4.	Χρόνος ανάσχεσης – κατακράτησης	22
2.4.5.	Όγκος ανάσχεσης	23
2.4.6.	Εύρος και ημιεύρος κορυφής	23
2.4.7.	Ταχύτητα μετανάστευσης	24
2.4.8.	Παράγοντας κατακράτησης	25

2.4.9.	Παράγοντας εκλεκτικότητας	25
2.4.10.	Διαχωριστικότητα – Διαχωριστική ικανότητα	26
2.4.11.	Παραμόρφωση χρωματογραφικής ζώνης	27
2.4.12.	Βελτιστοποίηση διαχωρισμών	28

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1.	Προετοιμασία δείγματος	30
3.2.	Τεχνικές προκατεργασίας δείγματος	31
3.2.1.	Τεχνικές διαλυτοποίησης	31
3.2.2.	Κλασικές Τεχνικές ανάλυσης	31
3.2.3.	Σύγχρονες τεχνικές ανάλυσης	33
3.2.4.	Τεχνικές εκχύλισης στις οποίες δεν χρησιμοποιείται διαλύτης (solvent free)	33
3.2.5.	Άμεσες τεχνικές – μικροδιαπίδυση (microdialysis)	37
3.2.6.	Τεχνικές εναλλαγής στηλών	38
3.3.	Ποσοτικοποίηση στη χρωματογραφική ανάλυση	38
3.3.1.	Τεχνική ενός εξωτερικού προτύπου	39
3.3.2.	Τεχνική πολλαπλών εξωτερικών προτύπων (καμπύλης αναφοράς)	39
3.3.3.	Τεχνική προσθήκης γνωστής ποσότητας	40
3.3.4.	Τεχνική εσωτερικού προτύπου	40
3.3.5.	Μέθοδος κανονικοποίησης (normalization)	41

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4.1.	Οργανολογία	42
4.1.1.	Δοχεία κινητής φάσης και συστήματα επεξεργασίας διαλυτών	42
4.1.2.	Συστήματα άντλησης	43
4.1.3.	Σύστημα εισαγωγής του δείγματος στη στήλη	44
4.1.4.	Στήλες υγροχρωματογραφίας	45
4.1.5.	Υλικά πλήρωσης	45
4.1.6.	Ανιχνευτές	46
4.1.6.1.	Οπτικοί ανιχνευτές	47
4.1.6.2.	Ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές	49
4.1.6.3.	Ανιχνευτής φασματομετρίας μαζών	50
4.1.7.	Ολοκληρωτής – Καταγραφέας	51

4.2.	Επικύρωση μεθόδου	52
4.2.1.	Ακρίβεια	52
4.2.2.	Πιστότητα (Precision)	52
4.2.3.	Γραμμικότητα	53
4.2.4.	Εύρος γραμμικής περιοχής	53
4.2.5.	Ευαισθησία	54
4.2.6.	Όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD)	54
4.2.7.	Όριο ποσοτικής αποτίμησης (Limit of quantitation, LOQ)	55
4.2.8.	Ανθεκτικότητα (Ruggedness)	55
4.2.9.	Αντοχή (Robustness)	55
4.2.10.	Εκλεκτικότητα (Selectivity)	55
4.2.11.	Εξειδίκευση (Specificity)	56

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5.1	Αντιελκωτικά φάρμακα	57
5.2	Ανταγωνιστές των H ₂ υποδοχέων	58
5.3	Ρανιτιδίνη C ₁₃ H ₂₂ ClN ₄ O ₃ S	59
5.3.1	Μηχανισμός δράσης της ρανιτιδίνης	61
5.3.2	Κλινικές ενδείξεις	62
5.3.3	Δοσολογία και τρόπος χορήγησης	62
5.3.4	Υπεροδοσολογία	64
5.3.5	Ειδικές προειδοποιήσεις και προφυλάξεις κατά τη χρήση	65
5.3.6	Αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα	66
5.3.7	Κύηση και γαλουχία	67
5.3.8	Ανεπιθύμητες ενέργειες	67
5.3.9	Φαρμακοκινητικές ιδιότητες	70

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

6.1.	Όργανα	72
6.1.1.	Χρωματογράφοι	72
6.1.2.	Αναλυτικός ζυγός	73
6.1.3.	Πεχάμετρο	74
6.1.4.	Συσκευή υπερήχων	74

6.1.5.	Συσκευή ελέγχου διαλυτότητας	74
6.2.	Διαλύτες	74
6.3.	Αντιδραστήρια	75
6.4.	Υλικά αναφοράς	75

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

7.1	Εμφάνιση (Appearance)	76
7.2	Μέση μάζα (Average mass)	76
7.2.1	Διαδικασία	76
7.2.2	Υπολογισμοί	76
7.2.3	Προδιαγραφές	77
7.3	Διακύμανση βάρους / Ομοιομορφία μάζας (Weight variation / Uniformity of mass)	77
7.3.1	Διαδικασία	77
7.3.2	Υπολογισμοί	77
7.3.3	Προδιαγραφές	77
7.4	Ταυτοποίηση ρανιτιδίνης	78
7.4.1	TLC	78
7.4.1.1	Παράμετροι μεθόδου	78
7.4.1.2	Δοαδικασία ανίχνευσης	79
7.4.1.3	Αξιολόγηση	79
7.5	Έλεγχος περιεκτικότητας (Assay)	79
7.5.1	Παράμετροι μεθόδου	79
7.5.2	Υπολογισμοί	80
7.6	Διαλυτότητα (Dissolution)	81
7.6.1	Παράμετροι μεθόδου	81
7.6.2	Υπολογισμοί	82
7.6.3	Προδιαγραφές	82
7.7.	Ομοιομορφία περιεχομένου (Content uniformity)	83
7.7.1	Παράμετροι μεθόδου	84

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

8.1	Μέσο βάρος (Average weight)	85
8.1.1.	Δισκία των 150 mg/tab	85
8.1.2	Δισκία των 300 mg/tab (Batch No.4590616)	86

8.1.3 Δισκία των 300 mg/tab (Batch No.4600616)	87
8.2 Διακύμανση βάρους / Ομοιομορφία μάζας (Weight variation/Uniformity of mass)	88
8.2.1 Δισκία των 150 mg/tab	88
8.2.2 Δισκία των 300 mg/tab (Batch No.4590616)	88
8.2.3 Δισκία των 300 mg/tab (Batch No.4600616)	89
8.3 Ταυτοποίηση ρανιτιδίνης (Identification of ranitidine)	89
8.4 Έλεγχος περιεκτικότητας (Assay)	90
8.4.1 Δισκία των 150 mg/tab	90
8.4.2 Δισκία των 300 mg/tab (Batch No.4590616)	90
8.4.3 Δισκία των 300 mg/tab (Batch No.4600616)	90
8.5 Διαλυτότητα (Dissolution)	92
8.5.1 Δισκία των 150 mg/tab	92
8.5.2 Δισκία των 300 mg/tab (Batch No.4590616)	92
8.5.3 Δισκία των 300 mg/tab (Batch No.4600616)	92
8.6 Ομοιομορφία περιεχομένου (Content uniformity)	92
8.6.1 Δισκία των 150 mg/tab	92
8.6.2 Δισκία των 300 mg/tab (Batch No.4590616)	92
8.6.3 Δισκία των 300 mg/tab (Batch No.4600616)	92
ΑΝΑΦΟΡΕΣ	94

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Φάρμακο^[1]

Γενικά, φάρμακο, ονομάζεται κάθε χημική ουσία, ικανή να επηρεάσει τη λειτουργία του οργανισμού κάθε έμβιου όντος ή μικροοργανισμού, όταν εισέλθει σε αυτόν. Απλούστερα, χαρακτηρίζεται κάθε ουσία ή παρασκεύασμα που ανακουφίζει, είτε θεραπεύει, από ασθένειες ή πόνους του ανθρώπινου οργανισμού και γενικότερα αποκαθιστά την ανθρώπινη υγεία.

Σύμφωνα με τον ορισμό του *Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization – WHO)*, φάρμακο χαρακτηρίζεται: «Κάθε ουσία ή μίγμα ουσιών, που παράγεται, προσφέρεται προς πώληση, ή παρουσιάζεται για χρήση στη διάγνωση, στη θεραπεία, στο μετριασμό ή στην πρόληψη νόσου, μη φυσιολογικής φυσικής κατάστασης, ή των συμπτωμάτων τους στον άνθρωπο ή στα ζώα, καθώς και για χρήση στην αποκατάσταση, την διόρθωση, ή τη μεταβολή οργανικών λειτουργιών στον άνθρωπο ή τα ζώα».

1.1.1. Ταξινόμηση Φαρμάκων

Η ταξινόμηση γενικά των διαφόρων φαρμακευτικών προϊόντων βασίζεται στα παρακάτω κριτήρια:

- ✓ Χημική ταξινόμηση, δηλαδή από τη χημική ομάδα στην οποία μπορεί αυτά να ανήκουν, π.χ. αλκαλοειδή
- ✓ Φαρμακολογική ταξινόμηση, από τη φαρμακολογική τους δράσης, π.χ. αναλγητικά, σπασμολυτικά, αντιμικροβιακά, αναισθητικά
- ✓ Θεραπευτική ταξινόμηση, εκ της θεραπευτικής τους δράσης, π.χ. αντικαταθλιπτικά, ανθελονοσιακά, αγχολυτικά
- ✓ Σύνθετη ταξινόμηση, εκ της παθήσεως του λειτουργικού συστήματος ή οργάνου για το οποίο χορηγούνται και του επιδιωκόμενου σκοπού, π.χ. αντισηπτικά, αντιχολινεργικά, καθαρικά, αποχρεμπτικά, βλεννολυτικά

Δευτερευόντως, από τη μορφή διάθεσής τους προς χρήση, π.χ. δισκία, σκόνη, σταγόνες, υπόθετα, ενέσιμα, οροί, εμβόλια.

Σημειώνεται ότι η φαρμακολογική ταξινόμηση και η θεραπευτική ταξινόμηση των φαρμάκων διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους, με δεδομένο ότι κάποια φάρμακα με διαφορετικό μηχανισμό δράσης μπορεί να παρουσιάσουν ίδιο θεραπευτικό αποτέλεσμα.

Στην Ελλάδα η ταξινόμηση των φαρμακευτικών προϊόντων, όπως προσδιορίζεται από τον Ε.Ο.Φ. γίνεται με βάση τις παθήσεις των συστημάτων και οργάνων δια των οποίων χορηγούνται, αλλά και της δράσης αυτών. Ο σύνθετος αυτός τρόπος ταξινόμησης είναι προσαρμοσμένος με εκείνον του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ.).

1.2. Έλεγχος Ποιότητας

Ποιότητα (quality): Στα φάρμακα, η ποιότητα εκφράζει το βαθμό ανταπόκρισης ενός φαρμακευτικού προϊόντος στη σκοπούμενη χρήση και στις προδιαγραφές που έχουν τεθεί.

Έλεγχος ποιότητας είναι το μέρος εκείνο των κανόνων ορθής παρασκευής που ασχολείται με τη δειγματοληψία, τις προδιαγραφές, τις δοκιμασίες και με την οργάνωση, τεκμηρίωση και τις διαδικασίες αποδέσμευσης που εξασφαλίζουν ότι εκτελούνται πράγματι οι αναγκαίες και σχετικές δοκιμασίες και ότι τα υλικά δεν αποδεσμεύονται προς χρήση, ούτε τα προϊόντα διατίθενται προς πώληση ή διάθεση, μέχρις ότου κριθεί ότι η ποιότητά τους είναι ικανοποιητική.

Βασικές απαιτήσεις ελέγχου ποιότητας που προκύπτουν από Κοινοτικές και Εθνικές οδηγίες:

1. Για τη δειγματοληψία, τον έλεγχο και τις δοκιμασίες των πρώτων υλών, υλικών συσκευασίας, ενδιάμεσων, χύμα και τελικών προϊόντων και όπου είναι σκόπιμο για τον έλεγχο περιβαλλοντικών συνθηκών για την τήρηση των GMP, διατίθενται επαρκή μέσα, εκπαιδευμένο προσωπικό και εγκεκριμένες διαδικασίες.

2. Τα δείγματα των πρώτων υλών, υλικών συσκευασίας, ενδιάμεσων και τελικών προϊόντων λαμβάνονται από ειδικευμένο προσωπικό με μεθόδους εγκεκριμένες από τον έλεγχο ποιότητας.
3. Οι μέθοδοι ελέγχου υπόκεινται σε έλεγχο αξιοπιστίας (επικύρωση).
4. Τηρούνται στοιχεία που καταδεικνύουν ότι εκτελέστηκαν πράγματι όλες οι διαδικασίες που απαιτούνται για δειγματοληψία και έλεγχο. Κάθε απόκλιση καταγράφεται και διερευνάται λεπτομερώς.
5. Τα τελικά προϊόντα περιέχουν δραστικά συστατικά σύμφωνα με την ποιοτική και ποσοτική σύσταση που καθορίζεται στην άδεια κυκλοφορίας, είναι της απαιτούμενης καθαρότητας και τοποθετούνται στον κατάλληλο περιέκτη με τη σωστή επισήμανση.
6. Τηρούνται στοιχεία για τα αποτελέσματα της επιθεώρησης και διενεργείται υπεύθυνη εκτίμηση των αποτελεσμάτων των δοκιμών των υλικών συσκευασίας, των ενδιάμεσων, χύμα και τελικών προϊόντων ως προς τις προδιαγραφές. Η εκτίμηση του προϊόντος περιλαμβάνει εξέταση και αξιολόγηση σχετικών με την παραγωγή εγγράφων στοιχείων και εκτίμηση πιθανών αποκλίσεων από καθορισμένες διαδικασίες.
7. Καμία παρτίδα προϊόντος δεν αποδεσμεύεται για πώληση ή διάθεση πριν να υπάρξει πιστοποίηση από ειδικευμένο πρόσωπο ότι είναι σύμφωνο με τις απαιτήσεις της άδειας κυκλοφορίας.
8. Τηρούνται επαρκή δείγματα-μάρτυρες πρώτων υλών και προϊόντων, ώστε να είναι δυνατή η μελλοντική εξέταση του προϊόντος, εφόσον χρειασθεί και το προϊόν κρατείται στην τελική του συσκευασία εκτός και αν παράγεται σε εξαιρετικά μεγάλες συσκευασίες.

1.3. Χημικός έλεγχος πρώτων υλών^[2]

Ως **πρώτες ύλες** θεωρούνται όλα τα συστατικά του φαρμακευτικού προϊόντος και αν είναι ανάγκη και ο περιέκτης. Ακολουθούν τα είδη του χημικού ελέγχου:

1.3.1. Ταυτοποίηση

Αποτελεί σειρά δοκιμασιών (ελέγχων) που περιλαμβάνονται στη μονογραφία μίας πρώτης ύλης ή προϊόντος στη Φαρμακοποιία με τις οποίες επιδιώκεται η απόδειξη της ταυτότητας της δραστικής ουσίας. Ο έλεγχος της ταυτότητας γίνεται με την επιβεβαίωση:

- ✓ Φυσικών ιδιοτήτων: (φυσικές σταθερές), σημείο τήξης, σημείο ζέσεως, δείκτης διάθλασης, διαλυτότητα, ειδική στροφική ικανότητα
- ✓ Χημικών ιδιοτήτων: χαρακτηριστικές αντιδράσεις χημικών ομάδων και κατιόντων ή ανιόντων
- ✓ Φυσικοχημικών ιδιοτήτων: φάσματα υπεριώδους, υπερύθρου και ποιοτικά χαρακτηριστικά χρωματογραφημάτων (R_f και χρόνοι κατακράτησης)

1.3.2. Έλεγχος καθαρότητας

Με αυτούς διαπιστώνεται η καθαρότητα της φαρμακευτικής ουσίας με δοκιμασίες για την ύπαρξη προσμίξεων, δηλαδή ουσιών που προβλέπεται να συνυπάρχουν στην πρώτη ύλη, ως υπολείμματα αντιδραστηρίων παρασκευής ή παραπροϊόντων. Ιδιαίτερα ελέγχεται η παρουσία προσμίξεων που δύνανται να έχουν επιβλαβή ενέργεια. Οι προσμίξεις διακρίνονται σε:

- ✓ Προσμίξεις που επιτρέπονται σε ανεκτά όρια
- ✓ Προσμίξεις που η παρουσία τους είναι ανεπίτρεπτη

Στους ελέγχους καθαρότητας εξετάζονται τα εξής:

- ✓ pH
- ✓ εμφάνιση διαλύματος
- ✓ απορρόφηση
- ✓ ειδική στροφή
- ✓ οξύτητα
- ✓ συγγενείς ουσίες
- ✓ τέφρα
- ✓ αριθμός οξέων (I_A)
- ✓ αριθμός σαπωνοποίησης (I_S)
- ✓ αριθμός εστέρων (I_E)

- ✓ αριθμός ιωδίου (I_I)
- ✓ αριθμός υπεροξειδίων (I_P)
- ✓ αριθμός υδροξυλίων (I_{OH})
- ✓ ασαπωνοποίηση

Γίνονται επίσης οι έλεγχοι:

- ✓ απώλεια κατά την ξήρανση
- ✓ προσδιορισμός νερού
- ✓ έλεγχος παρουσίας και ορίου βαρέων μετάλλων
- ✓ έλεγχοι ορίων ανόργανων ιόντων
- ✓ έλεγχος ορίων υπολειμμάτων διαλυτών στις πρώτες ύλες

1.3.3. Έλεγχος περιεκτικότητας πρώτων υλών (Assay)^[2]

Αποτελεί το σημαντικότερο τμήμα του ελέγχου, καθώς διαπιστώνεται αν η περιεκτικότητα της πρώτης ύλης σε δραστικό συστατικό είναι σύμφωνη με τις προδιαγραφές της μονογραφίας. Αν η περιεκτικότητα της πρώτης ύλης σε φάρμακο είναι εκτός των ορίων, σημαίνει ότι η καθαρότητα της πρώτης ύλης δεν είναι αποδεκτή ή ότι έχει επέλθει διάσπαση του φαρμάκου.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των φαρμάκων σε πρώτες ύλες γίνεται με διάφορες τεχνικές, ανάλογα με το είδος του χημικού συστατικού. Έτσι χρησιμοποιούνται τόσο ογκομετρικές, όσο και ενόργανες τεχνικές. Κατά την επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου πρέπει να λαμβάνονται υπόψη η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα της μεθόδου, η ύπαρξη ουσιών αναφοράς (ΧΟΑ), η δυνατότητα εξαγωγής συμπερασμάτων για όρια συγγενών ουσιών και η διαλυτότητα της ουσίας σε διαλύτες. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι οι εξής:

- ✓ Μη υδατικές ογκομετρήσεις
- ✓ Υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης
- ✓ Φασματοφωτομετρία υπεριώδους
- ✓ Υδατικές ογκομετρήσεις διαφόρων τύπων
- ✓ Φασματοφωτομετρία ορατού μετά από χαρακτηριστικές αντιδράσεις

- ✓ Αεριοχρωματογραφία για πτητικές ουσίες ή ουσίες που μετατρέπονται σε πτητικές
- ✓ Φασματομετρία ατομικής απορρόφησης για φάρμακα άλατα μετάλλων
- ✓ Φθορισμομετρία κλπ

1.4. Έλεγχος τελικών φαρμακευτικών προϊόντων^[2]

Ο έλεγχος των τελικών φαρμακευτικών προϊόντων περιλαμβάνει τον προσδιορισμό ταυτότητας και ποσοτικό προσδιορισμό των δραστικών συστατικών, αλλά και των εκδόχων. Ο έλεγχος γίνεται δειγματοληπτικά χρησιμοποιώντας κατάλληλες μεθόδους, οι οποίες εξασφαλίζουν ότι τα ληφθέντα δείγματα είναι όσο το δυνατόν αντιπροσωπευτικότερα του συνόλου της παραγωγής. Τα θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα του ελέγχου οδηγούν στην απελευθέρωση ή την απόσυρση των προϊόντων.

Οι κυριότεροι έλεγχοι που γίνονται στα έτοιμα φαρμακευτικά προϊόντα παρατίθενται παρακάτω.

1.4.1. Χημικός έλεγχος

Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για το χημικό έλεγχο των έτοιμων φαρμακευτικών προϊόντων είναι αντίστοιχες με αυτές που παρατέθηκαν στον έλεγχο περιεκτικότητας των πρώτων υλών (1.3.3.). Σκοπός τους είναι ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των δραστικών ουσιών και άλλων συστατικών των φαρμακευτικών προϊόντων. Κατά κύριο λόγο χρησιμοποιείται υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), φασματοφωτομετρία UV/Vis και η αεριοχρωματογραφία (GC), τεχνικές με υψηλή ευαισθησία και χαμηλά όρια ανίχνευσης.

1.4.2. Φαρμακοτεχνικός έλεγχος

Αποσκοπεί στον έλεγχο της κατάλληλης φαρμακοτεχνικής συμπεριφοράς του σκευάσματος και συνίσταται κυρίως στον έλεγχο αποσάθρωσης και διαλυτοποίησης στερεών μορφών (π.χ. δισκία, καψάκια, υπόθετα κλπ), στον έλεγχο ομοιομορφίας περιεχομένου και μάζας σκευασμάτων και τέλος στον έλεγχο ευθρυπτότητας δισκίων.

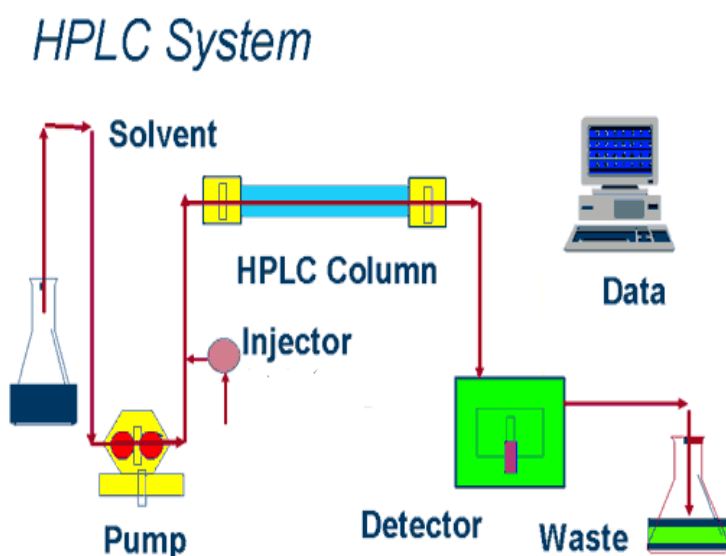
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)

2.1. Ιστορική αναδρομή και εξέλιξη της τεχνικής HPLC^[3]

Οι πρώτες εμπορικά διαθέσιμες, χρωματογραφικές συσκευές εμφανίστηκαν στη δεκαετία του 1970. Η Χρωματογραφία Ανοιχτής Στήλης, η Χρωματογραφία Χάρτη και η Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας αποτέλεσαν τις πρώτες χρωματογραφικές τεχνικές επιτυγχάνοντας αρχικά ένα σημαντικό αριθμό χρωματογραφικών διαχωρισμών. Οι συγκεκριμένες τεχνικές αν και βοήθησαν καταλυτικά στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς παρουσίαζαν μια σειρά σημαντικών μειονεκτημάτων, με βασικότερο το γεγονός ότι ήταν ανεπαρκείς για τον προσδιορισμό κάποιων ενώσεων και για το διαχωρισμό παρόμοιων συστατικών.

Το γεγονός αυτό συνετέλεσε στην επέκταση της χρήσης της Υγροχρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (Πίεσης) (HPLC) με την οποία επιτυγχάνονταν μικρότεροι χρόνοι ανάλυσης αν και παρέμειναν ερωτηματικά κατά πόσο έπρεπε να χρησιμοποιείται σταθερή ροή ή σταθερή πίεση. Στο σχήμα 2.1. δίνεται το διάγραμμα συστήματος HPLC.



Σχήμα 2.1. Διάγραμμα συστήματος HPLC

Ο όρος HPLC εισήχθη από τον καθηγητή Csaba Horvath το 1970 και αρχικά η τεχνική αναφερόταν ως Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης. Η υψηλή πίεση χρησιμοποιήθηκε για τη επίτευξη μεγαλύτερης ροής στις στήλες υγροχρωματογραφίας με στόχο να μειωθεί ο χρόνος της διαδικασίας διαχωρισμού. Στην αρχή, οι αντλίες είχαν ικανότητα πίεσης μόνο 500 psi (35 bar). Οι αρχές της δεκαετίας του 1970 έφεραν ένα τεράστιο άλμα στην τεχνολογία. Νέα όργανα HPLC μπορούσαν να αναπτύξουν έως 6.000 psi (400 bar) πίεση, και είχαν ενσωματωμένα βελτιωμένα συστήματα εισαγωγής, ανιχνευτές, και στήλες. Η HPLC άρχισε να κερδίζει έδαφος από τα μέσα έως τα τέλη της δεκαετίας του 1970. Με τη συνεχή πρόοδο στην απόδοση κατά τη διάρκεια αυτών των ετών (μικρότερα σωματίδια, ακόμη υψηλότερη πίεση), ο όρος HPLC παρέμεινε ο ίδιος, αλλά το όνομα άλλαξε σε Υγροχρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance).

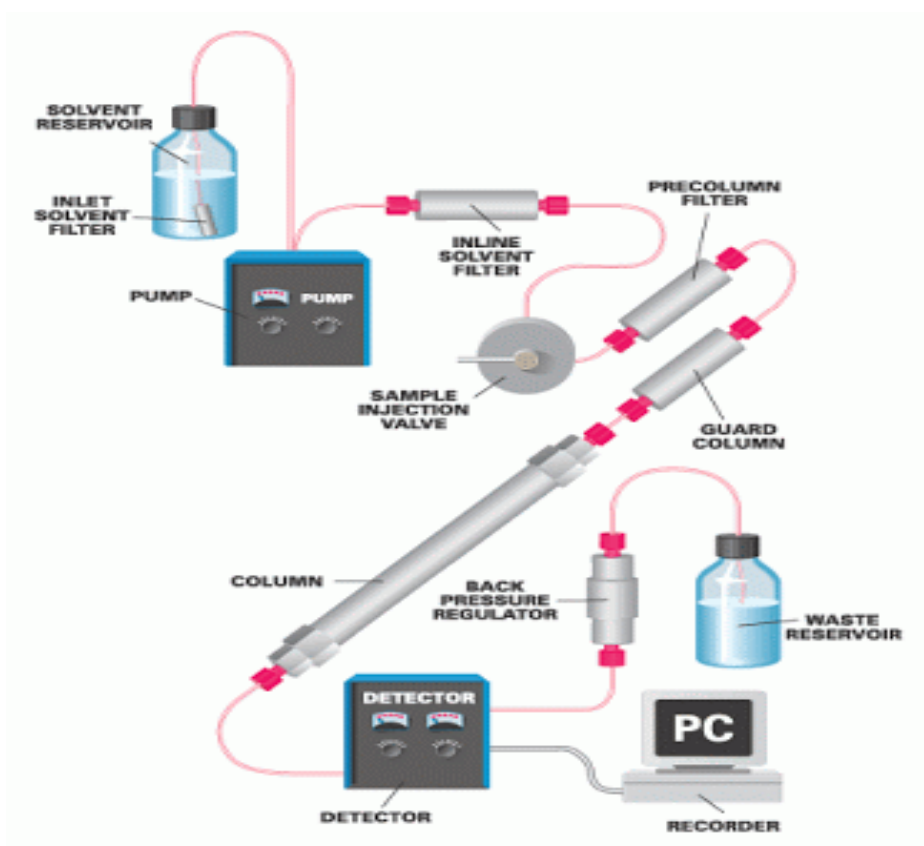
Η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης είναι τώρα ένα από τα πιο ισχυρά εργαλεία στην αναλυτική χημεία. Έχει τη δυνατότητα να διαχωρίσει, να ανιχνεύσει και να προσδιορίσει ποσοτικά το σύνολο των ενώσεων που υπάρχουν σε οποιοδήποτε δείγμα που μπορεί να διαλυθεί σε ένα υγρό. Σήμερα, ενώσεις σε ίχνη, με συγκεντρώσεις, τόσο χαμηλές, όσο μέρη ανά τρισεκατομμύριο (ppt), μπορούν εύκολα να προσδιοριστούν.

Η HPLC μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ποικίλα είδη δειγμάτων, όπως φαρμακευτικά προϊόντα, τρόφιμα, καλλυντικά, περιβαλλοντικά, ιατροδικαστικά δείγματα, βιομηχανικά χημικά προϊόντα και πετρελαϊκά μίγματα.

2.2. Αρχή τεχνικής^[4]

Η Υγροχρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης ανήκει στις χρωματογραφικές τεχνικές, γεγονός που συνεπάγεται ότι ο διαχωρισμός αποτελεί αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης μιας στατικής και μιας κινητής φάσης. Το δείγμα εισάγεται στην κορυφή της στήλης και με τη βοήθεια της κινητής φάσης τα υπό προσδιορισμό συστατικά (αναλύτες) μετακινούνται με τη μορφή ζωνών και τελικά εκκλύονται το ένα μετά το άλλο. Οι προσδιοριζόμενες ενώσεις μερίζονται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης, με αποτέλεσμα να μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της στήλης. Οι δύο

φάσεις επιλέγονται έτσι, ώστε τα συστατικά του δείγματος να μερίζονται σε διαφορετικό βαθμό μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης. Ο μερισμός αυτός εξαρτάται από τη σύσταση και τις ιδιότητες της κινητής φάσης, το είδος και τις ιδιότητες της στατικής φάσης, τις διαμοριακές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των δυο φάσεων, καθώς και από τη θερμοκρασία. Τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση κινούνται αργά κατά την ροή της κινητής φάσης. Αντίθετα, τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ασθενέστερα από τη στατική φάση, κινούνται ταχύτερα. Δηλαδή, η ταχύτητα με την οποία θα μεταφερθεί η κάθε ουσία κατά μήκος της κινητής φάσης, είναι ανάλογη της σχετικής συγγένειας της ουσίας ως προς τις δύο φάσεις. Στο σχήμα 2.2. δίδεται η διάταξη της υγροχρωματογραφίας.



Σχήμα 2.2. Διάταξη υγροχρωματογραφίας

Στη συγκεκριμένη τεχνική είναι δυνατή η χρήση μίγματος διαλυτών, καθώς και η βαθμιαία μεταβολή της σύστασης της κινητής φάσης. Θα πρέπει παράλληλα να σημειωθεί ότι στην HPLC είναι εφικτή η χρησιμοποίηση στηλών σε σειρά,

ούτως ώστε να επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός των συστατικών του εξεταζόμενου μίγματος.

Οι χρωματογραφικές στήλες γεμίζονται με τόσο μικρά σωματίδια, που χρειάζονται μεγάλες πιέσεις για να δώσουν την επιθυμητή ταχύτητα ροής. Για αυτό το λόγο στα σύγχρονα όργανα υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης χρησιμοποιούνται αντλίες υψηλής πίεσης και βελτιωμένα συστήματα συνεχούς παροχής διαλύτη. Επίσης για την εισαγωγή του δείγματος στη στήλη, χρησιμοποιείται ένας δειγματολήπτης, όπου η εισαγωγή του δείγματος στο ρεύμα της κινητής φάσης μέσα στη στήλη γίνεται αυτόματα με εγχυτήρες βρόχου.

Ο εντοπισμός των διαχωρισμένων ενώσεων πλέον δεν μπορεί να γίνει με γυμνό μάτι, και για αυτό χρησιμοποιούνται ανιχνευτές. Ένας κατάλληλος ανιχνευτής έχει την ικανότητα να ανιχνεύει την παρουσία μιας ένωσης και να στείλει αντίστοιχο ηλεκτρικό σήμα σε έναν υπολογιστή.

Μία επιλογή γίνεται μεταξύ πολλών διαφορετικών τύπων ανιχνευτών, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά και τις συγκεντρώσεις των ενώσεων που πρέπει να διαχωριστούν και να αναλυθούν.

Τελικά η κινητή φάση εξέρχεται από τον ανιχνευτή και μπορεί να αποσταλεί στα απόβλητα, ή να συλλεχθεί.

2.3. Μηχανισμοί και είδη HPLC^[5,6]

2.3.1. Χρωματογραφία Προσρόφησης

Ο διαχωρισμός των διαφόρων ουσιών βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό προσρόφησης στη στατική φάση. Οι κυριότερες αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι ηλεκτροστατικής φύσης. Η χρωματογραφία προσρόφησης βρίσκει εφαρμογή στο διαχωρισμό ουσιών με παρόμοια δομή, αλλά με διαφορετική πολικότητα. Ανάλογα με τη σχέση πολικότητας μεταξύ στατικής και κινητής φάσης διακρίνονται δύο είδη χρωματογραφικής προσρόφησης:

- ✓ Χρωματογραφία Κανονικής Φάσης: Εδώ η στατική φάση (συνήθως SiO_2 ή Al_2O_3) είναι πολικότερη από την κινητή, η οποία αποτελείται από μη πολικούς διαλύτες, όπως εξάνιο, χλωροφόρμιο.
- ✓ Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης: Εδώ, η στατική φάση, που είναι λιγότερο πολική της κινητής, αποτελείται από οξειδίο πυριτίου συζευγμένο με διάφορες ομάδες, όπως αλκύλια, φαινύλιο, διόλες, αμινομάδες, ενώ η κινητή φάση αποτελείται από μείγματα οργανικών διαλυτών με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα και νερό.

2.3.2. Χρωματογραφία Κατανομής

Ο διαχωρισμός στηρίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μείγματος μεταξύ κινητής και της υγρής στατικής φάσης και εφαρμόζεται στην ανάλυση ομόλογων, μη ιοντικών ενώσεων και στο μηχανισμό αυτό διακρίνονται δύο τύποι κανονικής και αντίστροφης φάσης.

2.3.3. Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής

Ο διαχωρισμός οφείλεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των προσδιοριζόμενων ιόντων και των φορτισμένων ομάδων της στατικής φάσης. Οι κυριότερες παράμετροι που καθορίζουν τη συγκράτηση στη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής είναι το αντίθετο ιόν της δραστικής ομάδας της στατικής φάσης, η ιοντική ισχύς, το pH, ο τροποποιητής της κινητής φάσης και η θερμοκρασία.

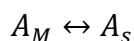
2.3.4. Χρωματογραφία Συγγένειας

Για την επίτευξη του διαχωρισμού, οι προσδιοριζόμενες ενώσεις δεσμεύονται εκλεκτικά σε υποκαταστάτες, οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι στην επιφάνεια του διοξειδίου του πυριτίου. Στην κατηγορία αυτή ανήκει η Χρωματογραφία Εναντιομερών, η οποία αποκτά αυξανόμενο ενδιαφέρον και με την οποία διαχωρίζονται εναντιομερείς μορφές ενώσεων που παρουσιάζουν χειρομορφία. Σημαντική εφαρμογή της τεχνικής αυτής είναι ο προσδιορισμός αντιγόνου και αντισωμάτων

2.4. Βασικές χρωματογραφικές αρχές και παράμετροι^[7-9]

2.4.1. Σταθερά κατανομής (μερισμού)

Αν θεωρήσουμε πως έχουμε μια προσδιοριζόμενη ουσία A, μετά την εισαγωγή του δείγματος στη στήλη, η ουσία A θα μερισθεί μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης σύμφωνα με την ισορροπία που ακολουθεί:



όπου A_M είναι η ουσία στην κινητή φάση και A_S είναι η ουσία στη στατική φάση. Η “αντίδραση” αυτή χαρακτηρίζεται από την αντίστοιχη σταθερά ισορροπίας K_A για την οποία είναι γνωστό ότι ισχύει:

$$K_A = \frac{c_S}{c_M} \quad (2.1)$$

όπου c_S είναι η γραμμομοριακή συγκέντρωση της ουσίας A στη στατική φάση και c_M η γραμμομοριακή συγκέντρωση της ουσίας A στην κινητή φάση. Η σταθερά K_A ονομάζεται **σταθερά κατανομής** (ορθότερα μερισμού) της ουσίας A.

2.4.2. Ασυμμετρία κορυφής

Αν και η θεωρητική μελέτη προβλέπει συμμετρία για τις χρωματογραφικές κορυφές, οι λαμβανόμενες κορυφές είναι κατά κανόνα όχι πλήρως συμμετρικές και παραμορφώνονται σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό, δημιουργώντας «ουρές» (tailing) ή μέτωπα (frontings). Οι παραμορφώσεις αυτές οφείλονται σε πολλούς παράγοντες, με κυριότερους τους ακόλουθους:

- ✓ Ελλειπής πλήρωση της χρωματογραφικής στήλης
- ✓ Επιπλέον όγκοι πέραν της στήλης
- ✓ Υπερφόρτωση στήλης
- ✓ Χημική παραμόρφωση από ασυμβατότητα του αναλύτη, είτε με τη στατική, είτε με την κινητή φάση

- ✓ Ισχυρά ενεργοποιημένη στατική φάση στη χρωματογραφία προσροφήσεως.

Ο υπολογισμός της ασυμμετρίας μιας χρωματογραφικής κορυφής γίνεται, είτε με ολοκληρωτή, είτε υπολογιστικά με πιο εμπειρικό τρόπο. Στην πρώτη περίπτωση υπολογίζονται τα ολοκληρώματα:

$$M_2 = \sigma^2 = \frac{1}{A} \int_0^{\infty} Ct^2 dt - t_R^2$$
$$M_3 = \frac{1}{A} \int_0^{\infty} C(t^2 - t_R^2) dt \quad (2.2)$$

και στη συνέχεια η ασυμμετρία της κορυφής δίνεται από τη σχέση:

$$\gamma = \frac{M_3}{(M_2)^{0,67}} \quad (2.3)$$

Στη δεύτερη περίπτωση ο υπολογισμός του παράγοντα ασυμμετρίας ή συμμετρίας ή ουράς ($A_{s,f}$) γίνεται με σύγκριση του εύρους του ενός τμήματος της καμπύλης b_f σε καθορισμένο ποσοστό του ύψους με το αντίστοιχο έμπροσθεν τμήμα a_f στο ίδιο ύψος :

$$A_{s,f} = \frac{b_f}{a_f} \quad (2.4)$$

Σύμφωνα με την πρόσφατη έκδοση της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας, ο παράγοντας συμμετρίας υπολογίζεται από τη σχέση:

$$A_{s,f} = \frac{w_{0,05}}{2d} \quad (2.5)$$

Όπου $w_{0,05}$: το εύρος κορυφής στο 1/20 του ύψους κορυφής και d : η απόσταση της κατακόρυφου που φέρεται από το μέγιστο κορυφής και του έμπροσθεν άκρου της κορυφής στο 1/20 του ύψους.

2.4.3. Διεύρυνση ζώνης και απόδοση χρωματογραφικής στήλης

2.4.3.1. Η έννοια των θεωρητικών πλακών

Σύμφωνα με τη θεωρία των πλακών, η αναλυτική στήλη διαιρείται κατά μήκος αυτής σε υποθετικές ζώνες, και κάθε ζώνη έχει τέτοιο μήκος, ώστε εντός αυτής να υπάρχει ισορροπία (διασπορά) μεταξύ στατικής και κινητής φάσης. Η ζώνη αυτή καλείται θεωρητική πλάκα και το μήκος αυτής ύψος ισοδύναμο προς μια θεωρητική πλάκα (ΥΙΘΠ ή H). Η θεωρητική πλάκα είναι μια φανταστική έννοια που απλά εισάγεται για τη διευκόλυνση της μελέτης των πραγματικών παραμέτρων. Ο αριθμός N των θεωρητικών πλακών για μια στήλη μήκους L δίνεται από την σχέση

$$N = \frac{L}{H} \quad (2.6)$$

Το ΥΙΘΠ (H), συνδέεται απευθείας με το μήκος της στήλης L και την τυπική απόκλιση σ της κορυφής του χρωματογραφήματος, βάσει των σχέσεων που ακολουθούν, όπου η διακύμανση εκφράζεται είτε σε μονάδες μήκους (σ_L^2), είτε σε μονάδες χρόνου (σ_t^2).

$$H = \frac{\sigma_t^2 L}{t_R^2} \text{ και } H = \frac{\sigma_L^2}{L} \quad (2.7)$$

Ο αριθμός των θεωρητικών πλακών N , είναι συνάρτηση του τρόπου πλήρωσης της στήλης, της φύσης της ουσίας, της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης, της θερμοκρασίας, της μεθόδου εισαγωγής δείγματος, κλπ. Για τη σύγκριση της αποδοτικότητας δύο στηλών, ο αριθμός θεωρητικών πλακών της κάθε στήλης θα πρέπει να υπολογιστεί με βάση τις μετρήσεις της ίδιας ένωσης. Τα τελικά συμπεράσματα από τη θεωρία των πλακών είναι:

- ✓ Αύξηση του μήκους της στήλης, δηλ. του αριθμού N , οδηγεί σε αύξηση του χρόνου και του όγκου ανάσχεσης.
- ✓ Για ένα καθορισμένο μήκος στήλης, ο διαχωρισμός είναι τόσο αποτελεσματικότερος, όσο μικρότερο είναι το ΥΙΘΠ (H).
- ✓ Από δύο στήλες εκείνη που έχει μεγαλύτερο αριθμό θεωρητικών πλακών, N , θα δίνει οξύτερες κορυφές και συνεπώς καλύτερο διαχωρισμό μεταξύ ουσιών που έχουν παραπλήσιους όγκους (χρόνους) ανάσχεσης.

- ✓ Επειδή, για δεδομένη στήλη, το εύρος W μιας κορυφής είναι ανάλογο με τον όγκο ανάσχεσης, V_R , οι κορυφές συνεχώς θα διευρύνονται από την αρχή έως το τέλος του χρωματογραφήματος. Παρατεταμένη έκλυση εκφυλίζει την κανονική κατανομή της κορυφής.
- ✓ Το πλάτος της κορυφής είναι ανεξάρτητο του μεγέθους του δείγματος αρκεί η στήλη να μη φτάσει σε κατάσταση κορεσμού.

Η απόδοση μιας χρωματογραφικής στήλης σε πολλές περιπτώσεις καθορίζεται από τον αριθμό θεωρητικών πλακών (N), ο οποίος πρόκειται για αριθμητικό παράγοντα που εκφράζει τον αριθμό των διαδοχικών ισορροπιών στις οποίες συμμετέχει ένα συστατικό, καθώς διέρχεται μέσω της χρωματογραφικής στήλης. Ορίζεται ως το τετράγωνο του λόγου του χρόνου ανασχέσεως προς την τυπική απόκλιση της κορυφής.

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2 \quad (2.8)$$

Θεωρητικά, ο αριθμός θεωρητικών πλακών για πληρωμένες στήλες έχει αμελητέα εξάρτηση από τον παράγοντα χωρητικότητας, για αυτό και χαρακτηρίζει κάθε χρωματογραφική στήλη.

Για τον αριθμό των θεωρητικών πλακών ισχύουν τα ακόλουθα:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W}\right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}}\right)^2 \quad (2.9)$$

Όπως προαναφέρθηκε, οι λαμβανόμενες χρωματογραφικές κορυφές δεν παρουσιάζουν την προβλεπόμενη κατά Gauss συμμετρία. Αν ληφθεί υπόψη η ασυμμετρία της κορυφής, τότε ο αριθμός των θεωρητικών πλακών δίνεται από τη σχέση:

$$N = 41,7 \cdot \frac{\left(\frac{t_R}{w_{0,1}}\right)}{\left(\frac{a_f}{b_f} + 1,25\right)} \quad (2.10)$$

όπου $w_{0,1}$ το εύρος της κορυφής στο ένα δέκατο του συνολικού ύψους της. Εάν αντί του χρόνου t_R χρησιμοποιηθεί ο ανηγμένος χρόνος t_R' λαμβάνεται ο αποτελεσματικός αριθμός θεωρητικών πλακών N_{eff} .

Ο αριθμός των θεωρητικών πλακών είναι ευθέως ανάλογος με το μήκος της στήλης (L) και αντιστρόφως ανάλογος με τη διάμετρο των σωματιδίων του πληρωτικού υλικού (dp), ενώ το ισοδύναμο προς μία θεωρητική πλάκα ύψος προσδιορίζεται από τη σχέση: $H=L/N$. Στη διεύρυνση της χρωματογραφικής κορυφής εκτός από τη χρωματογραφική στήλη συντελούν και άλλοι παράγοντες, όπως ο εισαγωγέας δείγματος, ο ανιχνευτής και οι σωληνώσεις συνδέσεως του συστήματος.

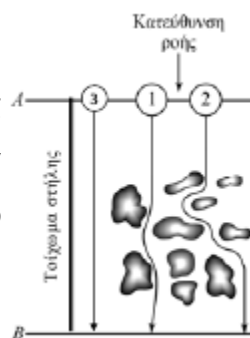
2.4.3.2 Κινητικές θεωρίες

Η θεωρία των πλακών ερμήνευσε με επιτυχία το σχήμα των χρωματογραφικών κορυφών, ωστόσο απέτυχε να ερμηνεύσει τη διεύρυνσή τους κατά τη διαδρομή του αναλύτη στη στήλη. Έτσι, αντικαταστάθηκε από την κινητική θεωρία, η οποία ερμήνευσε με επιτυχία τόσο τη διεύρυνση των χρωματογραφικών κορυφών, όσο και την επίδραση σε αυτή διάφορων παραγόντων. Η κινητική θεωρία εκφράζεται με πολλές εξισώσεις, με πιο αξιόπιστη την εξίσωση Van Deemter (σχέση 2.).

Ακολουθεί η αναλυτική παρουσίαση του κάθε όρου της εξίσωσης.

A: Όρος πολλαπλότητας διαδρομών ροής ή στροβιλώδης διάχυση (eddy = στροβιλώδης)

Η στροβιλώδης διάχυση οφείλεται στην πολλαπλότητα διαδρομών που μπορεί να ακολουθήσει ένα μόριο, που προκύπτει από την ανομοιομορφία μεγέθους και σχήματος των σωματιδίων του πληρωτικού υλικού. Το μήκος των διαδρομών αυτών μπορεί να διαφέρει σημαντικά, άρα και ο χρόνος παραμονής στη στήλη σωματιδίων της ίδιας ουσίας. Αυτό οδηγεί σε διεύρυνση της ζώνης. Δίνεται από τη σχέση:



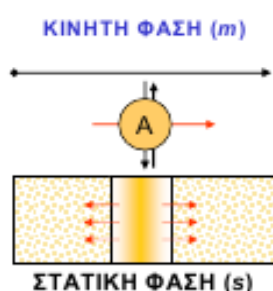
$$A = 2\lambda dP \quad (2.12)$$

Όπου λ: Συντελεστής ανομοιομορφίας πληρώσεως και γεωμετρίας της στήλης

dP : Διάμετρος των σωματιδίων του υλικού στήριξης.

B/u: Όρος διαμήκουσ διάχυσης

Ο όρος αυτός αντιπροσωπεύει τη διάχυση που προκύπτει λόγω κίνησης των μορίων του αναλύτη από το μεσαίο, υψηλής συγκέντρωσης, τμήμα της ζώνης, προς το πρόσθιο και οπίσθιο, χαμηλότερης συγκέντρωσης τμήμα της. Με



αύξηση του χρόνου παραμονής του αναλύτη στη στήλη, αυξάνεται και το χρονικό διάστημα επίδρασης της διαμήκουσ διάχυσης, άρα και η συνεισφορά του όρου B/u στην εξίσωση Van Deemter, με αποτέλεσμα αυξημένο ύψος πλάκας, ελλιπή διαχωρισμό και διευρυμένες κορυφές.

Δίνεται από τη σχέση

$$\frac{B}{u} = \frac{2\gamma D_M}{u} \quad (2.13)$$

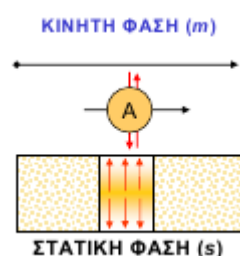
όπου: γ : Παράγοντας παρακώλυσης

D_M : Συντελεστής διάχυσης της κινητής φάσης

Το γεγονός ότι η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης βρίσκεται στον παρονομαστή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το φαινόμενο εντείνεται σε μικρές ταχύτητες ροής.

Σημειώνεται ότι στην υδροχρωματογραφία ο όρος αυτός είναι σχεδόν μηδενικός, επειδή οι συντελεστές διάχυσης είναι μικροί.

C_{su}: όρος μεταφοράς μάζας



Η αποκατάσταση ισορροπίας μεταξύ κινητής και στατικής φάσης είναι τόσο αργή, ώστε δεν επιτυγχάνεται ισορροπία. Η διεύρυνση της ζώνης λόγω μεταφοράς μάζας οφείλεται στην κάθετη διάχυση των μορίων ως προς τη ροή και αυξάνεται όσο αυξάνεται η ταχύτητα της κινητής φάσης.

C_{su}: Πεπερασμένη ταχύτητα μεταφοράς της ουσίας από την επίστρωση της στατικής φάσης στη μεσεπιφάνεια της στατικής. Ο όρος C_{su} διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα όταν αυξάνεται η ταχύτητα μεταφοράς μάζας και όταν

μειώνεται το πάχος του φιλμ της στατικής φάσης επάνω στα σωματίδια του πληρωτικού υλικού. Υπολογίζεται βάσει του τύπου

$$C_S u = \frac{f_S(k') d_f^2}{D_S} u \quad (2.14)$$

C_S : αντίσταση στη μεταφορά της ουσίας στη μεσεπιφάνεια της στατικής φάσης

$f_S(k')$: Σύνθετη συνάρτηση του παράγοντα κατακράτησης

d_f : Πάχος της στιβάδας της στατικής φάσης (cm)

D_S : Συντελεστής διάχυσης της ουσίας στη στατική φάση. Εξαρτάται από τη θερμοκρασία και το ιξώδες και μάλιστα αυξάνει με αύξηση της θερμοκρασίας και με μείωση του ιξώδους.

C_M : Πεπερασμένη ταχύτητα μεταφοράς της ουσίας από τη μεσεπιφάνεια της στατικής στην κινητή φάση.

Δίνεται από τη σχέση:

$$C_M u = \frac{f_M(k') d_p^2}{D_M} u \quad (2.15)$$

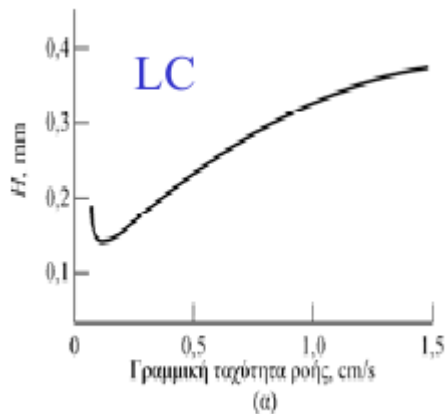
C_M : αντίσταση στη μεταφορά της ουσίας από τη μεσεπιφάνεια της στατικής φάσης στην κινητή φάση – εγκάρσια διάχυση μέσω διαύλων της κινητής φάσης

$f_M(k')$: Σύνθετη συνάρτηση του παράγοντα κατακράτησης

d_p : Διάμετρος των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης (cm)

D_M : Συντελεστής διάχυσης της ουσίας στην κινητή φάση. Επίσης εξαρτάται από τη θερμοκρασία και το ιξώδες και μάλιστα, όπως και ο D_S , αυξάνει με αύξηση της θερμοκρασίας και με μείωση του ιξώδους.

Όσο ταχύτερα κινείται η κινητή φάση τόσο βραδύτερα μεταφέρεται η ουσία από τη στατική στην κινητή φάση. Ακολουθούν διαγράμματα Van Deemter:



Σχήμα 2.3 Επίδραση της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης στο ύψος της πλάκας

Σε αντίθεση με την έννοια των θεωρητικών πλακών, η κινητική θεωρία για τη διεύρυνση της χρωματογραφικής κορυφής λαμβάνει υπόψη, τόσο την ταχύτητα της κινητής φάσης, όσο και το μέγεθος και σχήμα των σωματιδίων της στατικής φάσης. Κατά τη διάρκεια ενός χρωματογραφικού διαχωρισμού λαμβάνουν χώρα θερμοδυναμικές και κινητικές διεργασίες, οι οποίες συντείνουν στη διεύρυνση της χρωματογραφικής ζώνης. Οι διαδικασίες αυτές συνοψίζονται σε :

- ✓ Στροβιλώδη διάχυση (eddy diffusion), η οποία οφείλεται στη διασπορά της ουσίας, με αποτέλεσμα όλα τα μόρια της προσδιοριζόμενης ουσίας να μη διατρέχουν την ίδια απόσταση κατά τη δίοδό τους από τη στήλη (παράγοντας A). Αυτό οφείλεται στην ανομοιομορφία του σχήματος των σωματιδίων του πληρωτικού υλικού. Συνέπεια αυτού είναι να δημιουργείται μια κατανομή στις διανυόμενες αποστάσεις από τα μόρια του αναλύτη με αποτέλεσμα κατανομή στους χρόνους έκλουσής τους. Αποδεικνύεται ότι η στροβιλώδης διάχυση περιορίζεται με μείωση του μεγέθους των σωματιδίων, ενώ δεν επηρεάζεται από την ταχύτητα ροής. Αποτελεί τη σημαντικότερη παράμετρο διεύρυνσης των χρωματογραφικών κορυφών.
- ✓ Επιμήκη διάχυση (longitudinal diffusion), η οποία σχετίζεται με τη διάχυση της ουσίας γύρω από το κέντρο μάζας της. Είναι αποτέλεσμα

της βαθμίδωσης της συγκέντρωσης κατά μήκος της διαδρομής του δείγματος από το σημείο εισαγωγής του μέχρι τον ανιχνευτή και αυξάνεται όσο αυξάνεται η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης. Η διάχυση αυτού του τύπου δε λαμβάνει χώρα σε μεγάλο βαθμό στην υδροχρωματογραφία, διότι οι χρόνοι εκλούσεως του αναλύτη είναι μικροί (παράγοντας B). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι σύγχρονες αναλυτικές στήλες φέρουν πληρωτικά υλικά, τα οποία δεν επιτρέπουν μεγάλους χρόνους αναλύσεως. Κυριαρχεί όμως ως παράγοντας στη διεύρυνση που προκαλείται εξαιτίας της διάχυσης εντός του κυκλώματος των σωληνώσεων του αναλυτικού συστήματος.

- ✓ Αντίσταση στη μεταφορά μάζας στη μεσεπιφάνεια της στατικής φάσης και μεταξύ των διαύλων της κινητής φάσης (resistance to mass transfer) (παράγοντας C). Αυτή προκαλείται από την αύξηση του χρονικού διαστήματος που απαιτείται για την αποκατάσταση θερμοδυναμικής ισορροπίας με συνέπεια την απόκλιση από το νόμο κατανομής (2.1) Τα παραπάνω περιγράφονται από την απλοποιημένη εξίσωση Van Deemter:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu = A + \frac{B}{u} + (C_s + C_m)u \quad (2.16)$$

Όπου A : συντελεστής στροβιλώδους διάχυσης

B : συντελεστής διαμήκου διάχυσης

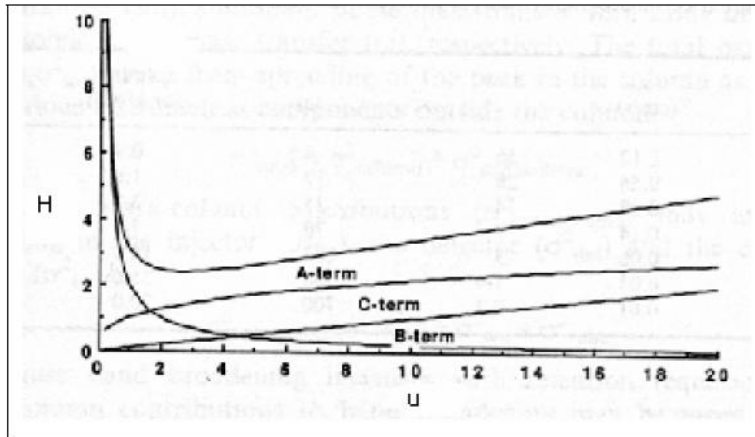
C : συντελεστής μεταφοράς μάζας

C_S: συντελεστής μεταφοράς μάζας στη στατική φάση

C_M: συντελεστής μεταφοράς μάζας στην κινητή φάση

και $u = \frac{L}{t_M}$ η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης

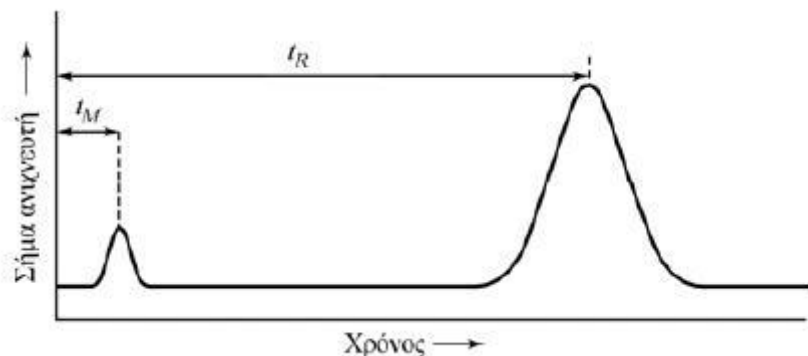
Στο σχήμα 2.4 παρουσιάζεται η εξάρτηση του H από την ταχύτητα ροής της κινητής φάσης



Σχήμα 2.4 Σχέση μεταξύ ύψους θεωρητικής πλάκας H και γραμμικής ταχύτητας u

2.4.4. Χρόνος ανάσχεσης – κατακράτησης

Ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ της εισαγωγής του δείγματος και της έκλουσης μιας μη κατακρατούμενης ουσίας, άρα και της κινητής φάσης, ονομάζεται νεκρός χρόνος (t_M), ενώ ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ της εισαγωγής του δείγματος και της εμφάνισης του μεγίστου της κορυφής μιας κατακρατούμενης ουσίας, ονομάζεται χρόνος ανάσχεσης (t_R) της ουσίας αυτής (Σχήμα 2.5). Η εξάρτηση του χρόνου ανάσχεσης από τις διαστάσεις της στήλης και την ροή της κινητής φάσης, αποτελεί μειονέκτημα, γι' αυτό συχνά χρησιμοποιείται ο ανηγμένος χρόνος ανάσχεσης, $t_R' = t_R - t_M$.



Σχήμα 2.4. Χρόνοι ανάσχεσης

2.4.5. Όγκος ανάσχεσης

Ο όγκος της κινητής φάσης που χρειάζεται να διέλθει από τη στατική φάση για να εκλουστεί μια ουσία ονομάζεται όγκος ανάσχεσης (V_R), ενώ ο όγκος της κινητής φάσης στη στατική φάση (στήλη) ονομάζεται νεκρός όγκος (V_M). Υπάρχει και εδώ ανηγμένος όγκος (V'_R) και οι παραπάνω όγκοι δίνονται από τις σχέσεις που ακολουθούν

$$V_R = t_R F \quad (2.17)$$

$$V_M = t_M F \quad (2.18)$$

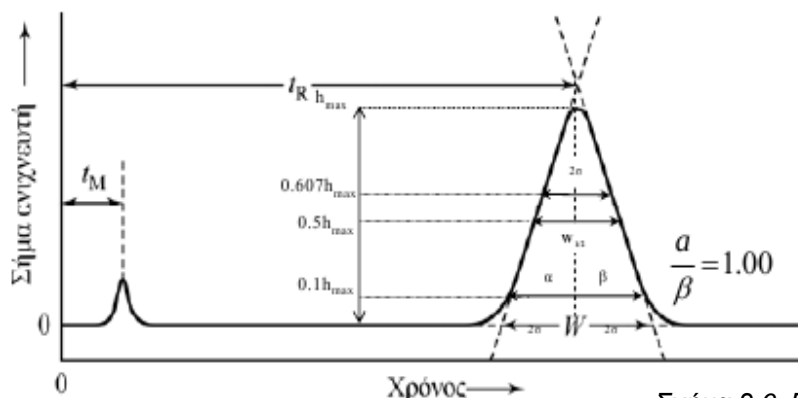
$$V'_R = t_R F \quad (2.19)$$

όπου F είναι η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης (σε mL/min)

2.4.6. Εύρος και ημιεύρος κορυφής

Οι χρωματογραφικές κορυφές γενικά θεωρείται πώς έχουν τη μορφή μιας καμπύλης Gauss. Με W συμβολίζεται το εύρος της βάσης της κορυφής και υπολογίζεται λαμβάνοντας ως μονάδα μέτρησης την τιμή της τυπικής απόκλισης της καμπύλης, σ . Ως τυπική απόκλιση μιας καμπύλης κανονικής κατανομής ορίζεται το μισό του εύρους της καμπύλης Gauss, μετρημένο στα σημεία μέγιστης κλίσης ή σε ύψος 0,607 του μεγίστου ύψους. Η τιμή 4σ λαμβάνεται συνήθως ως τιμή εύρους W , γιατί αποδεικνύεται ότι το περισσότερο του 95% της επιφάνειας της κανονικής κατανομής αντιστοιχεί σ' εύρος 4σ και επίσης επειδή η απόσταση αυτή μετρείται εύκολα (Σχήμα 2.6).

Με $W_{1/2}$ συμβολίζεται το εύρος της κορυφής στο μισό του ύψους της που καλείται και ημιεύρος.



Σημεία μέγιστης κλίσης
(0,607 h_{max}): εύρος $W_{0,607} = 2\sigma$

Εύρος κορυφής (στη βάση): $W = 4\sigma$

Εύρος κορυφής (στο μισό του ύψους της): $W_{1/2} = W/1,7 = 2,35\sigma$

Συμμετρία στο 10% του $h_{max} = a/\beta = 1,00$ (ιδανική συμμετρία)

Σχήμα 2.6. Εύρος Κορυφής

2.4.7. Ταχύτητα μετανάστευσης

Η μέση γραμμική ταχύτητα μετανάστευσης μιας κατακρατούμενης ουσίας (\bar{v}) και μιας μη κατακρατούμενης ουσίας, άρα και της κινητής φάσης (u) είναι οι εξής:

$$\bar{v} = \frac{L}{t_{R,A}} \quad u = \frac{L}{t_M} \quad (2.20)$$

όπου L , το μήκος της στήλης, $t_{R,A}$ ο χρόνος ανάσχεσης της κατακρατούμενης ουσίας, t_M ο νεκρός χρόνος.

Για να συσχετίσουμε το χρόνο κατακράτησης μιας ουσίας με τη σταθερά κατανομής της, εκφράζουμε την ταχύτητα μετανάστευσης ως κλάσμα της ταχύτητας της κινητής φάσης. Κατά τη διαδρομή της κατακρατούμενης ουσίας μέσα στη στήλη, αυτή κινείται μόνο όταν βρίσκεται στην κινητή φάση, συνεπώς η ταχύτητα μετανάστευσης μπορεί να γραφτεί ως εξής:

$$\bar{v} = u \cdot \text{κλάσμα χρόνου παραμονής της ουσίας στην κινητή φάση}$$

και

$$\bar{v} = u \frac{\text{γραμμομόρια ουσίας κινητής φάσης}}{\text{ολικά γραμμομόρια ουσίας}} \quad (2.21)$$

Ο ολικός αριθμός γραμμομορίων μιας ουσίας στην κινητή φάση παρέχεται από το γινόμενο της μοριακής συγκέντρωσης c_M της ουσίας στη φάση αυτή και από τον όγκο της κινητής φάσης V_M . Αντίστοιχα, ο αριθμός γραμμομορίων μιας ουσίας στην στατική φάση παρέχεται από το γινόμενο της μοριακής συγκέντρωσης c_S της ουσίας στην φάση αυτή και από τον όγκο της στατικής φάσης V_S . Έτσι ο πιο πάνω τύπος γράφεται ως εξής:

$$\bar{v} = u \frac{c_M V_M}{c_M V_M + c_S V_S} = u \frac{1}{1 + c_S V_S / c_M V_M} \quad (2.22)$$

Όπου $\frac{c_S}{c_M} = K$ σταθερά κατανομής (εξίσωση 2.1)

2.4.8. Παράγοντας κατακράτησης

Εκφράζει το βαθμό συγκράτησης ενός συστατικού από τη χρωματογραφική στήλη και ορίζεται ως ο λόγος του αριθμού των mol του αναλύτη στη στατική φάση (N_s), προς τα mol του αναλύτη στην κινητή φάση (N_m). Λαμβάνοντας υπόψη τη σχέση $N=CV$ και τη σχέση του συντελεστή κατανομής, προκύπτει:

$$k' = K \frac{V_s}{V_m} \quad (2.23)$$

Η ποσότητα k' ονομάζεται παράγοντας κατακράτησης ή παράγοντας χωρητικότητας ή λόγος κατανομής μάζας. Συνεπώς, λαμβάνεται η

$$\bar{v} = u \frac{1}{1 + k} \quad (2.24)$$

Αντικαθιστώντας στην παραπάνω σχέση τις εκφράσεις που δίνουν τις μέσες γραμμικές ταχύτητες προκύπτει:

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad \text{και} \quad t_R = t_M(1 + KV_s/V_M) \quad (2.25)$$

Ο παράγοντας χωρητικότητας είναι ανεξάρτητος του μήκους της στήλης και της γραμμικής ταχύτητας ροής της κινητής φάσης. Ιδανικές τιμές του παράγοντα αυτού κυμαίνονται μεταξύ 2-10. Όταν $k' < 1$, η έκλουση πραγματοποιείται ταχύτατα και δεν επιτυγχάνεται ικανοποιητικός διαχωρισμός, ενώ όταν $k' > 20$, οι χρόνοι έκλουσης καθίστανται υπερβολικά μεγάλοι.

2.4.9. Παράγοντας εκλεκτικότητας

Παράγοντας εκλεκτικότητας (α) δύο ουσιών A και B, ονομάζεται το πηλίκο των σταθερών κατανομής τους. Εξ' ορισμού, η μεγαλύτερη σταθερά κατανομής τοποθετείται στον αριθμητή και έτσι ο παράγοντας εκλεκτικότητας είναι πάντα μεγαλύτερος της μονάδας. Δηλαδή για $K_A > K_B$ ισχύει ότι:

$$\alpha = \frac{K_A}{K_B}$$

Με συνδυασμό των παραπάνω, προκύπτει η σχέση 2.19 που συνδέει τον παράγοντα εκλεκτικότητας μεταξύ δύο ουσιών, με τους αντίστοιχους παράγοντες κατακράτησης:

$$a = \frac{k'_A}{k'_B} \quad (2.26)$$

Τέλος, με αντικατάσταση, προκύπτει ότι:

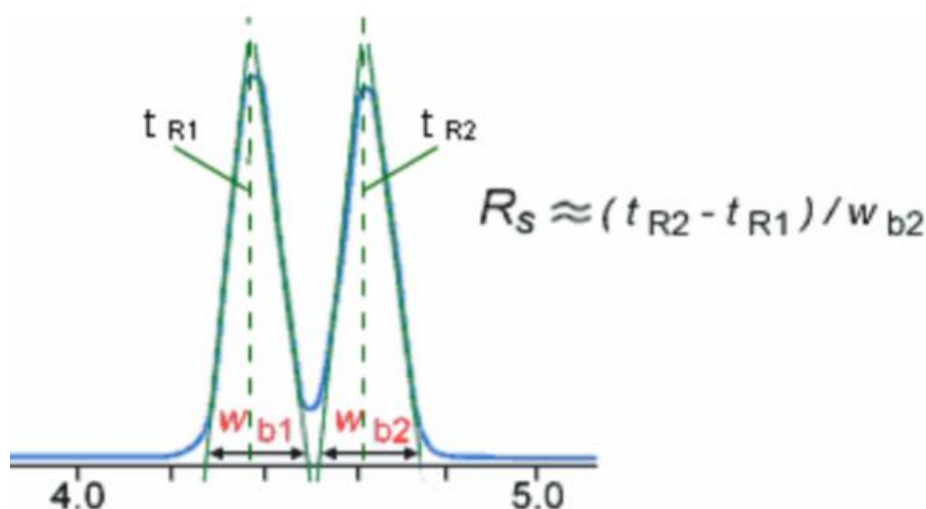
$$a = \frac{t_{R(A)} - t_M}{t_{R(B)} - t_M} \text{ η οποία γίνεται } a = \frac{t'_{R(A)}}{t'_{R(B)}} \quad (2.27)$$

Όπου $t'_{R(A)}$ και $t'_{R(B)}$, οι ανηγμένοι χρόνοι ανάσχεσης των ουσιών A και B. Οι σχέσεις αυτές επιτρέπουν τον προσδιορισμό της τιμής του a από τα δεδομένα του χρωματογραφήματος. Σημειώνεται ότι ο παράγοντας εκλεκτικότητας εξαρτάται από τη φύση της κινητής και στατικής φάσης και τη θερμοκρασία της στήλης.

2.4.10. Διαχωριστικότητα – Διαχωριστική ικανότητα

Η διαχωριστική ικανότητα (R_S) μιας στήλης, αποτελεί ποσοτικό μέτρο της ικανότητάς της να διαχωρίσει δύο αναλύτες. Εδώ επηρεάζουν και οι διαφορές στην ανάσχεση των ουσιών, αλλά και τα εύρη των κορυφών. Η σημασία του όρου αυτού φαίνεται στο σχήμα 2.7 που ακολουθεί στο οποίο παρατίθεται χρωματογράφημα των ουσιών A και B,. Η R_S δίνεται από τη σχέση:

$$R_S = \frac{2(t_{R,B} - t_{R,A})}{W_A + W_B} \quad (2.28)$$

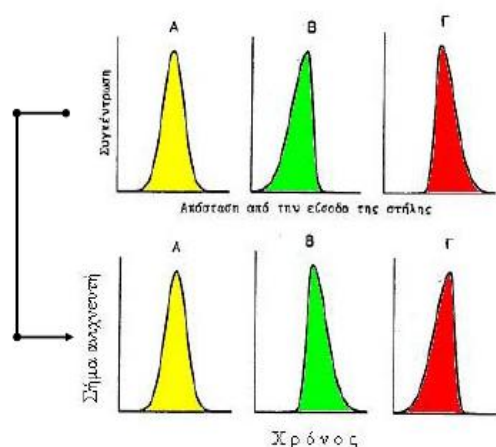


Σχήμα 2.7. Διαχωρισμός ουσιών A και B. Πλήρη διαχωρισμό έχουμε για $R_S \geq 1,5$

Η διαχωριστική ικανότητα δεδομένης στατικής φάσης μπορεί να βελτιωθεί με αύξηση του μήκους της στήλης, οπότε αυξάνεται ο αριθμός των πλακών. Αυτό βέβαια συνεπάγεται και αύξηση του απαιτούμενου χρόνου για τον διαχωρισμό.

2.4.11. Παραμόρφωση χρωματογραφικής ζώνης

Το σχήμα της ζώνης εξαρτάται από την ιδανική ή όχι συμπεριφορά του συντελεστή κατανομής. Αν η τιμή του K είναι σταθερή, όπως στην κορυφή Α, τότε η ζώνη είναι συμμετρική κι έχει το σχήμα κανονικής καμπύλης κατανομής (ή Gauss). Αν η τιμή του K ελαττώνεται όταν η συγκέντρωση της ουσίας στην κινητή φάση αυξάνεται (κορυφή Β), τότε η ζώνη δεν είναι συμμετρική κι έχει τη μορφή του Σχήματος Β. Παρομοίως, αν η τιμή του K αυξάνει όταν η συγκέντρωση της ουσίας στην κινητή φάση αυξάνει (κορυφή Γ), τότε η ζώνη έχει τη μορφή του Σχήματος Γ.



Σχήμα 2.9 Παραμόρφωση χρωματογραφικής ζώνης

Η παραμόρφωση ζώνης δεν είναι επιθυμητή επειδή:

- ✓ Οι ασύμμετρες κορυφές διευρύνονται ταχύτερα
- ✓ Η μεγάλη διεύρυνση κορυφών συνεπάγεται μη ικανοποιητικό διαχωρισμό
- ✓ Οι πολύ διευρυμένες κορυφές είναι ακατάλληλες για ποσοτική ανάλυση

Γενικές παρατηρήσεις για τη διεύρυνση κορυφών:

- ✓ Η χρωματογραφική κορυφή προσεγγίζει την κατά Gauss καμπύλη κατανομής, εφόσον η K είναι ανεξάρτητη της συγκέντρωσης της ουσίας στην κινητή φάση.
- ✓ Όσο αυξάνει το μήκος της στήλης, τόσο αυξάνει το εύρος της κορυφής
- ✓ Το εύρος της κορυφής εξαρτάται από την ταχύτητα ροής της κινητής φάσης, όταν όλες οι παράμετροι της κινητής και στατικής φάσης είναι σταθερές.
- ✓ Το εύρος της κορυφής ελαττώνεται, ελαττωμένου του μεγέθους των σωματιδίων της στατικής φάσης (στήλης), όταν οι άλλες παράμετροι είναι σταθερές.

2.4.12. Βελτιστοποίηση διαχωρισμών

Ένας χρωματογραφικός διαχωρισμός βελτιστοποιείται με ρύθμιση των πειραματικών συνθηκών έτσι, ώστε τα συστατικά ενός μίγματος να διαχωρίζονται στο συντομότερο δυνατό χρόνο. Τα πειράματα βελτιστοποίησης αποβλέπουν στη μείωση της διεύρυνσης των ζωνών ή στη μεταβολή των σχετικών ταχυτήτων μετανάστευσης των συστατικών. Με βάση την εξάρτηση της διαχωριστικότητας από τα μεγέθη α , k' και H , είναι δυνατό να γίνουν οι κατάλληλες ρυθμίσεις για τη βελτιστοποίηση του κάθε διαχωρισμού, καθώς η κάθε μεταβλητή είναι δυνατό να ρυθμιστεί αυτόνομα από τις υπόλοιπες.

Έτσι, ο παράγοντας εκλεκτικότητας α μπορεί να ρυθμιστεί αλλάζοντας τη στατική φάση, άρα και τις μοριακές αλληλεπιδράσεις και ο παράγοντας κατακράτησης k' μπορεί να μεταβληθεί με μεταβολή της σύστασης της κινητής φάσης. Τέλος, το ύψος πλάκας μπορεί να ρυθμιστεί με μεταβολή της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης, της διαμέτρου των σωματιδίων του υλικού στήριξης, του ιξώδους των δύο φάσεων (με μεταβολή της θερμοκρασίας άρα και μεταβολή των D_S και D_M) και του πάχους του φιλμ της στατικής φάσης.

Κατά το διαχωρισμό μιγμάτων που περιέχουν δύο ή περισσότερες ουσίες με παρόμοιους παράγοντες κατακράτησης, η ρύθμιση των παραμέτρων σε μία σταθερή τιμή κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, ίσως να έχει ως αποτέλεσμα

υπερβολικά μεγάλο χρόνο ανάλυσης άρα και αυξημένη διεύρυνση των κορυφών των περισσότερων κατακρατούμενων ουσιών. Το φαινόμενο αυτό είναι συνήθως γνωστό ως πρόβλημα της συνολικής έκλουσης. Για την αντιμετώπιση του προβλήματος αυτού, προγραμματίζεται η βαθμιαία μεταβολή της σύστασης της κινητής φάσης, ώστε να διατηρηθεί η διαχωριστικότητα σε υψηλά επίπεδα.

Με διατήρηση όλων των παραμέτρων σταθερών κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού προκύπτει η **ισοκρατική έκλουση** (isocratic elution), ενώ με βαθμιαία μεταβολή παραμέτρων, όπως για παράδειγμα η σύσταση της κινητής φάσης προκύπτει η **βαθμιδωτή έκλουση** (gradient elution).

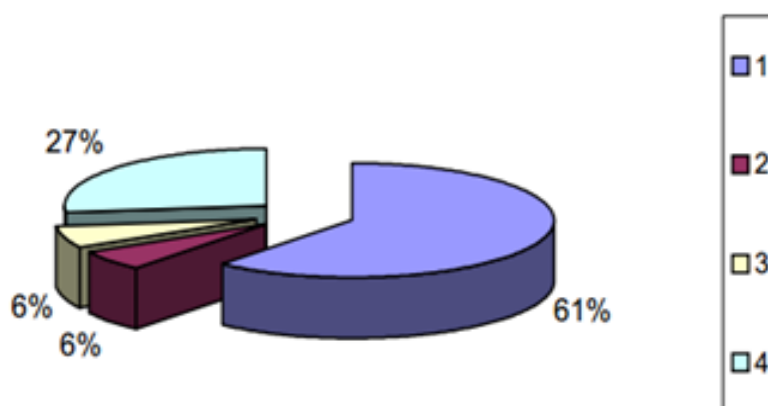
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1. Προετοιμασία δείγματος^[4,10]

Ανεξάρτητα από τη χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική, η προκατεργασία του δείγματος αποτελεί αναμφίβολα το πλέον ουσιαστικό και χρονοβόρο στάδιο της αναλυτικής διαδικασίας. Στο σχήμα 3.1, δίνεται ποσοστιαία ο μέσος χρόνος προκατεργασίας του δείγματος σε σχέση με τη συνολική διαδικασία. Η σωστή προκατεργασία αποσκοπεί:

- στον καθαρισμό του δείγματος προς ανάλυση, από τυχόν παρεμποδίσεις
- στην απομόνωση και παραλαβή του συστατικού που μας ενδιαφέρει
- στην προσυγκέντρωση του
- στην τροποποίηση της φυσικής του κατάστασης

Το συγκεκριμένο στάδιο κρίνεται αναγκαίο σε περιπτώσεις στις οποίες στο δείγμα υπάρχουν ενώσεις οι οποίες έχουν παραπλήσιες ιδιότητες (π.χ. απορροφούν στην ίδια περιοχή του υπεριώδους με τις προσδιοριζόμενες ενώσεις), γεγονός που καθιστά ιδιαίτερα δύσκολη τη διαδικασία του ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού. Χαρακτηριστικό δείγμα το οποίο χρήζει προκατεργασίας αποτελούν τα βιολογικά υγρά, στα οποία απαιτείται η αποπρωτεΐνωσή τους, προς αποφυγή καταβυθίσεων οι οποίες ενδέχεται να αποδειχτούν επιζήμιες για τη χρησιμοποιούμενη αναλυτική στήλη.



Σχήμα 3.1. Κατανομή χρόνου στην αναλυτική διαδικασία

(1. Προκατεργασία δείγματος, 2. Ανάλυση, 3. Συλλογή δείγματος, 4. Επεξεργασία δεδομένων)

Μία ιδανική τεχνική προκατεργασίας δείγματος θα πρέπει να:

- χρησιμοποιεί όσο το δυνατό μικρότερη ποσότητα διαλύτη
- είναι απλή και οικονομική
- είναι αποτελεσματική και εκλεκτική
- είναι συμβατή με μεγάλο αριθμό διαχωριστικών τεχνικών
- έχει μεγάλο αριθμό εφαρμογών
- μπορεί ταυτόχρονα να διαχωρίζει και να προσυγκεντρώνει τα συστατικά
- μπορεί να εφαρμοστεί και απευθείας στο πεδίο δειγματοληψίας
- να μπορεί να αυτοματοποιηθεί.

3.2. Τεχνικές προκατεργασίας δείγματος

3.2.1. Τεχνικές διαλυτοποίησης

Πρόκειται για την απλούστερη τεχνική προκατεργασίας δείγματος. Στην υγρή διαλυτοποίηση το δείγμα κατεργάζεται με διαλύτη και λαμβάνεται σε διάλυμα με ή χωρίς χημική μεταβολή. Αντίστοιχα στη διαλυτοποίηση με υπερήχους (sonication) το δείγμα, λεπτά διαμερισμένο και μέσα σε δοχείο, εμβαπτίζεται σε λουτρό υπερήχων με διαλύτη και υπόκειται σε επίδραση ακτινοβολίας υπερήχων. Από τα βασικότερα πλεονεκτήματα της διαλυτοποίησης με υπερήχους, πέρα από το ότι είναι ασφαλής, γρήγορη και ενδείκνυται για χονδρόκοκκα υλικά, είναι το γεγονός ότι επιτρέπεται η ταυτόχρονη επεξεργασία πολλαπλών δειγμάτων.

3.2.2. Κλασικές τεχνικές εκχύλισης

- ✓ Εκχύλιση υγρού – υγρού

Για πολλά χρόνια, η συγκεκριμένη τεχνική αποτελούσε την πλέον δημοφιλή τεχνική επεξεργασίας δείγματος. Η εκχύλιση υγρού-υγρού περιλαμβάνει την απομάκρυνση οργανικών ενώσεων με εκχύλιση, με διαλύτη μη αναμίξιμο με

το υπόστρωμα του δείγματος και στηρίζεται στις σχετικές διαλυτότητες του συστατικού ανάμεσα στο διαλύτη εκχύλισης και στο υπόστρωμα του δείγματος. Τα βασικότερα μειονεκτήματα του συγκεκριμένου τρόπου εκχύλισης είναι ότι:

- Δεν είναι αποτελεσματική σε συνδυασμό με χρωματογραφικές μεθόδους ανάλυσης και κυρίως με την HPLC, η οποία έχει χαμηλά όρια ποσοτικής αποτίμησης. Η εφαρμογή της συνηθίζεται σε φασματοφωτομετρικές μεθόδους. Οι χρησιμοποιούμενοι διαλύτες δεν είναι εκλεκτικοί, με αποτέλεσμα να συνεκχυλίζονται ουσίες με παραπλήσιες ιδιότητες, οι οποίες οδηγούν σε παρεμποδίζουσες κορυφές στα χρωματογραφήματα.
- Απαιτούνται μεγάλες ποσότητες δείγματος και μεγάλος όγκος οργανικού διαλύτη
- Υπάρχει πιθανότητα σχηματισμού γαλακτωμάτων
- Είναι αρκετά χρονοβόρα μέθοδος

✓ Εκχύλιση Soxhlet

Στη συγκεκριμένη τεχνική το δείγμα τοποθετείται σε πορώδη φύσιγγα μίας χρήσης, από όπου ρέει συνεχώς διαλύτης με επαναροή εκχυλίζοντας και συγκεντρώνοντας το επιθυμητό συστατικό. Η εκχύλιση Soxhlet είναι μία αργή και οικονομική μέθοδος η οποία παρέχει υψηλά ποσοστά ανάκτησης.

✓ Διαλυτοποίηση εξαναγκασμένης ροής (Forced flow leaching)

Το δείγμα τοποθετείται σε σωλήνα συνεχούς ροής και θερμαίνεται σε θερμοκρασία κοντά στο σημείο βρασμού του διαλύτη ο οποίος ρέει συνεχώς. Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιεί λιγότερο όγκο διαλύτη από την Soxhlet και έχει παραπλήσια απόδοση. Η χρήση της ενδείκνυται για δείγματα σωματιδιακής μορφής.

3.2.3. Σύγχρονες τεχνικές εκχύλισης

- ✓ Επιταχυνόμενη εκχύλιση (Accelerated solvent extraction)

Στη συγκεκριμένη μέθοδο το δείγμα τοποθετείται σε σφραγισμένο δοχείο και θερμαίνεται σε θερμοκρασία μεγαλύτερη του σημείου ζέσεως, προκαλώντας έτσι αύξηση της πίεσης στο δοχείο. Το εκχυλιζόμενο δείγμα απομακρύνεται αυτόματα και μεταφέρεται σε υποδοχέα για περαιτέρω κατεργασία. Τα βασικότερα πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης τεχνικής είναι ότι είναι αρκετά γρήγορη, παρέχοντας ταυτόχρονα τη δυνατότητα αυτοματοποίησης, αλλά θα πρέπει να σημειωθεί ότι πριν από την εφαρμογή της απαιτείται λήψη μέτρων ασφαλείας.

- ✓ Αυτοματοποιημένη Soxhlet

Στην αυτοματοποιημένη τεχνική Soxhlet, συνδυάζεται η έκλουση με θερμό διαλύτη. Έτσι αρχικά το δείγμα εμβαπτίζεται σε ζέοντα διαλύτη και στη συνέχεια υπόκειται σε εκχύλιση Soxhlet με επαναρροή διαλύτη. Η τεχνική αυτή δύναται να αυτοματοποιηθεί, χρησιμοποιεί λιγότερο διαλύτη από την κλασική Soxhlet και ολοκληρώνεται σε λιγότερο χρόνο.

- ✓ Εκχύλιση με επίδραση μικροκυμάτων (Microwave assisted extraction)

Στη μέθοδο αυτή το δείγμα τοποθετείται σε ανοιχτό ή κλειστό δοχείο και θερμαίνεται με επίδραση μικροκυμάτων, που προκαλούν την εκχύλιση του συστατικού που μας ενδιαφέρει. Όπως είναι επόμενο κρίνεται απαραίτητη η λήψη μέτρων ασφαλείας.

3.2.4. Τεχνικές εκχύλισης στις οποίες δεν χρησιμοποιείται διαλύτης (solvent free)

- ✓ Αέρια εκχύλιση

Η συγκεκριμένη τεχνική εκχύλισης χαρακτηρίζεται ως ιδανική για την αεριοχρωματογραφία δεδομένου ότι εφαρμόζεται για πτητικές ενώσεις, ενώ η εκχύλιση των συστατικών από το υπόστρωμα γίνεται απευθείας σε αέρια φάση, σε θερμοκρασία δωματίου και ακόμα υψηλότερη. Ως βασικότερα πλεονεκτήματά της αναφέρονται το χαμηλό κόστος, τα ελάχιστα χρησιμοποιούμενα αναλώσιμα, η δυνατότητα αυτοματοποίησης, καθώς και το γεγονός ότι δεν απαιτείται η απομάκρυνση του διαλύτη.

✓ Εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού (SFE)

Στη SFE το δείγμα τοποθετείται σε δοχείο συνεχούς ροής και ένα υπερκρίσιμο ρευστό (συνήθως CO₂) διέρχεται από το δείγμα. Μετά από αποσυμπίεση το εκχυλιζόμενο δείγμα συλλέγεται σε διαλύτη ή παγιδεύεται σε προσροφητικό και εκροφάται με πλύση με διαλύτη. Στη συγκεκριμένη τεχνική υπάρχει δυνατότητα αυτοματοποίησης, ενώ το δείγμα προσυγκεντρώνεται και είναι καθαρό, επειδή το CO₂ απομακρύνεται μετά την εκχύλιση.

✓ Εκχύλιση στερεάς φάσης-υγρού (SPE)

Η συγκεκριμένη τεχνική αναπτύχθηκε στα μέσα της δεκαετίας του '70 και αποτελεί ουσιαστικά μια μικρογραφία της χρωματογραφίας στήλης, η οποία χρησιμοποιεί μικροστήλες με προσροφητικό υλικό κατασκευασμένες από πολυαιθυλένιο, πολυπροπυλένιο ή γυαλί. Τα βασικότερα πλεονεκτήματα της SPE, η οποία αντικατέστησε ουσιαστικά την εκχύλιση υγρού-υγρού είναι τα παρακάτω:

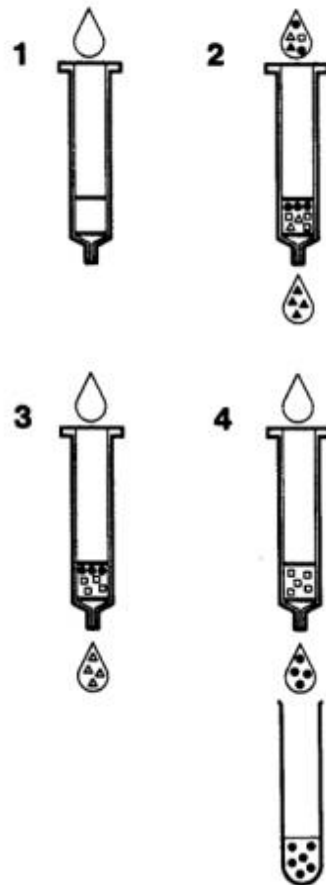
- Επιτυγχάνεται μεγάλο ποσοστό ανάκτησης της ένωσης που μας ενδιαφέρει και σε υψηλή καθαρότητα
- Απαιτούνται μικροί χρόνοι προκατεργασίας.
- Δε σχηματίζονται γαλακτώματα.
- Υπάρχει δυνατότητα αυτοματοποίησης της μεθόδου, η οποία συνεπάγεται μεγαλύτερη ταχύτητα, καλύτερη επαναληψιμότητα και ταυτόχρονη κατεργασία πολλών δειγμάτων.
- Απαιτείται μικρή ποσότητα διαλύτη και επιτυγχάνεται μεγάλη προσυγκέντρωση.

- Υπάρχει δυνατότητα εκλεκτικής παραλαβής συγκεκριμένων ενώσεων από υπόστρωμα ποικίλης σύστασης.

Ως βασικό μειονέκτημα της εκχύλισης στερεάς φάσης-υγρού είναι το γεγονός ότι έχει υψηλό υπόβαθρο εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με GC ή GC/MS. Το δυσκολότερο στάδιο στη συγκεκριμένη τεχνική εκχύλισης είναι η επιλογή του κατάλληλου προσροφητικού υλικού, ανάλογα με το υπό εξέταση δείγμα. Ο τύπος και η ποσότητα του προσροφητικού υλικού το οποίο επιλέγεται, εξαρτάται από τη διαλυτότητα των προσδιοριζόμενων ενώσεων στους διάφορους διαλύτες, την πολικότητά τους, τη φύση του υποστρώματος του δείγματος, καθώς και τη συγκέντρωση των προσδιοριζόμενων ενώσεων μέσα σ'αυτό. Παράλληλα η επιλογή του διαλύτη γίνεται με τέτοιο τρόπο, ούτως ώστε να απομακρύνονται από το δείγμα όσο το δυνατόν περισσότερες παρεμποδίσσεις, ενώ ταυτόχρονα να εξασφαλίζεται η μέγιστη δυνατή ανάκτηση για τις προσδιοριζόμενες ενώσεις. Γενικά επιλέγονται πολικοί διαλύτες όταν χρησιμοποιούνται μη πολικές στατικές φάσεις και αντίστροφα.

Συνοπτικά τα στάδια τα οποία ακολουθούνται στην εκχύλιση στερεάς φάσης-υγρού αποδίδονται γραφικά στο σχήμα 3.2 και είναι τα παρακάτω:

1. Ενεργοποίηση της στερεάς στατικής φάσης με τον κατάλληλο διαλύτη, στάδιο το οποίο ενδέχεται να παραληφθεί όταν χρησιμοποιούνται μικροστήλες με κατάλληλο πολυμερές υλικό.
2. Εισαγωγή δείγματος
3. Έκπλυση της μικροστήλης για την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων συστατικών
4. Παραλαβή των προσδιοριζόμενων συστατικών με κατάλληλο οργανικό διαλύτη



όπου, ● : το προσδιοριζόμενο συστατικό
 ▲, □ : παρεμποδίσεις

Σχήμα 3.2. Σχηματική απεικόνιση της εκχύλισης στερεάς φάσης – υγρού (SPE)

Η εκχύλιση στερεάς φάσης – υγρού δύναται να εφαρμοστεί:

- Σε περιβαλλοντικά δείγματα (εντομοκτόνα, παρασιτοκτόνα)
- Σε φαρμακευτικά δείγματα (βιταμίνες, στεροειδή, αντιβιοτικά)
- Σε βιοχημικά δείγματα (DNA, RNA, πεπτίδια και πρωτεΐνες)
- Σε κλινικά δείγματα (ναρκωτικά, φάρμακα)
- Σε πετροχημικά δείγματα (κλασματική απόσταξη αργού πετρελαίου)
- Στη βιομηχανία τροφίμων

- ✓ Εκχύλιση στερεάς φάσης – υγρού με τεχνολογία δίσκων (SPE – disk technology)

Θεωρείται η εξέλιξη της SPE, δεδομένου ότι βελτιώνει τη συμβατική εκχύλιση στερεάς φάσης – υγρού, ελαττώνοντας τη χρήση διαλύτη και εξοικονομώντας χρόνο.

- ✓ Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης – υγρού (SPME)

Πρόκειται για την πιο σύγχρονη από τις τεχνικές οι οποίες αναφέρονται στο παρόν κεφάλαιο. Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιεί οπτική ίνα μήκους λίγων εκατοστών, και μικρής διαμέτρου, από τηγμένο πυρίτιο επιστρωμένο με πολυμερές, προσαρμοσμένο σε μικροσύριγγα. Η διάταξη της ίνας αποτελείται από ένα εξωτερικό προστατευτικό περίβλημα, βελόνα και μια εσωτερική βελόνα στην άκρη της οποίας τοποθετείται εποξική κόλλα. Η διεργασία ελέγχεται από τη διάχυση των συστατικών από το περιβάλλον διάλυμα μέσω λεπτής στατικής, υδατικής στοιβάδας γύρω από την ίνα. Αποκαθίσταται ισορροπία και επειδή οι μη πολικές οργανικές ενώσεις έχουν μεγάλο συντελεστή κατανομής στη μη πολική ίνα επιτυγχάνονται υψηλές ανακτήσεις των συστατικών.

Τα βασικότερα πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης τεχνικής, πέρα από το ότι δε χρησιμοποιεί διαλύτη και δεν απαιτεί τη χρήση πολύπλοκων συσκευών είναι ότι μπορεί να εφαρμοστεί τόσο για πτητικές, όσο και για μη πτητικές ενώσεις σε υγρά και αέρια δείγματα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων, ενώ παράλληλα μπορεί και να αυτοματοποιηθεί. Παράλληλα ο χρόνος ανάλυσης μειώνεται σημαντικά, ενώ ελαχιστοποιείται και η πιθανότητα σφαλμάτων λόγω κακού χειρισμού των δειγμάτων.

3.2.5. Άμεσες τεχνικές – μικροδιαπίδυση (microdialysis)

Πρόκειται για μια βιοαναλυτική μέθοδο δειγματοληψίας, η οποία δύναται να εφαρμοστεί σε μελέτες οι οποίες γίνονται σε ζώα, φυτά, καλλιέργειες κυττάρων και μύρες στο στάδιο της ζύμωσης. Η μικροδιαπίδυση επιτυγχάνεται εισάγοντας μια μικροσκοπική μεμβράνη στο ζωντανό ιστό. Σε σύγκριση με τις άλλες τεχνικές, όσον αφορά τα συγκεκριμένα δείγματα, οδηγεί σε πιο αντιπροσωπευτικά συμπεράσματα, ενώ δεν προϋποθέτει τη θανάτωση

του ζώου. Αντίστοιχα σε σύγκριση με τη λήψη αίματος δεν εμφανίζει απώλεια συστατικού, επιτρέπει πιο συχνή δειγματοληψία, ενώ παράλληλα τα δείγματα είναι ελεύθερα πρωτεϊνών και ως εκ τούτου δεν απαιτούν περαιτέρω προκατεργασία.

3.2.6. Τεχνικές εναλλαγής στηλών

Ο όρος «εναλλαγή στηλών» έχει συνδεθεί με τη χρήση μιας μικρής στήλης με υλικό πλήρωσης που έχει κόκκους και ιδιότητες ίδιες ή όχι με την κυρίως αναλυτική στήλη. Από τη στήλη αυτή, με χρήση του κατάλληλου διαλύτη έκλουσης παραλαμβάνονται τα συστατικά, τα οποία μας ενδιαφέρουν και στη συνέχεια μεταφέρονται στην αναλυτική στήλη, η οποία βρίσκεται σε σύζευξη με την πρώτη. Το γεγονός αυτό επιτυγχάνεται καθώς το εκλουστικό, το οποίο κατά τα στάδια φόρτωσης και πλύσης ρέει διαμέσου της στήλης, παρακάμπτεται και ρέει μέσα από τη στήλη προσυγκέντρωσης με αποτέλεσμα οι κατακρατηθείσες ενώσεις να εκλούνται και να μεταφέρονται στην κορυφή της στήλης. Μετά τη μεταφορά των ενώσεων στην αναλυτική στήλη η βαλβίδα επαναφέρεται στην αρχική της θέση, οπότε πλένεται η στήλη προσυγκέντρωσης από υπολείμματα εκλουστικού, ενώ ταυτόχρονα προετοιμάζεται το επόμενο δείγμα. Ως βασικότερα μειονεκτήματα της συγκεκριμένης τεχνικής αναφέρονται η πολύπλοκη οργάνολογία, το γεγονός ότι απαιτεί αρκετό χρόνο, καθώς και το ότι δεν είναι εύκολα διαθέσιμη σε εργαστήρια εξαιτίας του υψηλού της κόστους.

3.3. Ποσοτικοποίηση στη χρωματογραφική ανάλυση^[11]

Από τις κυριότερες εφαρμογές της HPLC είναι η χρησιμοποίηση της τεχνικής για ποσοτικούς προσδιορισμούς. Για αυτού του είδους τους προσδιορισμούς χρησιμοποιούνται διαλύματα αναφοράς γνωστής με ακρίβεια συγκέντρωσης (πρότυπα διαλύματα). Οι προσδιορισμοί γίνονται στην περιοχή, όπου ο ανιχνευτής παρουσιάζει γραμμικότητα. Το σήμα του ανιχνευτή υπολογίζεται, είτε με μέτρηση του εμβαδού της χρωματογραφικής κορυφής, είτε με μέτρηση του ύψους της. Ο προσδιορισμός του ύψους γίνεται με μέτρηση της απόστασης του μεγίστου της χρωματογραφικής κορυφής από τη γραμμή

βάσης. Σε πολύ οξείες κορυφές οι μετρήσεις βάσει του ύψους είναι ιδιαίτερα ακριβείς. Όταν όμως οι κορυφές είναι διευρυμένες καλύτερα αποτελέσματα λαμβάνονται με τον προσδιορισμό του εμβαδού. Ο τελευταίος στα σύγχρονα συστήματα επεξεργασίας η μέτρηση, τόσο του ύψους, όσο και της κορυφής γίνεται με ηλεκτρονική ολοκλήρωση και τα λαμβανόμενα αποτελέσματα είναι ακριβέστερα και περισσότερο επαναλήψιμα. Οι κυριότερες μέθοδοι ποσοτικοποίησης στην HPLC είναι οι εξής.

3.3.1. Τεχνική ενός εξωτερικού προτύπου

Βασίζεται στην άμεση συσχέτιση της ένδειξης του ανιχνευτή για γνωστής συγκέντρωσης πρότυπο διάλυμα (C_s) με τη συγκέντρωση του αγνώστου δείγματος (C_d) βάσει της σχέσης:

$$C_d = C_s(A_d/A_s) \quad (3.1)$$

Η τεχνική αυτή αν και είναι μειωμένης ακρίβειας, χρησιμοποιείται όμως για προσδιορισμούς ρουτίνας (π.χ. έλεγχος φαρμάκων), αφού αποδειχθεί η γραμμικότητα της καμπύλης βαθμονόμησης και η διέλευσή της από την αρχή των αξόνων.

3.3.2. Τεχνική πολλαπλών εξωτερικών προτύπων (καμπύλης αναφοράς)

Η τεχνική αυτή βασίζεται στη βαθμονόμηση της διατάξεως μετρήσεως με τη χρήση σειράς προτύπων διαλυμάτων του προσδιοριζόμενου συστατικού σε καθαρό διαλύτη ή στο μητρικό υλικό και χαρακτηρίζεται ως τεχνική πολλαπλών εξωτερικών προτύπων. Χαράσσεται διάγραμμα βαθμονόμησης, το οποίο απεικονίζει τη συνάρτηση της μετρούμενης παραμέτρου (P) με τη συγκέντρωση των προτύπων διαλυμάτων (C) με μορφή:

$$P = bC + a + ei \quad (3.2)$$

Ο συντελεστής b (κλίση διαγράμματος βαθμονόμησης) εκφράζει την ευαισθησία της μεθόδου. Στόχος της μεθόδου ελαχίστων τετραγώνων, με την οποία χαράσσεται το διάγραμμα παλινδρόμησης, είναι να βρεθούν οι εκτιμήτριες ποσότητες των παραμέτρων b και a , ώστε το άθροισμα των

τετραγώνων των αποκλίσεων ει να τείνει στο μηδέν. Η ευθεία παλινδρόμησης είναι προτιμότερο να διέρχεται από την αρχή των αξόνων και η κλίση της να παραμένει σταθερή, ώστε να δύναται να χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

3.3.3. Τεχνική προσθήκης γνωστής ποσότητας

Σε περιπτώσεις που είναι αδύνατη η παρασκευή προτύπων διαλυμάτων με το ίδιο μητρικό υλικό με τα υπό προσδιορισμό άγνωστα δείγματα χρησιμοποιείται η μέθοδος πολλαπλών προσθηκών γνωστών ποσοτήτων. Με αυτήν την τεχνική η άγνωστη τιμή C αυξάνεται κατά γνωστή ποσότητα ΔC με προσθήκη γνωστού όγκου σχετικά πυκνού προτύπου διαλύματος του αναλύτη, ώστε ο όγκος του διαλύματος και οι συγκεντρώσεις των άλλων συστατικών να μη μεταβληθούν σημαντικά. Έτσι αν για το άγνωστο διάλυμα λαμβάνεται σχέση της μορφής: $P = kC_0$ τότε για το δείγμα, το οποίο έχει υποστεί προσθήκη γνωστής ποσότητας ισχύει:

$$P' = k(C_0 + \Delta C)$$

Στη συνέχεια χαράσσεται ευθεία του τύπου:

$$P_i = a + b\Delta C_i \quad (3.3)$$

3.3.4. Τεχνική εσωτερικού προτύπου (internal standard)

Με την τεχνική αυτή επιλέγεται μια ουσία με καλή διαχωριστικότητα από τα συστατικά του δείγματος, παρόμοιας χημικής δομής και χρόνου ανάσχεσης με τον αναλύτη και σταθερή κατά τις πειραματικές διεργασίες. Αναλύονται διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης του εσωτερικού προτύπου και πρότυπα διαλύματα του αναλύτη, καθώς και μίγματα των δύο αυτών ουσιών σε γνωστές συγκεντρώσεις και ελέγχεται η γραμμικότητα των μετρήσεων. Το εσωτερικό πρότυπο προστίθεται σε σταθερή συγκέντρωση, τόσο στα πρότυπα διαλύματα, όσο και στα άγνωστης συγκέντρωσης δείγματα. Σχεδιάζεται διάγραμμα βαθμονόμησης, στο οποίο λαμβάνεται ως αναλυτικό σήμα ο λόγος του αναλυτικού σήματος του αναλύτη προς εκείνο του εσωτερικού προτύπου. Η χρήση του εσωτερικού προτύπου ενδείκνυται για

δείγματα που απαιτούν προκατεργασία, όπου εξαιτίας της παρόμοιας συμπεριφοράς του με τον αναλύτη «διορθώνει» τις τυχόν απώλειες, ενώ επιπλέον διορθώνει σφάλματα προκαλούμενα από την ολίσθηση του οργανολογικού συστήματος.

3.3.5. Μέθοδος κανονικοποίησης (normalization)

Πρόκειται για τεχνική ποσοτικοποίησης με στόχο τον ταχύ ποσοτικό προσδιορισμό των προσμίξεων, στον οποίο η εκατοστιαία περιεκτικότητα υπολογίζεται ως το % κλάσμα του εμβαδού κορυφής του προσδιοριζόμενου συστατικού (A_{X_i}) ως προς το άθροισμα των εμβαδών των συνολικών κορυφών (ΣA_{X_i}), εκτός από εκείνες που προέρχονται από το διαλύτη και εκείνες που οφείλονται σε θορύβους, όπως δείχνεται στη σχέση:

$$X_i(\%) = (A_{X_i} / \Sigma A_{X_i}) \times 100 \quad (3.4)$$

Περιορισμό της ακρίβειας αυτής της τεχνικής αποτελεί το γεγονός ότι η απόκριση του ανιχνευτή δεν είναι ίδια για τον αναλύτη και τις προσμίξεις. Για να κανονικοποιηθεί η απόκριση όλων των μετρήσεων, υπολογίζεται ο παράγοντας απόκρισης (R_{f_i}), ο οποίος σχετίζεται με την απόκριση κάθε ουσίας (A_i) ως προς τον αναλύτη (A_A) βάσει της σχέσεως:

$$R_{f_i} = \frac{A_A / A_i}{C_A / C_i} \quad (3.5)$$

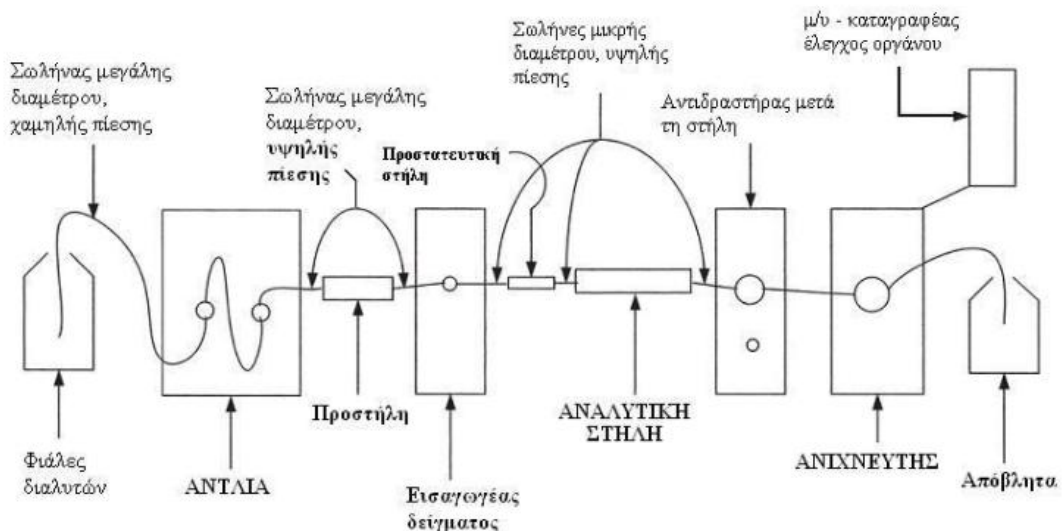
Βάσει των παραπάνω ο υπολογισμός της περιεκτικότητας γίνεται με την εξίσωση:

$$X_i\% = \frac{A_{X_i} R_{f_i}}{\Sigma (A_{X_i} R_{f_i})} \quad (3.6)$$

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4.1. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ-HPLC-ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ^[7,11]

Για να αναπτυχθούν ικανοποιητικές ταχύτητες ροής, οι απαιτούμενες πιέσεις από τις αντλίες φθάνουν τις μερικές χιλιάδες psi. Ως συνέπεια αυτών των υψηλών πιέσεων, η οργανολογία της HPLC είναι πολυπλοκότερη και δαπανηρότερη από την οργανολογία άλλων ειδών χρωματογραφίας.



Σχήμα 4.1. Οργανολογία HPLC

4.1.1. Δοχεία κινητής φάσης και συστήματα επεξεργασίας διαλυτών

Ένα σύγχρονο σύστημα HPLC είναι εφοδιασμένο με ένα ή περισσότερα υάλινα ή ανοξείδωτα δοχεία, το καθένα από τα οποία περιέχει 200 έως 1000 ml διαλύτη. Τα δοχεία είναι συχνά εφοδιασμένα με μέσα απομάκρυνσης των διαλυμένων αερίων, συνήθως οξυγόνου και αζώτου, που παρεμποδίζουν το σχηματισμό φυσαλίδων στη στήλη και στον ανιχνευτή των συστημάτων. Οι

φυσαλίδες αυτές προκαλούν διεύρυνση των κορυφών. Επιπλέον, εμποδίζουν συχνά τη σωστή λειτουργία του ανιχνευτή.

Τα σύγχρονα συστήματα HPLC συχνά είναι εφοδιασμένα με διατάξεις, οι οποίες εισάγουν διαλύτες από δύο ή περισσότερα δοχεία σε θάλαμο ανάμιξης με ρυθμούς που μεταβάλλονται συνεχώς. Ο λόγος των όγκων των διαλυτών μπορεί να μεταβάλλεται ως προς τον χρόνο γραμμικά ή λογαριθμικά.

4.1.2. Συστήματα άντλησης

Οι απαιτήσεις ενός συστήματος άντλησης στην HPLC είναι αυστηρές και περιλαμβάνουν:

- ✓ Ανάπτυξη πιέσεων, μέχρι 6000 psi
- ✓ Απαλλαγή από παλμούς ροής
- ✓ Ταχύτητες ροής που κυμαίνονται από 0,1 έως 10 mL/min
- ✓ Έλεγχο ροής και επαναληψιμότητα ροής 0,5% ή καλύτερη
- ✓ Τμήματα ανθεκτικά στη διάβρωση

Συναντούμε τρεις τύπους αντλιών, που ο καθένας έχει πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά του: παλινδρομικές αντλίες, αντλίες σύριγγας ή εκτόπισης και αντλίες πνευματικές ή σταθερής πίεσης.

Παλινδρομικές αντλίες: Οι παλινδρομικές αντλίες, χρησιμοποιούνται στο 90% των εμπορικά διαθέσιμων συστημάτων HPLC και αποτελούνται από ένα μικρό θάλαμο, στον οποίο ο διαλύτης αντλείται παλινδρομικά με ένα μηχανικά κινούμενο έμβολο.

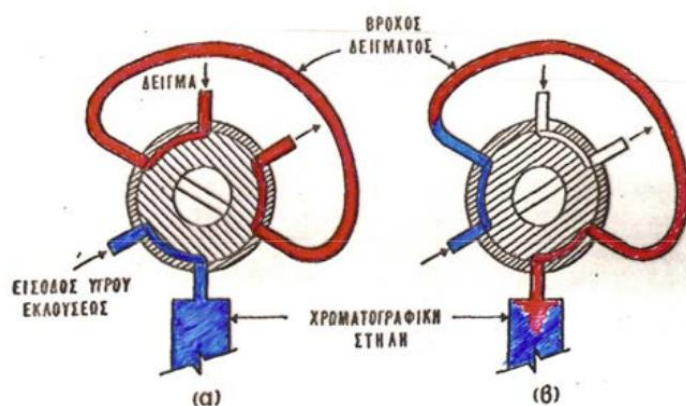
Αντλίες εκτόπισης: Οι αντλίες εκτόπισης αποτελούνται από μεγάλους θαλάμους τύπου συριγγών εφοδιασμένων με ένα έμβολο, που ενεργοποιείται από ένα κοχλιωτό μηχανισμό ο οποίος οδηγείται από ένα βηματικό κινητήρα. Οι αντλίες εκτόπισης παράγουν ροή σχεδόν ανεξάρτητη από το ιξώδες και την οπισθοπίεση. Επιπλέον, η ροή είναι απαλλαγμένη από παλμικές διακυμάνσεις. Στα μειονεκτήματά τους περιλαμβάνονται η περιορισμένη

χωρητικότητα διαλύτη (250 ml) και η σημαντική δυσκολία κατά την αλλαγή διαλυτών.

Πνευματικές αντλίες: Στις απλούστερες πνευματικές αντλίες η κινητή φάση περιέχεται σε ένα πτυσσόμενο δοχείο που βρίσκεται σε χώρο, που μπορεί να συμπιέζεται με πεπιεσμένο αέριο. Ωστόσο έχουν μικρή χωρητικότητα και χαμηλή παρεχόμενη πίεση και η ταχύτητα ροής εξαρτάται από το ιξώδες και την οπισθοπίεση της στήλης. Δεν προσαρμόζονται σε βαθμιδωτή έκλυση και περιορίζονται σε πιέσεις μικρότερες από 2.000 psi.

4.1.3. Σύστημα εισαγωγής του δείγματος στη στήλη

Η εισαγωγή του υγρού δείγματος γίνεται με μικροσύριγγα κατευθείαν στη στήλη, ή συνήθως διαμέσου βαλβίδας εισαγωγής υψηλής πίεσης με βρόχο. Το μεγάλο πλεονέκτημα αυτών των βαλβίδων είναι ότι δε διακόπτουμε τη ροή του εκλουστικού και εργαζόμαστε σε υψηλές πιέσεις. Σήμερα υπάρχουν βαλβίδες εισαγωγής που μας επιτρέπουν να εισάγουμε διαφορετικούς όγκους στην αναλυτική στήλη.



Σχήμα 4.2. Τρόποι εισαγωγής δείγματος

(α) θέση φορτώσεως, (β) θέση εισαγωγής

4.1.4. Στήλες υγροχρωματογραφίας

Οι στήλες της υγροχρωματογραφίας συνήθως κατασκευάζονται από ευθύγραμμους σωλήνες από ανοξείδωτο χάλυβα μήκους 10 – 30 cm και διαμέτρου 1 – 5 mm (4,6 mm)

- ✓ Προστατευτικές στήλες

Προστατεύουν την αναλυτική στήλη απομακρύνοντας τα συστατικά του δείγματος που συνδέονται μη αντιστρεπτά με τη στατική φάση.

- ✓ Θερμοστάτες στήλης

Μέσω αυτών ελέγχεται η θερμοκρασία. Τα σύγχρονα μηχανήματα ελέγχουν θερμοκρασίες μέχρι 100 °C. Η αύξηση της θερμοκρασίας μειώνει το χρόνο ανάσχεσης και αυξάνει τον αριθμό των θεωρητικών πλακών.

4.1.5. Υλικά πλήρωσης

Οι στήλες πληρούνται γενικά με τρεις τύπους σωματιδίων (πληρωτικών υλικών):

- ✓ Τα μικροπορώδη σωματίδια με διάμετρο πόρου 5 – 10 μm και τα οποία επιτρέπουν τη δίοδο μόνο μικρού μεγέθους συστατικών
- ✓ Τα μακροπορώδη σωματίδια που εκτός από μικρούς μοριακούς πόρους διαθέτουν και μεγάλους πόρους διαμέτρου >60 μm που επιτρέπουν τη δίοδο τόσο των μικρών, όσο και των μεγάλων συστατικών.
- ✓ Τα υμενοειδή σωματίδια 35 – 45 μm, τα οποία διαθέτουν ένα αδρανή πυρήνα καλυμμένο από ένα υμένα υγρής στατικής φάσης και επιτυγχάνεται υψηλή διαχωριστικότητα για μικρούς όγκους δειγμάτων.

4.1.6. Ανιχνευτές

Η ανάπτυξη μιας χρωματογραφικής τεχνικής περιορίζεται εννοιολογικά στο διαχωρισμό και όχι στον ποσοτικό προσδιορισμό του αναλύτη. Η ποσοτικοποίηση αυτή στα συστήματα υγροχρωματογραφίας επιτυγχάνεται με την παράλληλη χρήση ανιχνευτικών διατάξεων. Ρόλος του ανιχνευτή είναι να έχει τη δυνατότητα να διακρίνει κατά κάποιο τρόπο τις αλλαγές στη σύσταση της κινητής φάσης, καθώς η τελευταία εξέρχεται από τη χρωματογραφική στήλη και να τη μεταφράζει σε ηλεκτρικό σήμα, το οποίο προφανώς πρέπει να σχετίζεται με σταθερό και επαναλήψιμο τρόπο με τη συγκέντρωση του προσδιοριζόμενου συστατικού.

Επιθυμητά χαρακτηριστικά ενός ανιχνευτή αποτελούν η ευαισθησία στο προσδιοριζόμενο συστατικό, η οποία καθορίζεται από το λόγο σήματος προς θόρυβο (S/N), η σταθερότητα σε αλλαγές της θερμοκρασίας ή και της σύστασης της κινητής φάσης, όπως συμβαίνει στη βαθμιδωτή έκλυση, η ικανότητά του ως προς τον προσδιορισμό ιχνοποσοτήτων (αυξημένη ανιχνευσιμότητα), ο ελάχιστος δυνατός νεκρός όγκος, ώστε να μη συνεισφέρει σε περαιτέρω διεύρυνση της χρωματογραφικής κορυφής, η ταχεία απόκριση, η υψηλή αξιοπιστία, η ευκολία στη χρήση και το μικρό του κόστος.

Οι ανιχνευτές, οι οποίοι χρησιμοποιούνται στην HPLC, κατατάσσονται σε τέσσερις γενικότερες κατηγορίες, οι οποίες περιλαμβάνουν ανιχνευτές μιας συγκεκριμένης ιδιότητας της προσδιοριζόμενης ουσίας, που δεν επηρεάζεται από την κινητή φάση, συστήματα ανίχνευσης, τα οποία ανταποκρίνονται σε κάποια φυσική ιδιότητα του υγρού εκλούσεως, διατάξεις που βασίζονται στη διάκριση της ουσίας από το διαλύτη έκλυσης και σε εκείνες που βασίζονται στη δημιουργία παραγώγων.

Τα κυριότερα χαρακτηριστικά ποιότητας ενός ανιχνευτή είναι ο θόρυβος (N), ο οποίος προκαλείται από τυχόν αλλαγές στη σύσταση της κινητής φάσης, και πειραματικές, όσο και οργανολογικές αστάθειες, ο χρόνος απόκρισης (τ), ο οποίος δεν πρέπει να υπερβαίνει το δέκατο του εύρους της χρωματογραφικής κορυφής εκφρασμένο σε μονάδες χρόνου, το όριο ανίχνευσης, το οποίο ορίζεται ως η συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας, για την οποία ο

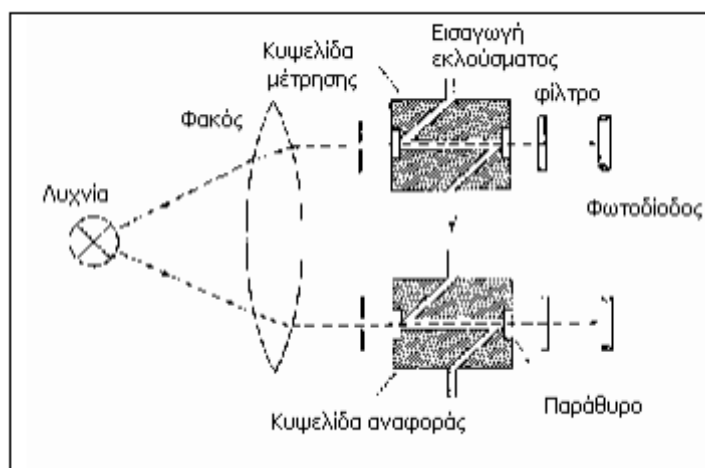
λόγος σήματος προς θόρυβο είναι $S/N=3,3$, η περιοχή γραμμικής απόκρισης, για την οποία η σχέση σήματος-συγκέντρωσης ουσίας είναι γραμμική.

Οι σπουδαιότεροι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην HPLC είναι οι οπτικοί ανιχνευτές, οι ηλεκτροχημικοί και το φασματοόμετρο μαζών.

4.1.6.1. Οπτικοί ανιχνευτές

- ✓ Φασματοφωτομετρικός ανιχνευτής υπεριώδους – ορατού (Σχήμα 4.3)

Πρόκειται για τον πλέον χρησιμοποιούμενο ανιχνευτή, καθώς παρουσιάζει ικανοποιητική ευαισθησία, έχει ευρεία γραμμική περιοχή, δεν επηρεάζεται από θερμοκρασιακές διακυμάνσεις και είναι κατάλληλος για βαθμιδωτή έκλυση. Ανιχνεύει συστατικά με την ιδιότητα να απορροφούν, είτε στο ορατό, είτε στο υπεριώδες φως. Η απορρόφηση λαμβάνει χώρα σε μήκος κύματος μεγαλύτερο από 205 nm, με την προϋπόθεση τα μόρια να φέρουν ομάδες, οι οποίες απορροφούν σε αυτήν την περιοχή (χρωμοφόρες ομάδες), όπως συζυγιακούς διπλούς δεσμούς, καρβονυλικές και νιτρο-ομάδες, αρωματικούς δακτυλίους, κ.α., ενώ δεν είναι κατάλληλος για αναλύτες που απορροφούν στην περιοχή 180-205 nm, όπου απορροφούν η μεγάλη πλειοψηφία των διαλυτών.



Σχήμα 4.3. Αρχή λειτουργίας του φασματοφωτομετρικού ανιχνευτή

✓ Διαφορικός ανιχνευτής δείκτη διαθλάσεως

Η αρχή λειτουργίας ανιχνευτή αυτού του τύπου στηρίζεται στη διαφορά του δείκτη διαθλάσεως του υγρού εκλούσεως από τα προσδιοριζόμενα συστατικά. Αποτελεί ανιχνευτή ευρείας εφαρμογής. Η ευαισθησία του ανιχνευτή αυτού είναι χαμηλή, ως και 1000 φορές λιγότερο ευαίσθητος από το φασματοφωτομετρικό ανιχνευτή. Βασικό μειονέκτημά του αποτελεί η έντονη εξάρτηση της απόκρισής του από τη θερμοκρασία και τις αλλαγές στη σύσταση της κινητής φάσης, για το λόγο αυτό είναι ακατάλληλος για τεχνικές βαθμιδωτής έκλουσης. Οι ανιχνευτές αυτής της κατηγορίας διακρίνονται σε: διαθλασίμετρο τύπου απόκλισης, διαθλασίμετρο τύπου ανάκλασης και συμβολομετρικό διαθλασίμετρο, καθένα από τα οποία έχει διαφορετική αρχή λειτουργίας.

✓ Ανιχνευτής φθορισμού

Οι ανιχνευτές αυτού του τύπου είναι κατάλληλοι για φθορίζουσες ουσίες ή φθορίζοντα παράγωγα ουσιών, με μεγάλη ευαισθησία και εκλεκτικότητα. Οι ανιχνευτές φθορισμού φέρουν κατάλληλα φίλτρα διέγερσης και εκπομπής καθορισμένου μήκους κύματος. Η αρχή λειτουργίας τους βασίζεται στη διέγερση μίας φθορίζουσας ουσίας με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος και την προκύπτουσα εκπομπή δευτερογενούς ακτινοβολίας από την ουσία. Η ένταση της ακτινοβολίας εκπομπής είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αναλύτη. Στους φθορισμομετρικούς ανιχνευτές χρησιμοποιούνται λυχνίες δευτερίου ή ξένου με συστήματα επιλογής μήκους κύματος φίλτρα ή μονοχρωμάτορες. Ως μειονεκτήματα θεωρούνται το υψηλό κόστος, ο μικρός αριθμός ουσιών με δυνατότητα φθορισμού, καθώς και η εξάρτηση της γραμμικής περιοχής από το δείγμα, το διαλύτη και τα συνυπάρχοντα συστατικά.

✓ Ανιχνευτής χημειοφωταύγειας

Η αρχή λειτουργίας του ανιχνευτή αυτού του τύπου ομοιάζει με την αρχή λειτουργίας φθορισμομετρικού ανιχνευτή με τη διαφορά ότι η διέγερση του φθορίζοντος μορίου προκαλείται από την ενέργεια που απελευθερώνει μία

εξώθερμη αντίδραση ή το ίδιο το φθορίζον μόριο παράγεται σε διεγερμένη κατάσταση από μία χημική αντίδραση. Εξαιτίας αυτού δεν απαιτείται πηγή διέγερσης με αποτέλεσμα τη μείωση του ενδογενούς θορύβου και την αύξηση της ευαισθησίας του ανιχνευτή. Διακρίνονται σε ανιχνευτές αερίου ή υγρής φάσης.

✓ Εξατμιστικός ανιχνευτής

Πρόκειται για ημιγενικό ανιχνευτή κατάλληλο και συμβατό για χρωματογραφικά συστήματα HPLC, καθώς και συστήματα υπερκρίσιμων υγρών (Supercritical Fluid Chromatography, SFC) και αντιροής (Counter Current Chromatography, CCC). Χαρακτηρίζεται ως ημιγενικός, διότι μόρια λιγότερο πτητικά από την κινητή φάση δε μπορούν να προσδιορισθούν. Στα πρώτα στάδια της πορείας του εξατμιστικού ανιχνευτή κι εξαιτίας της χαμηλής του ευαισθησίας έναντι άλλων ανιχνευτών, χρησιμοποιήθηκε περισσότερο με χρωματογραφικές τεχνικές, όπως η Gel Permeation Chromatography (GPC) και η SFC. Η απόκριση του ανιχνευτή είναι ανάλογη με τη μάζα του δείγματος, χαρακτηριστικό εξαιρετικά χρήσιμο στον προσδιορισμό της καθαρότητας δείγματος ή στην ανίχνευση αγνώστων ουσιών. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι ανιχνευτές αυτού του τύπου παρόλο που βασίζονται στη σκέδαση του φωτός διαφέρουν σημαντικά από τους ανιχνευτές σκέδασης που ακολουθούν τις θεωρίες Rayleigh, Fraunhofer ή Mie για τον προσδιορισμό του μεγέθους ή της απόλυτης μάζας σωματιδίων.

4.1.6.2. Ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές

Οι ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές χρησιμοποιούνται ευρέως στη Υγροχρωματογραφία και μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με την αρχή λειτουργίας τους σε δύο κυρίως κατηγορίες: τους αμπερομετρικούς και τους αγωγιμομετρικούς. Αναλύτες που παρουσιάζουν ηλεκτροχημική δραστηριότητα είναι συνηθέστεροι εκείνων που παρουσιάζουν φθορίζουσα ή φωταυγή συμπεριφορά. Παρόλο που η παραγωγοποίηση δεν αποτελεί συνήθη πρακτική σε έναν ηλεκτροχημικό προσδιορισμό, βιβλιογραφικά αναφέρονται πλήθος αντιδραστηρίων που μπορούν να μετατρέψουν ένα μη ηλεκτρνεργό αναλύτη σε ηλεκτροχημικά ενεργό.

✓ Αγωγιμομετρικοί ανιχνευτές

Η αρχή λειτουργίας του εν λόγω ανιχνευτή βασίζεται στην εφαρμογή εναλλασσόμενου δυναμικού εντός κυψελίδας και ακολούθως στη μέτρηση της αντίστασης του εκλούσματος. Για την αντιμετώπιση του προβλήματος της αγωγιμότητας της κινητής φάσης, κυρίως σε περιπτώσεις ιονανταλλαγής εφαρμόζεται «καταστολή» της αγωγιμότητας υποβάθρου. Η καταστολή σε περίπτωση προσδιορισμού ανιόντων εφαρμόζεται με ανταλλαγή όλων των ανιόντων της κινητής φάσης με ανιόντα υδροξυλίου, ενώ για τους προσδιορισμούς κατιόντων με ανταλλαγή των κατιόντων της κινητής φάσης με πρωτόνια.

✓ Αμπερομετρικός ανιχνευτής σταθερού δυναμικού

Αποτελεί ανιχνευτή που χρησιμοποιείται για ουσίες που ηλεκτρολύονται σε κατάλληλο δυναμικό πλην όμως διαφορετικό από εκείνο που ηλεκτρολύονται τα συστατικά της κινητής φάσης ή και του ηλεκτροδίου εργασίας. Η τεχνική αυτής της ανίχνευσης βασίζεται στη μέτρηση της έντασης του ρεύματος που προκαλείται από την οξειδωση ή την αναγωγή των εκλουόμενων ουσιών στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας. Η μετρούμενη ένταση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αναλύτη (νόμος Faraday). Χαρακτηριστικό του ανιχνευτή αποτελεί η υψηλή ανιχνευσιμότητα και ευαισθησία του για πλήθος ενώσεων με ηλεκτροχημική δραστικότητα, με συνέπεια την ευρεία εφαρμογή του στον τομέα της ιχνοανάλυσης.

4.1.6.3. Ανιχνευτής φασματομετρίας μαζών

Η ανίχνευση ουσιών με εφαρμογή φασματομετρίας μαζών (LC-MS) αποτελεί μια από τις πλέον ευαίσθητες, αξιόπιστες και εκλεκτικές τεχνικές στον τομέα της υγροχρωματογραφίας, καθώς παρέχει στον ερευνητή τη δυνατότητα εξαγωγής συμπερασμάτων καθοριστικών για τη δομή και την ταυτότητα μιας ουσίας από τη μελέτη του φάσματος μαζών της. Έτσι ενώ σε ένα τυπικό χρωματογράφημα γενικού ανιχνευτή παρέχονται πληροφορίες σχετικά με το

πλήθος των ουσιών και την ποσότητάς του, ο προσδιορισμός του είδους της ουσίας είναι δυσχερής και βασίζεται κυρίως στη χρωματογραφική συμπεριφορά της ουσίας έναντι μεταβολών σε διάφορες άλλες παραμέτρους και σε σύγκριση με πρότυπα, οι υψηλά ειδικόι ανιχνευτές παρέχουν αναλυτικό σήμα χαρακτηριστικό της προσδιοριζόμενης ουσίας. Ανιχνευτές αυτού του είδους είναι το φασματόμετρο μαζών (MS), το φασματόμετρο υπερύθρου (IR) και τα συστήματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Από τους ανιχνευτές υψηλής ειδικότητας χρησιμοποιείται ευρύτερα το φασματόμετρο μαζών, στο οποίο η αρχή λειτουργίας του βασίζεται στη θραυσματοποίηση της ουσίας υπό ελεγχόμενες και συγκεκριμένες συνθήκες και τον ακριβή προσδιορισμό του συντακτικού της τύπου από τα σχηματιζόμενα ιοντισμένα θραύσματα. Τα κύρια στοιχεία από τα οποία αποτελείται ένα φασματόμετρο μαζών είναι το σύστημα σύνδεσής του με την αναλυτική στήλη, η πηγή ιόντων και ο αναλυτής μαζών.

4.1.7. Ολοκληρωτής – Καταγραφέας

Πρόκειται για πιο εξελιγμένο καταγραφικό σύστημα με δυνατότητα όχι μόνο καταγραφής, αλλά και υπολογιστικής επεξεργασίας των δεδομένων με τη βοήθεια ηλεκτρονικού ολοκληρωτή. Το αναλογικό σήμα, το οποίο λαμβάνεται από τον ανιχνευτή, μετατρέπεται σε ψηφιακό και στη συνέχεια γίνεται η επεξεργασία του με ολοκλήρωση των χρωματογραφικών κορυφών, καθώς και η αποθήκευσή τους. Υπάρχουν πλήθος συναρτήσεων για να καλύψουν τις απαιτήσεις επεξεργασίας του αναλυτικού σήματος και τον καλύτερο υπολογισμό. Αν και αποτελεί αξιόπιστη και αντικειμενική υπολογιστική μέθοδο, τα λαμβανόμενα αποτελέσματα πρέπει να εξετάζονται από το χειριστή για την ορθότητα και την ακρίβειά τους. Μειονέκτημα αποτελεί εξάλλου και η περιορισμένη χωρητικότητα της μνήμης του.

4.2. Επικύρωση μεθόδου

Κατά τη διαδικασία αυτή, επιβεβαιώνεται με τη βοήθεια εργαστηριακών δοκιμών, ότι τα χαρακτηριστικά λειτουργίας της μεθόδου πληρούν τις προϋποθέσεις και τις απαιτήσεις για την προβλεπόμενη αναλυτική εφαρμογή. Το στάδιο αυτό είναι απαραίτητο μιας και η σωστή επικύρωση της μεθόδου συνεπάγεται ότι η εν λόγω μέθοδος δύναται να χρησιμοποιηθεί σε διαφορετικά εργαστήρια για το συγκεκριμένο σκοπό. Οι αναλυτικές παράμετροι οι οποίες μελετώνται κατά την αξιολόγηση της μεθόδου είναι οι παρακάτω:

4.2.1. Ακρίβεια

Η ακρίβεια είναι μια ποιοτική έννοια. Ο ορισμός της κατά ISO 5725-1:1994 δίνεται ως «Η εγγύτητα της συμφωνίας μεταξύ του αποτελέσματος μιας δοκιμής και της αποδεκτής τιμής αναφοράς». Ουσιαστικά με τον όρο ακρίβεια, αναφερόμαστε σε ένα μέτρο προσέγγισης των αποτελεσμάτων τα οποία λαμβάνονται με τη μέθοδο η οποία αναπτύχθηκε, σε συνάρτηση με την πραγματική τιμή, ενώ πρακτικά η ακρίβεια δίνει την απόκλιση μεταξύ της μέσης ευρεθείσας τιμής και της πραγματικής (ορθότητα).

4.2.2. Πιστότητα (Precision)

Με τον όρο πιστότητα, αναφερόμαστε στο χαρακτηριστικό της μεθόδου να παρέχει ίδια αποτελέσματα για ένα δείγμα που αναλύεται κάτω από καθορισμένες συνθήκες. Υπάρχουν 3 υποσύνολα της πιστότητας, ανάλογα με τις συνθήκες μέτρησης.

- ✓ **Επαναληψιμότητα (Repeatability):** Πρόκειται για την εγγύτητα της συμφωνίας μεταξύ αποτελεσμάτων ανεξάρτητων δοκιμών τα οποία έχουν ληφθεί κάτω από τις ίδιες ακριβώς συνθήκες. Η επαναληψιμότητα εξαρτάται μόνο από την κατανομή τυχαίων

σφαλμάτων. Ο υπολογισμός της επιτυγχάνεται προσδιορίζοντας την τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων των δοκιμών από επαναληπτικές μετρήσεις. Χρησιμοποιώντας αριθμητικούς όρους, μεγάλη τιμή για την τυπική απόκλιση δείχνει φτωχή επαναληψιμότητα. Τα μέτρα της επαναληψιμότητας εξαρτώνται σε κρίσιμο βαθμό από τη σταθερότητα των συνθηκών κάτω από τις οποίες γίνονται οι μετρήσεις. Η μέγιστη ανεκτή διαφορά δύο μετρήσεων που διεξάγονται σε συνθήκες επαναληψιμότητας ονομάζεται όριο επαναληψιμότητας (r) και ισούται με $2,8 \times SD_r$.

- ✓ Ενδιάμεση πιστότητα (Intermediate Precision) ή ενδοεργαστηριακή επαναληψιμότητα: Εκφράζει τη διασπορά μέσα στο ίδιο το εργαστήριο σε όσο το δυνατό διαφορετικές συνθήκες (χρόνος, χειριστές, όργανα, παρτίδες αντιδραστηρίων). Η μέγιστη ανεκτή διαφορά δύο μετρήσεων σε συνθήκες ενδιάμεσης πιστότητας λέγεται όριο ενδιάμεσης πιστότητας (R) και ισούται με $2 \times SD_R$.
- ✓ Αναπαραγωγιμότητα (Reproducibility): Εκφράζει τη διασπορά σε διαφορετικά εργαστήρια.

4.2.3. Γραμμικότητα

Πρόκειται για την εξάρτηση της απόκρισης του ανιχνευτή από την εισαγόμενη συγκέντρωση ή απόλυτη ποσότητα της ουσίας. Προσδιορίζεται με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων και εκφράζεται με το συντελεστή γραμμικής συσχέτισης. Ορθότερα αναφέρεται στην καλή προσαρμογή του γραμμικού μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα της καμπύλης αναφοράς.

4.2.4. Εύρος γραμμικής περιοχής

Ουσιαστικά πρόκειται για το διάστημα μεταξύ της μικρότερης και της μεγαλύτερης συγκέντρωσης του συστατικού, το οποίο μπορεί να προσδιοριστεί με ικανοποιητική ακρίβεια, επαναληψιμότητα και γραμμικότητα.

4.2.5. Ευαισθησία

Με τον όρο ευαισθησία ορίζουμε το λόγο σήματος προς τη μάζα, ο οποίος δίνεται από την κλίση της ευθείας στο διάγραμμα της καμπύλης αναφοράς.

4.2.6. Όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD)

Το όριο ανίχνευσης μιας αναλυτικής μεθόδου είναι η μικρότερη ποσότητα / συγκέντρωση της ένωσης που πρόκειται να διαχωριστεί / προσδιορισθεί σε ένα δείγμα, η οποία μπορεί να ανιχνευτεί, αλλά όχι αναγκαστικά να προσδιορισθεί ως μια ακριβής τιμή. Το όριο ανίχνευσης εκφρασμένο ως η συγκέντρωση cL ή η ποσότητα qL παράγεται από το ελάχιστο σήμα xL το οποίο μπορεί να ανιχνευτεί με λογική βεβαιότητα για ορισμένη διαδικασία. Η τιμή xL δίνεται από την εξίσωση:

$$xL = xbl + ksbl \text{ όπου,}$$

xbl: η μέση τιμή των λευκών μετρήσεων,

sbl: η τυπική απόκλιση των μετρήσεων του λευκού δείγματος,

k: ένας αριθμητικός παράγοντας ο οποίος επιλέγεται ανάλογα με το επίπεδο εμπιστοσύνης το οποίο απαιτείται και συνήθως είναι 3,3.

Σε πολλές περιπτώσεις μεθόδων που έχουν γραμμή βάσης (π.χ. HPLC) το όριο ανίχνευσης προσδιορίζεται ως η συγκέντρωση / ποσότητα για την οποία ο λόγος σήματος / θορύβου ισούται με 3,3. Ο συγκεκριμένος τρόπος έκφρασης είναι επαρκής κατά τη διάρκεια επικύρωσης της μεθόδου, καθώς παρέχει ένδειξη της συγκέντρωσης στην οποία η ανίχνευση γίνεται πιο προβληματική. Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι σε ιδανικές συνθήκες το όριο ανίχνευσης της μεθόδου το οποίο επιλέγεται θα πρέπει να είναι τουλάχιστον το ένα δέκατο της συγκέντρωσης που πρόκειται να μετρηθεί.

4.2.7. Όριο ποσοτικής αποτίμησης (Limit of quantitation, LOQ)

Σε ορισμένες περιπτώσεις όπου δεν είναι μόνο απαραίτητο να ανιχνευτεί η παρουσία της ένωσης, αλλά να προσδιοριστεί και η ποσότητα της με λογική στατιστική βεβαιότητα χρησιμοποιείται και το όριο ποσοτικής αποτίμησης ή όριο προσδιορισμού. Ουσιαστικά πρόκειται για την ελάχιστη ποσότητα μιας ένωσης προς ανάλυση σε ένα δείγμα, η οποία μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με ακρίβεια και επαναληψιμότητα και ισούται με το 3πλάσιο του LOD. Προσδιορίζεται με μεθόδους ανάλογες του LOD.

4.2.8. Ανθεκτικότητα (Ruggedness)

Αντιστοιχεί στην ενδιάμεση πιστότητα της μεθόδου και εκφράζει την ικανότητα της μεθόδου να παρέχει ίδια αποτελέσματα για ένα δείγμα με όσο το δυνατό διαφορετικές συνθήκες.

4.2.9. Αντοχή (Robustness)

Σε αντίθεση με την προηγούμενη παράμετρο, πρόκειται για μέτρο της ικανότητας της μεθόδου να παραμένει ανεπηρέαστη από μικρές, αλλά σκόπιμες μεταβολές των λειτουργικών παραμέτρων.

4.2.10. Εκλεκτικότητα(Selectivity)

Ο όρος αυτός αναφέρεται στην ικανότητα της μεθόδου να προσδιορίζει με ακρίβεια μια ομάδα ουσιών σε ένα υπόστρωμα δείγματος.

4.2.11. Ειδικότητα (Specificity)

Η εξειδίκευση, είναι παράμετρος η οποία μας εξασφαλίζει ότι το σήμα το οποίο λαμβάνεται, προέρχεται από την ένωση η οποία μας ενδιαφέρει και δεν υπάρχει καμία παρεμπόδιση από έκδοχα, προϊόντα αποικοδόμησης ή προσμίξεις.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Ρανιτιδίνη – Ranitidine

5.1 Αντιελκωτικά φάρμακα^[12]

Τα αντιελκωτικά φάρμακα δρουν εξωκυτταρικά, ενδοκυτταρικά επί της κυτταρικής μεμβράνης, με υποδοχείς ή όχι, και άρα αποτελούν μία ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα κατηγορία για την κατανόηση των τύπων των φαρμακοδυναμικών επιδράσεων.

Δύο συστήματα βρίσκονται σε διαρκή αντιπαλότητα στο στομάχο, το σύστημα που ελέγχει τη γαστρική έκκριση και παράγει το HCl και την πεψίνη και το σύστημα του γαστρικού βλεννογόνου, με την παραγωγή της γαστρικής βλέννας, των διπτανθρακικών μορίων κ.ά. Σκοπός του στομάχου είναι να πέψει τις τροφές χωρίς να αυτοπεφθεί. Διαταραχές της ισορροπίας των δύο συστημάτων θα έχουν ως αποτέλεσμα την προσβολή του γαστρικού βλεννογόνου από το HCl και την πεψίνη και τη δημιουργία μικρής ή μεγάλης εξέλκωσης. Αν η εξέλκωση βρίσκεται στο στομάχι ονομάζεται γαστρικό έλκος, αν βρίσκεται στο ανώτερο τμήμα του εντέρου το δωδεκαδάκτυλο, δωδεκαδακτυλικό έλκος. Ο όρος πεπτικό έλκος καλύπτει και τις δύο περιοχές. Τα συνήθη συμπτώματα του έλκους είναι ο πόνος στην περιοχή του στομάχου (πόνος πείνας), η τάση προς έμετο και ο έμετος, η απώλεια όρεξης και βάρους. Οι συνήθεις επιπλοκές είναι η γαστρορραγία, όταν το έλκος προχωρήσει στο τοίχωμα του στομάχου και διαβρώσει κάποιο αγγείο και η διάτρηση, όταν το έλκος διαπεράσει το τοίχωμα του στομάχου. Στην τελευταία περίπτωση μικρόβια από τον αυλό του εντέρου εισέρχονται στο άσηπτο περιβάλλον του περιτοναίου και προκαλούν περιτονίτιδα.

Ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες που μπορούν να διαταράξουν την ισορροπία υπέρ των γαστρικών υγρών είναι:

- α) η χρόνια χρήση οινοπνεύματος,
- β) το κάπνισμα,

γ) η χρήση φαρμάκων όπως τα ΜΣΑΦ (ασπιρίνη κ.ά.)

δ) το stress,

ε) διάφορες τοξικές τροφές (τηγανητά, πικάντικα κ.ά.),

στ) η χρόνια λοίμωξη από ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (helicobacter) και

ζ) άλλα (π.χ. μηχανική βλάβη).

Όλοι αυτοί οι παράγοντες δημιουργούν συνθήκες υπερχλωρυδρίας ή αδυναμίας του βλεννογόνου να αντιδράσει φυσιολογικά και η κάθε μία από αυτές αντιμετωπίζεται αφ' ενός με την απάλειψη του υπεύθυνου ερεθισμού, αφ' ετέρου με τη χορήγηση αντιελκωτικών φαρμάκων.

Μέχρι σήμερα κανένα από τα φάρμακα που έχουμε στη διάθεσή μας δεν άλλαξε την φυσική ιστορία της ελκωτικής νόσου αλλά όλα σχεδόν έχουν την δυνατότητα να μειώνουν τον πόνο, να θεραπεύουν τα έλκη, να μειώνουν τις υποτροπές και τέλος να μειώνουν και τις επιπλοκές.

Τα αντιελκωτικά φάρμακα μπορούν να χωρισθούν σε τέσσερις κατηγορίες:

- τα αντιόξινα,
- αυτά που μειώνουν τη γαστρική έκκριση,
- αυτά που επικαλύπτουν το γαστρικό βλεννογόνο
- τα αντιβακτηριδιακά

5.2 Ανταγωνιστές των H2 υποδοχέων

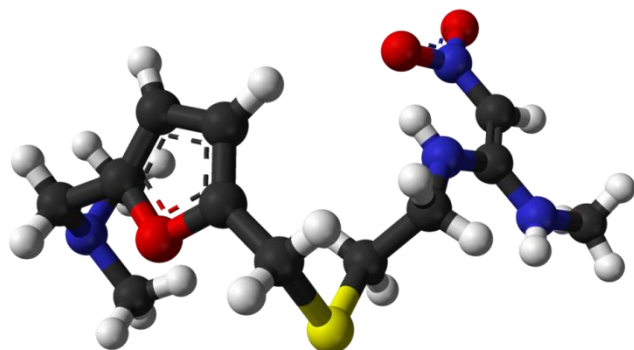
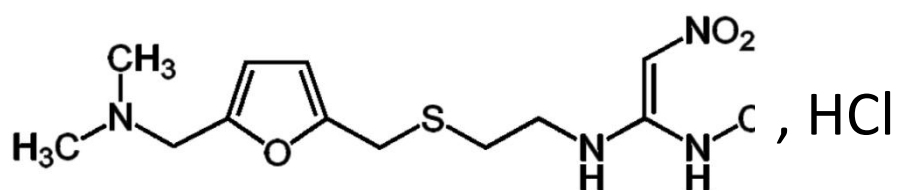
(Φάρμακα που μειώνουν την έκκριση HCl)

Τα φάρμακα αυτά δεσμεύουν τους H2-υποδοχείς της ισταμίνης στη μεμβράνη των τοιχωματικών κυττάρων του στομάχου, αναστέλλοντας έτσι την έκκριση του υδροχλωρικού οξέος. Αν και η ισχύς της ανασταλτικής τους δράσης ποικίλλει, εντούτοις το ποσοστό επούλωσης του έλκους στο ίδιο χρονικό

διάστημα και με τις ανάλογες δόσεις είναι συγκρίσιμο. Όλοι οι H₂-ανταγωνιστές είναι ασφαλείς και με περιορισμένες ανεπιθύμητες ενέργειες, οι οποίες συνήθως υποχωρούν με τη διακοπή του φαρμάκου.

Τα φάρμακα αυτά είναι ανάστροφοι αγωνιστές (inverse agonists) και όχι ανταγωνιστές, καθώς όταν ενωθούν με τον υποδοχέα προκαλούν την αντίθετη ακριβώς ενέργεια, ενώ οι ανταγωνιστές αποκλείουν μία ενέργεια. Οι H₂ υποδοχείς αποτέλεσαν πραγματική επανάσταση στη θεραπευτική του έλκους του στομάχου μετά τη διαπίστωση ότι έχουν τη δυνατότητα να θεραπεύουν το 80% των ασθενών. Κάποιες διαφορές στη χημική σύνθεση του πρώτου φαρμάκου που κυκλοφόρησε, της σιμετιδίνης (Tagamet), έδωσαν γένεση στα νεότερα φάρμακα, τη ρανιτιδίνη (Zantac), τη φαμοτιδίνη κ.ά. Οι νεότεροι H₂ αναστολείς είναι αρκετές φορές ισχυρότεροι από τους αρχικούς και παρουσιάζουν λιγότερα προβλήματα αλληλεπιδράσεων με άλλα φάρμακα.

5.3 Υδροχλωρική Ρανιτιδίνη C₁₃H₂₃ClN₄O₃S^[13-16]



Εικόνα 5.1 Χημικός και μοριακός τύπος Υδροχλωρικής Ρανιτιδίνης^[13]

Η ρανιτιδίνη (ranitidine) είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικός H₂-ανταγωνιστής της ισταμίνης, με πολύ γρήγορη δράση. Αναστέλλει τη βασική και τη μετά από διέγερση γαστρική έκκριση, μειώνοντας τον όγκο και την περιεκτικότητά της σε οξύ και πεψίνη.^[14]

Η υδροχλωρική ρανιτιδίνη αποτελεί επίσημο φάρμακο της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας (ΕΦ). Είναι λευκή ή υποκίτρινη κοκκώδης σκόνη με ελαφρώς πικρή γεύση και μυρωδιά θείου. Σύμφωνα με τη μονογραφία πρώτης ύλης της ΕΦ η περιεκτικότητά της πρέπει να είναι 98,5-101,5%. Είναι υγροσκοπική ουσία με ευαισθησία στο φως. Διαλύεται εύκολα σε οξικό οξύ και νερό, ενώ είναι λιγότερο διαλυτή στη μεθανόλη, ελάχιστα διαλυτή σε αιθανόλη και πρακτικά αδιάλυτη σε χλωροφόρμιο.^[15]

Έλεγχοι πρώτης ύλης:

- Ταυτοποίηση με Φασματοφωτομετρία υπερύθρου συγκρίνοντας το φάσμα με εκείνο της ουσίας αναφοράς
- Εμφάνιση διαλύματος: Διάλυμα 1 g/100 ml είναι διαυγές και όχι περισσότερο έγχρωμο του προτύπου διαλύματος BY₅
- pH διαλύματος 1 g/100 ml : 4,5-6,0
- Συγγενείς ουσίες με υγροχρωματογραφία: Δυνατή η ύπαρξη 10 προσμίξεων, των οποίων οι τύποι περιέχονται στη μονογραφία
- Βαρέα μέταλλα: Μέγιστο τα 20 ppm. Ο έλεγχος γίνεται με σύγκριση του χρώματος PbS που χρησιμοποιείται ως πρότυπο.
- Απώλεια νερού κατά τη ξήρανση: Μέχρι 0,75% σε 1,000 g στους 60 °C και υπό συνθήκες υψηλού κενού.
- Θειική τέφρα : μέγιστο το 0,1%, προσδιοριζόμενοι σε 1,0 g.

- Ποσοτικός προδιορισμός: Ογκομέτρηση με πρότυπο διάλυμα NaOH 0,1 M με ποτενσιομετρικό εντοπισμό του τελικού σημείου.

5.3.1. Μηχανισμός δράσης της ρανιτιδίνης

Η ισταμίνη για να δράσει στα κύτταρα χρησιμοποιεί δύο υποδοχείς, τον H1 που βρίσκεται στα μαστοκύτταρα και τα βασεόφιλα και η διέγερσή του προκαλεί τα φλεγμονώδη φαινόμενα της αλλεργικής αντίδρασης και τον H2 υποδοχέα των τοιχωματικών κυττάρων του στομάχου που η διέγερσή του προκαλεί αύξηση της παραγωγής HCl. Οι H2 ανταγωνιστές ανταγωνίζονται την ισταμίνη στην κατάληψη του υποδοχέα στα τοιχωματικά κύτταρα και προκαλούν μείωση της σύνθεσης HCl, αλλά και την αναισθησία του συγκεκριμένου υποδοχέα στις διεγερτικές δυνατότητες της γαστρίνης και της ακετυλοχολίνης.

Η ρανιτιδίνη ως ένας ανταγωνιστικός, αντιστρεπτός αναστολέας της δράσης της ισταμίνης στους H2 υποδοχείς οδηγεί στη μειωμένη έκκριση του γαστρικού οξέος και του γαστρικού όγκου, και τη μειωμένη συγκέντρωση ιόντων υδρογόνου.

Η ισταμίνη είναι αζωτούχος οργανική ένωση που εμπλέκεται στην τοπική ανοσολογική απόκριση καθώς και στη ρύθμιση της λειτουργίας στα κοιλιακά σπλάχνα. Συντίθεται από την αποκαρβοξυλίωση του αμινοξέος ιστιδίνης. Μετά την απελευθέρωσή της, η ιστιδίνη επιδρά σε πολλούς ιστούς, προκαλώντας σύσπαση των λείων μυών στους πνεύμονες, τη μήτρα και το στομάχι. Στο στομάχι επίσης αυξάνει την έκκριση γαστρικού οξέος και επιταχύνει τον καρδιακό παλμό.

Οι H2 υποδοχείς συζεύγνυνται θετικά με την αδενυλική κυκλάση μέσω Gs. Είναι ένα ισχυρό διεγερτικό της παραγωγής cAMP, η οποία οδηγεί στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A. Η λειτουργία της PKA είναι η φωσφορυλίωση ορισμένων πρωτεϊνών, επηρεάζοντας τη δραστηριότητά τους.

5.3.2 Κλινικές ενδείξεις

- Χρόνια επεισοδιακή δυσπεψία που χαρακτηρίζεται από πόνο (επιγαστρικό ή οπισθοστερνικό) και που σχετίζεται με τη λήψη γευμάτων, αλλά δεν συνδέεται με τις παραπάνω καταστάσεις.
- Έλκος βολβού 12-δακτύλου, στομάχου και μετεγχειρητικό έλκος.
- Καταστάσεις γαστρικής υπερέκκρισης (σύνδρομο ZOLLINGER – ELLISON, συστηματική μαστοκύτωση κ.λ.π.).
- Οισοφαγίτιδα από γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση, πρόληψη αιμορραγικής γαστρίτιδας σε βαρέως πάσχοντες, μεταβολικής αλκάλωσης σε ασθενείς με παρατεταμένη γαστρική αναρρόφηση.
- Πρόληψη του δωδεκαδακτυλικού έλκους που συνδέεται με τη θεραπεία μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων και ειδικότερα:
 1. Σε ασυμπτωματικούς ασθενείς με πρόσφατα διαγνωσθέν έλκος ανεξαρτήτως ηλικίας και ιδιαίτερως σ' εκείνους άνω των 70 ετών.
 2. Σε γυναίκες ηλικίας άνω των 70 ετών χωρίς ιστορικό έλκους, λόγω του κατά 5 φορές υψηλότερου σχετικού κινδύνου ανάπτυξης πεπτικού έλκους σε σύγκριση με άρρενες της αυτής ηλικίας.
 3. Σε ασθενείς με ιστορικό ελκοπάθειας που η μακροχρόνια λήψη μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων είναι αναγκαία.

5.3.3 Δοσολογία και τρόπος χορήγησης

Από του στόματος

Ενήλικες / Έφηβοι (12 ετών και άνω)

Σε χρόνια επεισοδιακή δυσπεψία η συνήθης δοσολογία είναι 150 mg δύο φορές την ημέρα μέχρι 6 εβδομάδες. Οποιοσδήποτε ασθενής δεν ανταποκρίνεται στη θεραπεία ή υποτροπιάζει πρέπει άμεσα να ελέγχεται. Η συνήθης δοσολογία για γαστροδωδεκαδακτυλικό έλκος είναι 150 mg δύο φορές την ημέρα, είτε 300 mg το βράδυ. Στις περισσότερες περιπτώσεις καλοήθους γαστρικού και δωδεκαδακτυλικού έλκους η επούλωση γίνεται σε 4 εβδομάδες. Σε ασθενείς που η επούλωση δεν ολοκληρώνεται σ' αυτό το διάστημα, παράταση της θεραπείας για ακόμη 4 εβδομάδες συνήθως οδηγεί σε επούλωση του έλκους. Στο δωδεκαδακτυλικό έλκος δοσολογία 300mg δύο φορές την ημέρα για 4 εβδομάδες έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη συχνότητα επούλωσης συγκριτικά με τη δοσολογία των 150 mg δύο φορές την ημέρα ή 300 mg κάθε βράδυ. Θεραπεία συντήρησης: 150 mg κάθε βράδυ.

Σε έλκη που εμφανίζονται μετά από θεραπεία με μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα, ή που σχετίζονται με την παρατεταμένη θεραπεία με μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα, χορηγούνται 150 mg πρωί και βράδυ. Θεραπεία 8 εβδομάδων μπορεί να κριθεί απαραίτητη.

Σε οισοφαγίτιδα από γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση χορηγούνται 150 mg δύο φορές την ημέρα είτε 300 mg κάθε βράδυ για 8 εβδομάδες και αν χρειασθεί 12 εβδομάδες. Σε ασθενείς με σοβαρή οισοφαγίτιδα και σε όσους δεν ανταποκρίνονται στη συνιστώμενη δοσολογία της ρανιτιδίνης, η δόση αυξάνεται σε 150 mg 4 φορές την ημέρα για 8 εβδομάδες. Θεραπεία μακράς διάρκειας επουλωμένης οισοφαγίτιδας 150 mg x 2 ημερησίως.

Στο σύνδρομο Zollinger-Ellison αρχικά χορηγούνται 150 mg 3 φορές την ημέρα και αν κριθεί απαραίτητο η δοσολογία μπορεί να αυξηθεί (μπορεί να απαιτηθούν δόσεις και πάνω από 3 g ημερησίως σε διηρημένες δόσεις). Στην πρόληψη αιμορραγίας ελκών από stress σε βαρέως πάσχοντες ή σε ασθενείς με αιμορραγούντα έλκη, η θεραπεία 150 mg δύο φορές την ημέρα μπορεί να αντικαταστήσει την ενέσιμη χορήγηση μόλις αρχίσει η διατροφή από το στόμα.

Στην πρόληψη εισρόφησης γαστρικού περιεχομένου χορηγούνται 150 mg 2

ώρες πριν την έναρξη της γενικής αναισθησίας, και ακόμα καλύτερα άλλα 150 mg την παραμονή το βράδυ. Για τον ίδιο σκοπό ως εναλλακτική λύση μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ενέσιμη μορφή. Στις εγκύους χορηγούνται με την έναρξη του τοκετού 150 mg και στη συνέχεια κάθε 6 ώρες και αν απαιτηθεί γενική αναισθησία συνιστάται να χορηγείται επιπρόσθετα ένα αντιόξινο (π.χ. κιτρικό νάτριο).

Παιδιά από 3 ετών έως 11 ετών και βάρους άνω των 30 kg

Στην οξεία αντιμετώπιση πεπτικού έλκους, η συνιστώμενη δόση είναι 4-8 mg/kg/ημέρα χορηγούμενη σε δύο διηρημένες δόσεις με μέγιστη δόση τα 300 mg ρανιτιδίνης ημερησίως για διάρκεια 4 εβδομάδων. Για όσους ασθενείς δεν έχουν πλήρη επούλωση, ενδείκνυνται άλλες 4 εβδομάδες θεραπείας, καθώς η επούλωση συνήθως επισυμβαίνει μετά από οκτώ εβδομάδες θεραπείας. Στη γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση η συνιστώμενη δόση είναι 5-10 mg/kg/ημέρα, χορηγούμενη σε δύο διηρημένες δόσεις με μέγιστη δόση τα 600 mg (η μέγιστη δόση είναι πιθανό να εφαρμόζεται σε βαρύτερα παιδιά ή έφηβους με σοβαρά συμπτώματα).

Η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα σε νεογέννητα δεν έχει τεκμηριωθεί.

Για ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια: κάθαρση κρεατινίνης <50 ml/min

Η συνιστώμενη δόση είναι 150 mg/24 h το βράδυ για 4-6 εβδομάδες. Συσσώρευση της ρανιτιδίνης με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης στο πλάσμα μπορεί να συμβεί σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια (κάθαρση κρεατινίνης μικρότερη από 50 ml/min). Σ' αυτούς τους ασθενείς συνιστάται η ημερήσια δόση της ρανιτιδίνης να είναι 150 mg. Εάν το απαιτεί η κατάσταση του ασθενούς μπορεί να χορηγηθεί κάθε 12 h με προσοχή

5.3.4 Υπερδοσολογία

Πρόκληση εμέτου, ή πλύση στομάχου για την απομάκρυνση των καταποθέντων δισκίων. Υποστηρικτική – συμπτωματική αντιμετώπιση. Στην

περίπτωση των αναβραζουσών μορφών, ο ιατρός θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη την περιεκτικότητα σε νάτριο (Na).

5.3.5 Ειδικές προειδοποιήσεις και προφυλάξεις κατά τη χρήση

- *Κακοήθεια* : Η ύπαρξη κακοήθειας πρέπει να αποκλεισθεί πριν από την έναρξη θεραπείας ασθενών με γαστρικό έλκος (είτε πρόκειται για μεσήλικες ή και μεγαλύτερης ηλικίας άτομα, είτε για άτομα με πρόσφατη μεταβολή των δυσπεπτικών τους συμπτωμάτων), επειδή η θεραπεία με ρανιτιδίνη μπορεί να αποκρύψει συμπτώματα γαστρικού καρκινώματος.
- *Νεφρική ανεπάρκεια*: Η ρανιτιδίνη απεκκρίνεται από τους νεφρούς με αποτέλεσμα η συγκέντρωσή της στο πλάσμα, να αυξάνεται σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια. Το δοσολογικό σχήμα πρέπει να ρυθμίζεται σύμφωνα με τη δοσολογία που συνιστάται στη νεφρική ανεπάρκεια.
- *Αιματολογικές διαταραχές*: Σπάνιες κλινικές αναφορές πιθανολογούν ότι η ρανιτιδίνη μπορεί να προδιαθέσει σε οξείες πορφυρικές προσβολές. Γι' αυτό η χρήση της ρανιτιδίνης θα πρέπει να αποφεύγεται σε ασθενείς με ιστορικό οξείας πορφυρίας. Προσοχή σε ασθενείς με λευκοπενία, σε περίπτωση χορήγησης απαιτείται συχνή παρακολούθηση των λευκών αιμοσφαιρίων.
- *Ηπατική ανεπάρκεια*: Να χορηγείται με προσοχή και σε μειωμένη δόση σε ασθενείς με ηπατική ανεπάρκεια.
- *Ηλικιωμένοι ή πάσχοντες από σοβαρά νοσήματα*: Συνιστάται μείωση της δόσης ανάλογα με την περίπτωση λόγω του αυξημένου κινδύνου εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών. Συνιστάται ο τακτικός έλεγχος των ασθενών που παίρνουν μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη σε συνδυασμό με ρανιτιδίνη, ιδιαίτερα στους ηλικιωμένους και σε άτομα με ιστορικό πεπτικού έλκους.

Γενικά:

Σε απότομη διακοπή υπάρχει αυξημένος κίνδυνος υποτροπών και επιπλοκών (διάτρηση, αιμορραγία) του έλκους.

Η χορήγηση αντιόξινων, όταν κρίνεται αναγκαία, να γίνεται στα ενδιάμεσα της χορήγησης του φαρμάκου.

Στους υπερτασικούς συνιστάται η παρακολούθηση της αρτηριακής πίεσης. Σπάνια έχει αναφερθεί βραδυκαρδία η οποία σχετίζεται με τη γρήγορη χορήγηση του ενεσίμου, συνήθως σε ασθενείς με παράγοντες που προδιαθέτουν σε διαταραχές της καρδιακής συχνότητας. Να ακολουθείται ο συνιστώμενος στη δοσολογία ρυθμός χορήγησης. Σε ασθενείς όπως ηλικιωμένοι, άτομα με χρόνια πνευμονοπάθεια, διαβήτη, ή σε ανοσοκατασταλαμένους, μπορεί να υπάρχει αυξημένος κίνδυνος ανάπτυξης πνευμονίας της κοινότητας.

Μια μεγάλη επιδημιολογική μελέτη έδειξε αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης πνευμονίας της κοινότητας σε τρέχοντες χρήστες ανταγωνιστών των H2 υποδοχέων, συγκριτικά με αυτούς που είχαν σταματήσει τη θεραπεία, με παρατηρούμενη προσαρμοσμένη αύξηση του σχετικού κινδύνου 1,82 (95% CI, 1,26-2,64).

5.3.6 Αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα και άλλες μορφές αλληλεπίδρασης

Η ρανιτιδίνη έχει τη δυνατότητα να επηρεάζει την απορρόφηση, τον μεταβολισμό ή τη νεφρική κάθαρση άλλων φαρμάκων. Η μεταβαλλόμενη φαρμακοκινητική μπορεί να απαιτεί ρύθμιση της δοσολογίας του φαρμάκου που επηρεάζεται η διακοπή της θεραπείας. Οι αλληλεπιδράσεις συντελούνται με διάφορους μηχανισμούς που περιλαμβάνουν: 1) Αναστολή του κυτοχρώματος P450 που συνδέεται με το σύστημα οξυγενάσης Η ρανιτιδίνη σε συνήθεις θεραπευτικές δόσεις δεν ενισχύει τις δράσεις φαρμάκων που αδρανοποιούνται από αυτό το ενζυμικό σύστημα, όπως είναι η διαζεπάμη, η λιδοκαΐνη, η φαινυτοΐνη, η προπρανολόλη και η θεοφυλλίνη.

Υπάρχουν αναφορές μεταβαλλόμενου χρόνου προθρομβίνης με κουμαρινικά αντιπηκτικά (π.χ βαρφαρίνη). Λόγω του στενού θεραπευτικού δείκτη,

συνιστάται στενή παρακολούθηση της αύξησης ή της μείωσης του χρόνου προθρομβίνης, κατά τη διάρκεια ταυτόχρονης θεραπείας με ρανιτιδίνη.

2) Ανταγωνισμός για νεφρική σωληναριακή απέκκριση:

Επειδή η ρανιτιδίνη απεκκρίνεται μερικώς από το κατιοντικό σύστημα, μπορεί να επηρεάζει την κάθαρση άλλων φαρμάκων που απεκκρίνονται μέσω αυτής της οδού. Υψηλές δόσεις ρανιτιδίνης (π.χ όπως αυτές που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του συνδρόμου Zollinger-Ellison) μπορεί να μειώσουν την έκκριση προκαΐναμιδίνης και N-ακετυλοπροκαΐναμίδης με αποτέλεσμα αύξηση των επιπέδων στο πλάσμα αυτών των φαρμάκων.

3) Μεταβολή του γαστρικού pH:

Η βιοδιαθεσιμότητα ορισμένων φαρμάκων μπορεί να επηρεάζεται. Αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα, είτε αύξηση της απορρόφησης (π.χ. τριαζολάμη, γλιπιζίδη, μιδαζολάμη) ή μείωση της απορρόφησης (π.χ κετοκοναζόλη, αταζαναβίρη, δελαβιριδίνη, γεφιτινίβη).

5.3.7 Κύηση και γαλουχία

Χρήση κατά την κύηση: Η ρανιτιδίνη διαπερνά τον πλακούντα. Όπως όλα τα φάρμακα, η ρανιτιδίνη πρέπει να χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια της κύησης μόνο αν υπάρχει απόλυτη ανάγκη.

Χρήση κατά τη γαλουχία : Η ρανιτιδίνη εκκρίνεται στο μητρικό γάλα και γι' αυτό δε συνιστάται η χορήγηση κατά την περίοδο της γαλουχίας.

5.3.8 Ανεπιθύμητες ενέργειες

Η ασφάλεια της ρανιτιδίνης έχει αξιολογηθεί σε παιδιά με πάθηση που σχετίζεται με την έκκριση υδροχλωρικού οξέος από τη γέννηση έως την ηλικία των 16 ετών και ήταν γενικά καλά ανεκτή με ένα προφίλ ανεπιθύμητων ενεργειών που ομοιάζει με αυτό των ενηλίκων. Υπάρχουν περιορισμένα διαθέσιμα δεδομένα μακροχρόνιας ασφάλειας, ιδιαίτερα όσον αφορά την ανάπτυξη των παιδιών. Η ακόλουθη συνθήκη έχει χρησιμοποιηθεί για την κατηγοριοποίηση των ανεπιθύμητων ενεργειών: πολύ συχνές (>1/10), συχνές

(>1/100, 1/1.000, 1/10.000).

Οι συχνότητες των ανεπιθύμητων καταστάσεων έχουν υπολογισθεί από αυθόρμητες αναφορές από στοιχεία μετά την κυκλοφορία του φαρμάκου.

Διαταραχές του αίματος και του λεμφικού συστήματος

Πολύ σπάνιες: Αιματολογικές διαταραχές (λευκοπενία, θρομβοκυτοπενία). Αυτές είναι συνήθως αναστρέψιμες. Ακοκκιοκυτταραιμία ή πανκυτταροπενία, μερικές φορές με υποπλασία ή απλασία του μυελού των οστών.

Διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος

Σπάνιες: Αντιδράσεις υπερευαισθησίας (κνίδωση, αγγειοίδημα, πυρετός, βρογχόσπασμος, υπόταση και πόνος στο θώρακα).

Πολύ σπάνιες: Αναφυλακτικό σοκ.

Αυτές οι καταστάσεις έχουν αναφερθεί μετά από χορήγηση μόνο μίας δόσης.

Ψυχιατρικές διαταραχές

Πολύ σπάνιες: Αναστρέψιμη διανοητική σύγχυση, κατάθλιψη και παραισθήσεις.

Αυτές έχουν αναφερθεί κυρίως σε σοβαρά άρρωστους και ηλικιωμένους ασθενείς.

Διαταραχές του νευρικού συστήματος

Πολύ σπάνιες: Κεφαλαλγία (μερικές φορές έντονη), ζάλη και αναστρέψιμες ακούσιες κινητικές διαταραχές.

Διαταραχές των οφθαλμών

Πολύ σπάνιες: Αναστρέψιμη θόλωση της όρασης. Έχουν αναφερθεί περιστατικά θόλωσης της όρασης που είναι πιθανό να οφείλονται σε μεταβολή της προσαρμογής.

Καρδιακές διαταραχές

Πολύ σπάνιες: Όπως και με άλλους H₂-ανταγωνιστές της ισταμίνης, βραδυκαρδία, ταχυκαρδία και κολποκοιλιακός αποκλεισμός.

Αγγειακές διαταραχές.

Πολύ σπάνιες: Αγγειίτιδα, γαστρεντερικές διαταραχές.

Πολύ σπάνιες: Οξεία παγκρεατίτιδα, διάρροια.

Όχι συχνές: Κοιλιακό άλγος, δυσκοιλιότητα, ναυτία (τα συμπτώματα αυτά βελτιώνονται σε μεγάλο βαθμό με τη συνέχιση της αγωγής).

Ηπατοχολικές διαταραχές

Σπάνιες: Παροδικές και αναστρέψιμες μεταβολές στις λειτουργικές δοκιμασίες του ήπατος.

Πολύ σπάνιες Ηπατίτιδα (ηπατοκυτταρική, ηπατοχολαγγειακή ή μικτή) με ή χωρίς ίκτερο. Αυτά τα περιστατικά ήταν συνήθως αναστρέψιμα.

Διαταραχές του δέρματος και του υποδόριου ιστού

Σπάνιες: Δερματικό εξάνθημα.

Πολύ σπάνιες: Πολύμορφο ερύθημα, αλωπεκία

Μυοσκελετικές διαταραχές και διαταραχές των συνδετικών ιστών

Πολύ σπάνιες: Μυοσκελετικά συμπτώματα, όπως αρθραλγία και μυαλγία.

Διαταραχές των νεφρών και του ουροποιητικού συστήματος

Πολύ σπάνιες: Οξεία διάμεση νεφρίτιδα.

Σπάνιες: Αύξηση της κρεατινίνης πλάσματος (συνήθως ελαφρά: επανέρχεται σε φυσιολογικές τιμές με τη συνέχιση της αγωγής).

Αναπαραγωγικό σύστημα και διαταραχές των μαστών

Πολύ σπάνιες: Αναστρέψιμη ανικανότητα και συμπτώματα από τους μαστούς και καταστάσεις των μαστών (όπως γυναικομαστία και γαλακτόρροια).

5.3.9 Φαρμακοκινητικές ιδιότητες

Απορρόφηση: Μετά από του στόματος χορήγηση 150 mg ρανιτιδίνης, οι μέγιστες συγκεντρώσεις στο πλάσμα (300 έως 550 ng/mL) εμφανίσθηκαν μετά από 1-3 ώρες. Η επαναπορρόφηση του φαρμάκου που εκκρίθηκε στο έντερο έχει ως αποτέλεσμα δύο ξεχωριστές μέγιστες τιμές ή ένα πλατώ στη φάση απορρόφησης. Η απόλυτη βιοδιαθεσιμότητα της ρανιτιδίνης είναι 50-60% και οι συγκεντρώσεις στο πλάσμα αυξάνονται ανάλογα με την αύξηση της δόσης έως τα 300 mg. Όταν χορηγούνται υψηλές δόσεις sucralfate (2 g) σε συνδυασμό με ρανιτιδίνη, η απορρόφηση της ρανιτιδίνης μπορεί να μειωθεί. Το αποτέλεσμα αυτό δεν παρατηρείται αν το sucralfate χορηγηθεί 2 ώρες μετά τη χορήγηση της ρανιτιδίνης. Η απορρόφηση της ρανιτιδίνης μετά από ενδομυϊκή χορήγηση είναι γρήγορη και η μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα επιτυγχάνεται σε 15 min.

Κατανομή: Η ρανιτιδίνη δεν συνδέεται εκτεταμένα με πρωτεΐνες του πλάσματος (15%), αλλά επιδεικνύει ένα μεγάλο όγκο κατανομής που ποικίλλει από 96 έως 142 λίτρα.

Μεταβολισμός: Η ρανιτιδίνη μεταβολίζεται σε μικρές μόνο ποσότητες. Η αποβολή του φαρμάκου γίνεται κυρίως με σωληναριακή απέκκριση. Η ημιπερίοδος ζωής της αποβολής είναι περίπου 2-3 ώρες. Το κλάσμα της δόσης που ανακτάται είναι παρόμοιο μετά τη χορήγηση, τόσο από το στόμα, όσο και ενδοφλέβια και περιλαμβάνει 6% της δόσης από τα ούρα σαν N-οξειδίο, 2% ως S-οξειδίο, 2% ως απομεθυλιωμένη ρανιτιδίνη και το 1-2% ως ανάλογο του φουροϊκού οξέος.

Αποβολή: Οι συγκεντρώσεις στο πλάσμα μειώνονται δι-εκθετικά, με τελική ημιπερίοδο ζωής 2-3 ώρες. Η κυριότερη οδός αποβολής είναι η νεφρική. Μετά από ενδοφλέβια χορήγηση 150 mg 3 H-ρανιτιδίνης, ανακτήθηκε 98% της δόσης, περιλαμβανομένου 5% από τα κόπρανα και 93% από τα ούρα, από τα οποία 70% ήταν αμετάβλητο αρχικό φάρμακο. Μετά από του στόματος χορήγηση 150 mg 3 H-ρανιτιδίνης, ανακτήθηκε 96% της δόσης, 26% από τα κόπρανα και 70% από τα ούρα, από τα οποία 35% ήταν αμετάβλητο αρχικό φάρμακο. Λιγότερο από 3% της δόσης εκκρίνεται από τη χολή.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

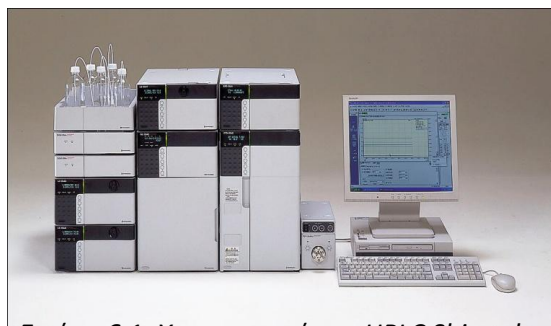
ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ, ΔΙΑΛΥΤΕΣ, ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

6.1 Όργανα

Παρακάτω παρουσιάζονται τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν.

6.1.1 Χρωματογράφοι

Χρησιμοποιήθηκαν τρία χρωματογραφικά συστήματα HPLC της εταιρείας Shimadzu, τα οποία απαρτίζονται από έναν απαερωτή κινητής φάσης DGU-20A₅, μία αντλία δύο πιστονιών τύπου LC-20 AD, έναν αυτόματο δειγματολήπτη SIL-20AC_{HT}, ένα φούρνο για τη ρύθμιση της θερμοκρασίας της στήλης τύπου CTO-20AC και τέλος έναν ανιχνευτή φωτοδιόδων DAD SPD-M20 για την περιοχή του ορατού και του υπεριώδους, εξοπλισμένο με λυχνίες βολφραμίου (W) και δευτερίου (D₂). (Εικόνα 6.1)



Εικόνα 6.1. Χρωματογράφος HPLC Shimadzu

Κάθε χρωματογράφος είναι συνδεδεμένος με ξεχωριστό υπολογιστή, στον οποίο είναι εγκατεστημένο το λογισμικό LC Solutions (v.1.11 SP1) της εταιρείας Shimadzu. Με το λογισμικό αυτό, γίνεται ο έλεγχος της λειτουργίας του συστήματος, η καταγραφή, η επεξεργασία και η αποθήκευση των χρωματογραφημάτων. Για την εκτύπωσή τους χρησιμοποιήθηκε ο εκτυπωτής HP Laserjet P1005 της εταιρείας Hewlett Packard. Κατά τη διάρκεια της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν οι χρωματογράφοι με κωδικούς οργάνου A-LC-01, A-LC-02 και A-LC-04.

6.1.2 Αναλυτικός ζυγός

Για ζυγίσεις ποσοτήτων μεγαλύτερες από 10 mg, χρησιμοποιήθηκε ζυγός AUW320 4 δεκαδικών ψηφίων της εταιρείας Shimadzu, ενώ για ζυγίσεις μικρότερων ποσοτήτων, χρησιμοποιήθηκε ζυγός Sartorius 5 δεκαδικών ψηφίων. (Εικόνα 6.2)



Εικόνα 6.2. Αναλυτικός ζυγός Shimadzu

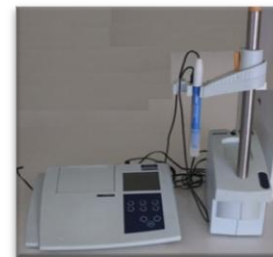
Προφυλάξεις αναλυτικού ζυγού

- ✓ Ο ζυγός πρέπει να είναι πάνω σε μια αρκετά σταθερή επιφάνεια, που δεν θα χρησιμοποιείται για τίποτα άλλο, π.χ. γράψιμο.
- ✓ Το δωμάτιο που βρίσκεται ο ζυγός θα πρέπει να έχει σταθερή θερμοκρασία και υγρασία και να μην έχει ρεύματα αέρος.
- ✓ Το επίπεδο του ζυγού πρέπει να είναι πάντα οριζόντιο.
- ✓ Το κάλυμμα του ζυγού, εάν έχει, πρέπει να είναι κλειστό.
- ✓ Τα προς ζύγιση αντικείμενα πρέπει να τοποθετούνται με λαβίδες στο δίσκο ζύγισης.
- ✓ Τα προς ζύγιση αντικείμενα πρέπει να μην διαβρώνουν το ζυγό.
- ✓ Δεν πρέπει να υπερφορτώνεται ο ζυγός.
- ✓ Μετά τη ζύγιση πρέπει να αφαιρούνται όλα τα βάρη και να καλύπτεται ο ζυγός.
- ✓ Ο ζυγός πρέπει να διατηρείται καθαρός.

Τα σφάλματα κατά τη ζύγιση οφείλονται στην άνωση του αέρα, που προκαλείται από τη διαφορά του όγκου των προς ζύγιση αντικειμένων με τα πρότυπα βάρη, και ο στατικός ηλεκτρισμός, που αναπτύσσεται συνήθως στα γυάλινα ή πλαστικά αντικείμενα.

6.1.3 Πεχάμετρο

Χρησιμοποιήθηκε πεχάμετρο Consort C3010 (Εικόνα 6.3) της εταιρείας Heach. Βαθμονόμηση του οργάνου γίνεται μία φορά την εβδομάδα με πρότυπα ρυθμιστικά διαλύματα pH 4,0, pH 7,0 και pH 10,0, ενώ έλεγχος καλής λειτουργίας γίνεται στην αρχή κάθε ημέρας με πρότυπα ρυθμιστικά διαλύματα pH 4,0 και pH 7,0



Εικόνα 6.3. Πεχάμετρο

6.1.4 Συσκευή υπερήχων

Για τη διευκόλυνση της διαλυτοποίησης ορισμένων ουσιών, έγινε χρήση λουτρού υπερήχων. Χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο 2510 της εταιρείας Branson.(Εικόνα 6.4)



Εικόνα 6.4 Συσκευή υπερήχων

6.1.5 Συσκευή ελέγχου διαλυτότητας

Η συσκευή διαλυτότητας αποτελείται από 6 δοχεία, ένα θερμόμετρο και εξαρτήματα περιστροφής των σκευασμάτων (πτερύγια - paddles) .(Εικόνα 6.5)



Εικόνα 6.5 Πτερύγια συσκευής διαλυτότητας



Εικόνα 6.6. Συσκευή διαλυτότητας

Ο έλεγχος διαλυτότητας δισκίου είναι ένας τυποποιημένος έλεγχος για μέτρηση του ρυθμού απελευθέρωσης του φαρμάκου από μία δοσομετρική μορφή. Ο έλεγχος διαλυτότητας περιλαμβάνεται στους in-vitro ελέγχους των σκευασμάτων που αποσκοπούν στη βελτιστοποίηση και στο συνεχή έλεγχο ποιότητας.(Εικόνα 6.6)

6.2 Διαλύτες

- ✓ Νερό HPLC: Το νερό περιέχει βακτήρια, ιόντα, παράσιτα, οργανικά μόρια, δηλαδή παράγοντες που προκαλούν θόρυβο στο χρωματογράφημα. Είναι λοιπόν αναγκαίο να γίνεται χρήση νερού

απαλλαγμένου από τα παραπάνω στη χρήση χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Για την παρασκευή νερού καθαρότητας HPLC (HPLC grade), νερό βρύσης αρχικά διέρχεται από στήλη απιονισμού και ακολούθως από ειδικό σύστημα παραγωγής ύδατος υψηλής καθαρότητας (EASY pure II (Barnstead)). Νερό αποδεκτής καθαρότητας θεωρείται ότι λαμβάνεται όταν το σύστημα δίνει ένδειξη ειδικής αντίστασης $\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$.

- ✓ Μεθανόλη HPLC, καθαρότητα HPLC

6.3 Αντιδραστήρια

- ✓ HCl , 37 %
- ✓ Διάλυμα Αμμωνίας 25%,
- ✓ 2-προπανόλη
- ✓ 1-προπανόλη
- ✓ Οξικός αιθυλεστέρας
- ✓ Οξικό αμμώνιο

6.4 Υλικά αναφοράς

- ✓ Πρότυπο ρανιτιδίνης, ΗΟΑ φαρμακοποιίας
- ✓ Πρότυπα προσμίξεων, φαρμακοποιίας

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

Έλεγχος ποιότητας δισκίων υδροχλωρικής ρανιτιδίνης

Οι έλεγχοι περιλαμβάνουν εμφάνιση, διαστάσεις, μέσο βάρος, διακύμανση βάρους / ομοιομορφία μάζας, ομοιομορφία περιεχομένου , σκληρότητα, υποδιαίρεση δισκίων, διαλυτότητα, συγγενείς ουσίες, έλεγχο περιεκτικότητας και έλεγχο της μικροβιολογικής ποιότητας, ταυτοποίηση του διοξειδίου του τιτανίου. Οι μέθοδοι βασίζονται στις εγκεκριμένες μεθόδους που περιγράφονται σε κάθε υποενότητα.

7.1 Εμφάνιση (Appearance)

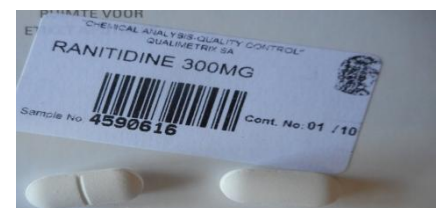
Οι προδιαγραφές για την εμφάνιση είναι η γενική περιγραφή του σχήματος του δισκίου και το χρώμα. Η εμφάνιση εξετάζεται με οπτική εξέταση.

150 mg/tab : Δισκίο κυκλικό κυρτό , λευκού χρώματος και διαμέτρου 10 mm, χωρίς κάποιο διακριτικό χαραγμένο (Εικόνα 7.1).



Εικόνα 7.1 Δισκίο ρανιτιδίνης 150mg/tab

300 mg/tab : Δισκίο επιμήκης κυρτό, λευκού χρώματος και μήκους 17 mm, από τη μία πλευρά , χαραγή στη μέση, από την άλλη κανένα διακριτικό (Εικόνα 7.2).



Εικόνα 7.2 Δισκίο ρανιτιδίνης 300 mg/tab

7.2 Μέση μάζα (Average Mass)

7.2.1. Διαδικασία

Τυχαία παραλαβή 20 δισκίων και ζύγιση με ακρίβεια.

7.2.2. Υπολογισμοί

$$\text{Μέσο βάρος} = \frac{\text{συνολικό βάρος 20 δισκίων}}{20}$$

7.2.3 Προδιαγραφές

150 mg/tab : 285,0 – 315,0 mg

300mg/tab : 564,3 – 623,7 mg

7.3. Διακύμανση βάρους / Ομοιομορφία μάζας (Weight variation / Uniformity of mass)

7.3.1. Διαδικασία

Ζύγιση, με ακρίβεια, 20 δισκίων και υπολογισμός μέσου βάρους. Ζύγιση ίδιων 20 δισκίων ξεχωριστά ένα-ένα. Αναγνώριση του δισκίου με το μέγιστο και το ελάχιστο βάρος.

7.3.2. Υπολογισμοί

$$\text{Μέγιστη απόκλιση \%} = \frac{(W_H - A)}{A} \times 100$$

$$\text{Ελάχιστη απόκλιση \%} = \frac{(A - W_L)}{A} \times 100$$

Όπου W_H : το δισκίο με το μεγαλύτερο βάρος

W_L : το δισκίο με το μικρότερο βάρος

A: το μέσο βάρος των δισκίων

7.3.3. Προδιαγραφές

Όχι περισσότερα από 2 δισκία από τα 20 να αποκλίνουν από το μέσο βάρος κατά περισσότερο από 5%. Κανένα δισκίο από μόνο του δεν πρέπει να αποκλίνει κατά περισσότερο από 10% από το μέσο βάρος.

7.4. Ταυτοποίηση ρανιτιδίνης

7.4.1 TLC

7.4.1.1 Παράμετροι μεθόδου

- Πλάκα : SIL G-25 U254, 20x20 cm, πάχους 0.25 mm
- Αντιδραστήρια : Νερό HPLC, NH₃ 25% , MeOH, 2- προπανόλη, οξικός αιθυλεστέρας
- Κινητή φάση : Νερό/ Αμμωνία 25% / 2 –προπανόλη / οξικός αιθυλεστέρας (2/4/15/25, v/v/v/v)
- Διαλύτης : Μεθανόλη
- Χρωματογραφικές παράμετροι : Εισαγωγή 10 μL, ανίχνευση με UV-light 254 nm

Διάλυμα 1 : διάλυση 223,3 mg υδροχλωρικής ρανιτιδίνης σε 10 ml μεθανόλης

Διάλυμα 2 : διάλυση 400 mg από τη σκόνη των δισκίων των 150 mg σε 10 ml μεθανόλης 396 mg τη σκόνη των δισκίων των 300 mg σε 10 ml μεθανόλης

Διάλυμα 3 : αραίωση 0,3 ml του Δ/τος 2 σε ογκομετρική των 100 ml (0,3 %)

Διάλυμα 4 : αραίωση 0,2 ml του Δ/τος 2 σε ογκομετρική των 100 ml (0,2%)

Διάλυμα 5 : αραίωση 0,1 ml του Δ/τος 2 σε ογκομετρική των 100 ml (0,1%)

Διάλυμα 6 : αραίωση 0,2 ml του Δ/τος 2 σε ογκομετρική των 200 ml (0,05%)

Διάλυμα 7 : διάλυση 10 mg του Impurity I σε 10 ml μεθανόλης

Διάλυμα 8 : διάλυση 10 ml του Impurity II σε 100 ml μεθανόλης

7.4.1.2 Διαδικασία ανίχνευσης

Αρχικά προετοιμάζουμε το θάλαμο για τη χρωματογραφία που περιέχει την κινητή φάση. Με πιπέτα μεταβλητού όγκου τοποθετούμε μία σταγόνα για κάθε διάλυμα, σε ύψος ενός εκατοστού από τη βάση της πλάκας. Τοποθετούμε τη χρωματογραφική πλάκα στο θάλαμο. Όταν ο διαλύτης έχει φτάσει στα 3/4 του μήκους της πλάκας, μεταφέρουμε την πλάκα στο UV (254 nm) και παρατηρούμε.

7.4.1.3 Αξιολόγηση

Η κύρια κηλίδα στο χρωματογράφημα που λαμβάνεται από το δείγμα ελέγχου πρέπει να αντιστοιχεί με αυτή που λαμβάνεται από το δ/μα αναφοράς σε μέγεθος και τιμή Rf

Rf Ranitidine: 0,71

Rf Impurity 1: 0,75

Rf Impurity 2: 0,73

7.5 Έλεγχος περιετικότητας (Assay)

7.5.1. Παράμετροι μεθόδου

- Οργανολογία : HPLC – UV
- Αναλυτική στήλη : μbonda pack C18, 300 x 3,9 mm, 10 μm Waters
- Αντιδραστήρια : Νερό HPLC, MeOH HPLC, οξικό αμμώνιο
- Πρότυπα : Υδροχλωρική ρανιτιδίνη
- Κινητή φάση : MeOH 0,1 M / CH₃COONH₄ 850:150 (φιλτραρισμένα σε κενό)
- Διαλύτης : MeOH

- Χρωματογραφικές παράμετροι : ροή στήλης 1.0 ml/min, ανίχνευση μήκους κύματος 322 nm, όγκος εισαγωγής 20 μ L , θερμοκρασία στήλης περιβάλλοντος
- Διάλυμα αναφοράς (150 μ g/mL) : Διάλυση 167,4 mg υδροχλωρικής ρανιτιδίνης σε φιάλη των 100,0 mL. Προσθήκη MeOH μέχρι χαραγής.

Επιπλέον αραιώση 5,0 mL αυτού του δ/τος σε 50,0 mL με MeOH.

- Διάλυμα ελέγχου (150 mg/tab) : Διάλυση 300 mg σκόνης του δισκίου σε ογκομετρική φιάλη των 100,0 mL. Προσθήκη 80 mL MeOH και τοποθέτηση σε υπέρηχους για 30 min. Μετά την πάροδο 10 min, αραιώση μέχρι χαραγής. Φυγοκέντριση σε 4000 rpm για 5 min. Αραιώση 5 mL του δ/τος σε 50 mL MeOH.

7.5.2 Υπολογισμοί

$$\% \text{Assay} = \frac{A_{\text{test}} \times W_{\text{t.test}} \times W_{\text{r.std}}}{A_{\text{std}} \times W_{\text{r.test}} \times W_{\text{t.std}}} \times \%P$$

A_{test} : Εμβαδόν κορυφής της ρανιτιδίνης του διαλύματος ελέγχου

A_{std} : Εμβαδόν κορυφής της ρανιτιδίνης του πρότυπου διαλύματος

$W_{\text{t.test}}$: Το θεωρητικό βάρος του δείγματος για την προετοιμασία του δείγματος ελέγχου (mg).

$W_{\text{t.std}}$: Το θεωρητικό βάρος του υλικού αναφοράς για την προετοιμασία του πρότυπου διαλύματος (mg).

$W_{\text{r.test}}$: Το πραγματικό βάρος του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία του διαλύματος ελέγχου (mg).

$W_{\text{r.std}}$: Το πραγματικό βάρος του υλικού αναφοράς για την προετοιμασία του πρότυπου διαλύματος (mg).

$\%P$: Η % ποσότητα καθαρότητας του υλικού αναφοράς της πρότυπης υδροχλωρικής ρανιτιδίνης.

7.6 Διαλυτότητα (Dissolution)

7.6.1 Παράμετροι μεθόδου

- Οργανολογία: Φασματοφωτόμετρο UV, συσκευή διαλυτότητας
- Αντιδραστήρια: H₂O HPLC, HCl (37%), HCl ρανιτιδίνη ως πρότυπο εργασίας
- Μέσο διαλυτότητας: HCl (0,1 M)

Μεταφορά 8.58 mL HCl 37% σε ογκομετρική φιάλη του 1 L και αραίωση μέχρι χαραγής.

- Παράμετροι ελέγχου διαλυτότητας:

Συσκευή II – πτερύγια

Όγκος: 1000 mL

Θερμοκρασία: 37 (±0,5) °C

Ταχύτητα περιστροφής: 75 rpm

Χρόνος: 45 min

Δείγμα: 1 δισκίο ανά δοχείο

- Διάλυμα αναφοράς ρανιτιδίνης (150 µg/mL) : Μεταφορά 167,4 mg σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Διάλυση στο μέσο διάλυσης και τοποθέτηση σε λουτρό υπερήχων για 5 min. Αραίωση μέχρι τη χαραγή. Περαιτέρω αραίωση 5 mL του διαλύματος σε 50 mL HCl (0.1M). Μέτρηση της απορρόφησης αυτού του διαλύματος στα 317 nm και χρήση του μέσου διαλυτότητας ως λευκό.
- Διάλυμα ελέγχου (150 mg/tab) : Λήψη 20 mL δείγματος και διήθηση με φίλτρο μεμβράνης Nylon 0,45 µm. Μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος στα 317 nm και χρήση του μέσου διαλυτότητας ως λευκό.

- Διάλυμα ελέγχου (300 mg/tab) : Λήψη 20 mL δείγματος και διήθηση με φίλτρο μεμβράνης Nylon 0,45 μm. Αραίωση 5 mL από το φιλτραρισμένο διάλυμα σε 10 mL HCl (0,1M). . Μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος στα 317 nm και χρήση του μέσου διαλυτότητας ως λευκό.
- Καταλληλότητα συστήματος: Εκτέλεση τριών διαδοχικών μετρήσεων απορρόφησης του διαλύματος αναφοράς.

Κριτήρια αποδοχής: Το % RSD της απορρόφησης να είναι μικρότερο του 2.0.

7.6.2 Υπολογισμοί

Ο υπολογισμός της % διαλυτότητας της ρανιτιδίνης γίνεται με την παρακάτω εξίσωση :

$$DR = \frac{ATSD}{ARSD} \times \frac{CRSD}{CTSD} \times 100$$

A_{TSD}: Απορρόφηση του δ/τος ελέγχου

A_{RSD}: Απορρόφηση του πρότυπου δ/τος

C_{RSD}: Συγκέντρωση ρανιτιδίνης στο πρότυπο δ/μα (μg/mL)

C_{TSD}: Συγκέντρωση ρανιτιδίνης στο δ/μα ελέγχου (μg/mL)

7.6.3 Προδιαγραφές

(για 150 και 300 mg/tab)

Εντός 45 min, πρέπει να έχει διαλυθεί τουλάχιστον το 80% της ρανιτιδίνης.

7.7. Ομοιομορφία περιεχομένου (Content uniformity)

7.7.1 Παράμετροι μεθόδου

- Οργανολογία : HPLC – UV
- Αναλυτική στήλη : μbonda pack C18, 300 x 3,9 mm, 10 μm Waters
- Αντιδραστήρια : Νερό HPLC , MeOH HPLC, οξικό αμμώνιο
- Πρότυπα : Υδροχλωρική ρανιτιδίνη
- Κινητή φάση : MeOH 0,1 M / CH₃COONH₄ 850:150 (φιλτραρισμένα σε κενό)
- Διαλύτης : MeOH
- Χρωματογραφικές παράμετροι : ροή στήλης 1,0 ml/min, ανίχνευση μήκους κύματος 322 nm, όγκος εισαγωγής 20 μL, θερμοκρασία στήλης περιβάλλοντος
- Διάλυμα αναφοράς (150 μg/mL) : Διάλυση 167,4 mg υδροχλωρικής ρανιτιδίνης σε φιάλη των 100.0 mL. Προσθήκη MeOH μέχρι χαραγής. Επιπλέον αραιώση 5,0 mL αυτού του δ/τος σε 50,0 mL με MeOH.
- Διάλυμα ελέγχου (150 mg/tab) : Μεταφορά ενός δισκίου σε ογκομετρική φιάλη των 100,0 mL. Προσθήκη 5 mL νερού για αποσάθρωση του. Προσθήκη 80 mL MeOH (διαλύτης) και τοποθέτηση σε υπέρηχους για 30 min. Με την πάροδο 10 min και την ψύξη (σε θερμοκρασία δωματίου) του δ/τος, αραιώση μέχρι χαραγής. Φυγοκέντριση στα 4000 rpm για 5 min. Περαιτέρω αραιώση 5,0 mL του δ/τος σε 50,0 mL διαλύτη.
- Διάλυμα ελέγχου (300 mg/tab) : Μεταφορά ενός δισκίου σε ογκομετρική φιάλη των 200,0 mL. Προσθήκη 5 mL νερού προς αποσύνθεσή του. Αραιώση μέχρι χαραγής και τοποθέτηση σε υπέρηχους για 30 min. Με την πάροδο 10 min και την ψύξη (σε θερμοκρασία δωματίου) του δ/τος, αραιώση μέχρι χαραγής. Φυγοκέντριση στα 4000 rpm για 5 min. Περαιτέρω αραιώση με 50,0 mL του δ/τος σε 50,0 mL διαλύτη.

7.7.2 Προδιαγραφές

(για 150 και 300 mg/tab)

9 στα 10 δισκία : 85-115 %. Εάν ένα δισκίο είναι μεταξύ 75-125%, πρέπει να ελεγχθούν άλλα 20 δισκία. Όλα αυτά τα δισκία θα πρέπει να είναι μεταξύ των ορίων 85-115%.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα πειραματικά αποτελέσματα προέκυψαν από τον έλεγχο δισκίων 150 mg/tab και 300 mg/tab.

8.1 Μέσο βάρος (Average weight)

8.1.1. Δισκία των 150 mg/tab

1	0,2933
2	0,2996
3	0,2987
4	0,3010
5	0,2955
6	0,2989
7	0,2982
8	0,2947
9	0,2975
10	0,2977
11	0,2978
12	0,3041
13	0,2922
14	0,2986
15	0,3056
16	0,3002
17	0,2963
18	0,3021
19	0,3008
20	0,3015

$\bar{m} = 0,2987 \text{ g}$ $SD = 0,0034$ $\%RSD = 1,13$

Για να είναι αποδεκτό το αποτέλεσμα πρέπει να είναι εντός ορίων 285,0-315,0 mg Έτσι το μέσο βάρος 298,7 mg για τα δισκία των 150 mg/tab είναι αποδεκτό.

8.1.2 Δισκία των 300 mg/tab (Batch No. 4590616)

1	0,5869
2	0,5867
3	0,5878
4	0,5889
5	0,5905
6	0,5925
7	0,5832
8	0,5937
9	0,5898
10	0,5890
11	0,5874
12	0,5870
13	0,5873
14	0,5858
15	0,5910
16	0,5925
17	0,5851
18	0,5906
19	0,5940
20	0,5819

\bar{m} =0,5886 g SD=0,0033 %RSD=0,56

Για να είναι αποδεκτό το αποτέλεσμα πρέπει να είναι εντός ορίων 564,3 – 623,7 mg. Έτσι το μέσο βάρος 588,6 mg για τα δισκία των 300 mg/tab είναι αποδεκτό.

8.1.3. Δισκία των 300 mg/tab (Batch No. 4600616)

1	0,6019
2	0,5848
3	0,5861
4	0,5844
5	0,6004
6	0,5870
7	0,5874
8	0,5933
9	0,5933
10	0,5919
11	0,5913
12	0,5845
13	0,5891
14	0,5984
15	0,5956
16	0,5895
17	0,5883
18	0,5857
19	0,5879
20	0,5878

$\bar{m} = 0,5904 \text{ g}$ $SD = 0,0053$ $\%RSD = 0,89$

Για να είναι αποδεκτό το αποτέλεσμα πρέπει να είναι εντός ορίων 564,3 – 623,7 mg Έτσι το μέσο βάρος 590,4 mg για τα δισκία των 300 mg/tab είναι αποδεκτό.

8.2 Διακύμανση βάρους / Ομοιομορφία μάζας (Weight variation/ Uniformity of mass)

8.2.1 Δισκία των 150 mg/tab

$$\text{Μέγιστη απόκλιση \%} = \frac{(W_H - A)}{A} \times 100 = 2,31$$

$$\text{Ελάχιστη απόκλιση \%} = \frac{(A - W_L)}{A} \times 100 = -2,17$$

8.2.2 Δισκία των 300 mg/tab (Batch No.4590616)

$$\text{Μέγιστη απόκλιση \%} = \frac{(W_H - A)}{A} \times 100 = 0,92$$

$$\text{Ελάχιστη απόκλιση \%} = \frac{(A - W_L)}{A} \times 100 = -1,14$$

8.2.3 Δισκία των 300 mg/tab (Batch No.4600616)

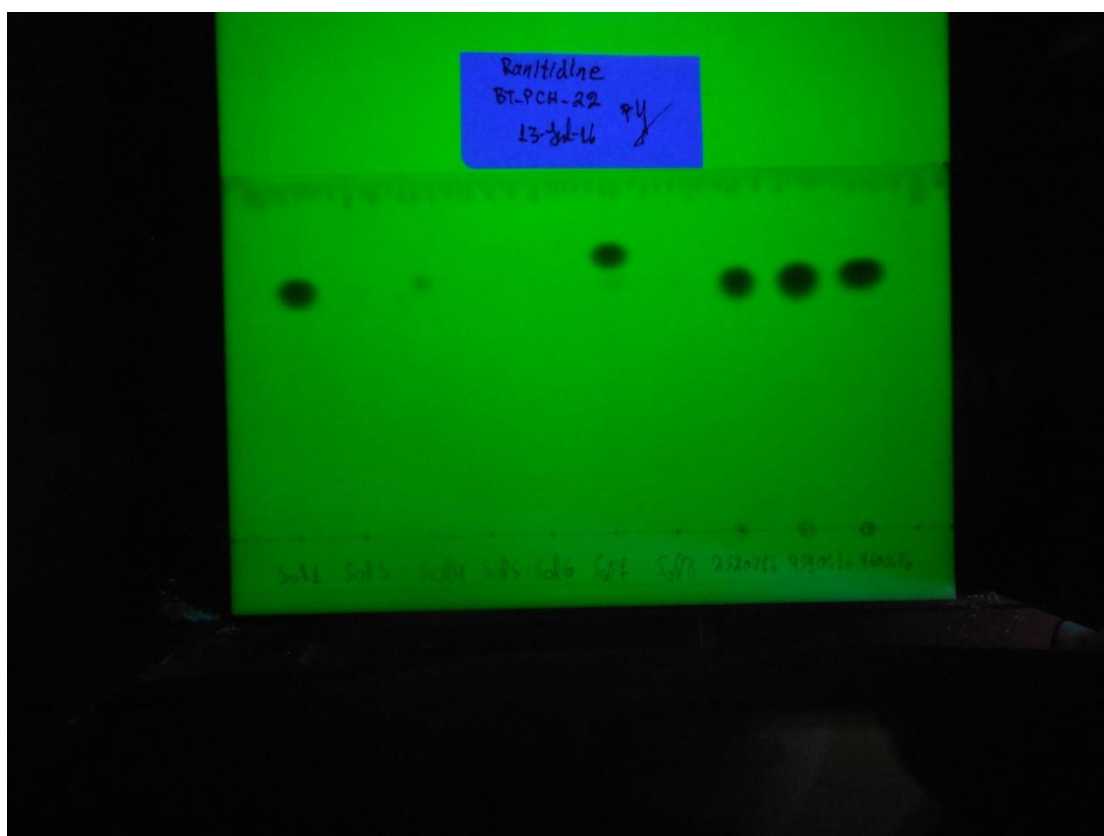
$$\text{Μέγιστη απόκλιση \%} = \frac{(W_H - A)}{A} \times 100 = 1,95$$

$$\text{Ελάχιστη απόκλιση \%} = \frac{(A - W_L)}{A} \times 100 = -1,02$$

Τα αποτελέσματα είναι εντός προδιαγραφών.

8.3 Ταυτοποίηση ρανιτιδίνης (Identification of ranitidine)

TLC



Εικόνα 8.1 Ενδεικτικό χρωματογράφημα TLC για ταυτοποίηση ρανιτιδίνης

Οι κύριες κηλίδες του δείγματος ελέγχου ταιριάζουν με τις τιμές R_f των κηλίδων των δειγμάτων αναφοράς (τρία τελευταία). Άρα είναι αποδεκτό.

8.4 Έλεγχος περιεκτικότητας (Assay)

8.4.1 Δισκία των 150 mg/tab

$$\% \text{Assay} = \frac{A_{\text{test}} \times W_{\text{t test}} \times W_{\text{r.std}}}{A_{\text{std}} \times W_{\text{r.test}} \times W_{\text{t.std}}} \times \%P = 98,6 \%$$

8.4.2 Δισκία των 300 mg/tab (Batch No.4590616)

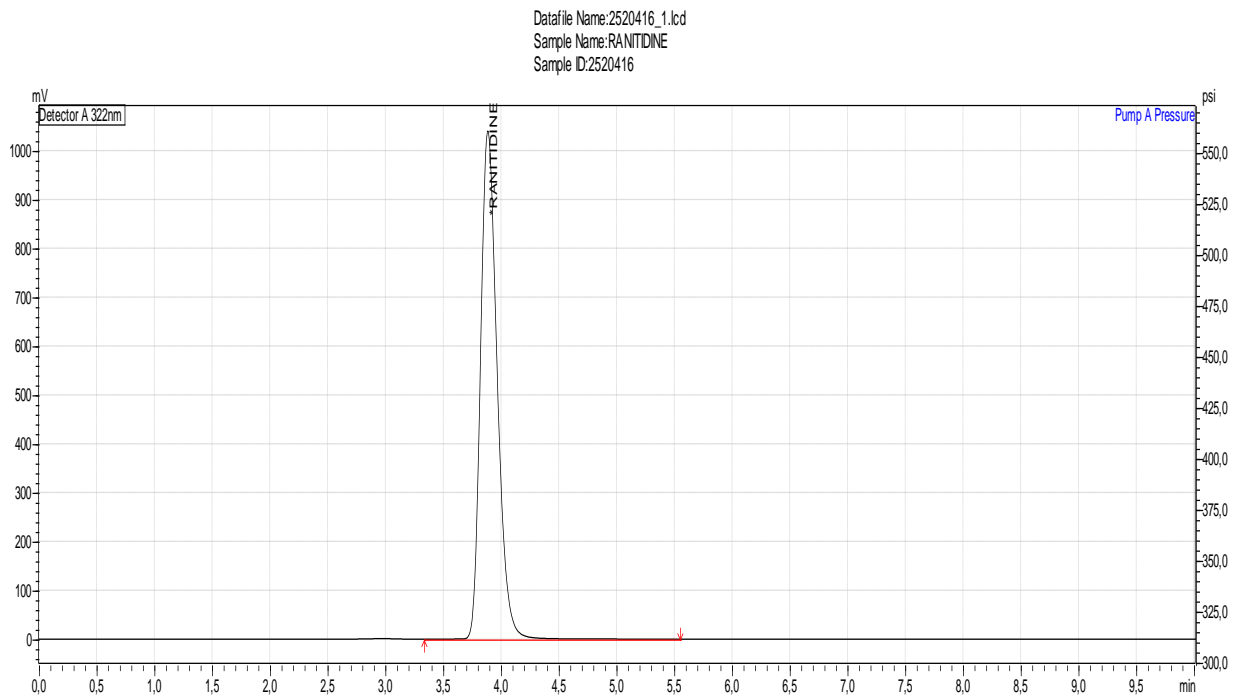
$$\% \text{Assay} = \frac{A_{\text{test}} \times W_{\text{t test}} \times W_{\text{r.std}}}{A_{\text{std}} \times W_{\text{r.test}} \times W_{\text{t.std}}} \times \%P = 100,1 \%$$

8.4.3 Δισκία των 300 mg/tab (Batch No.4600616)

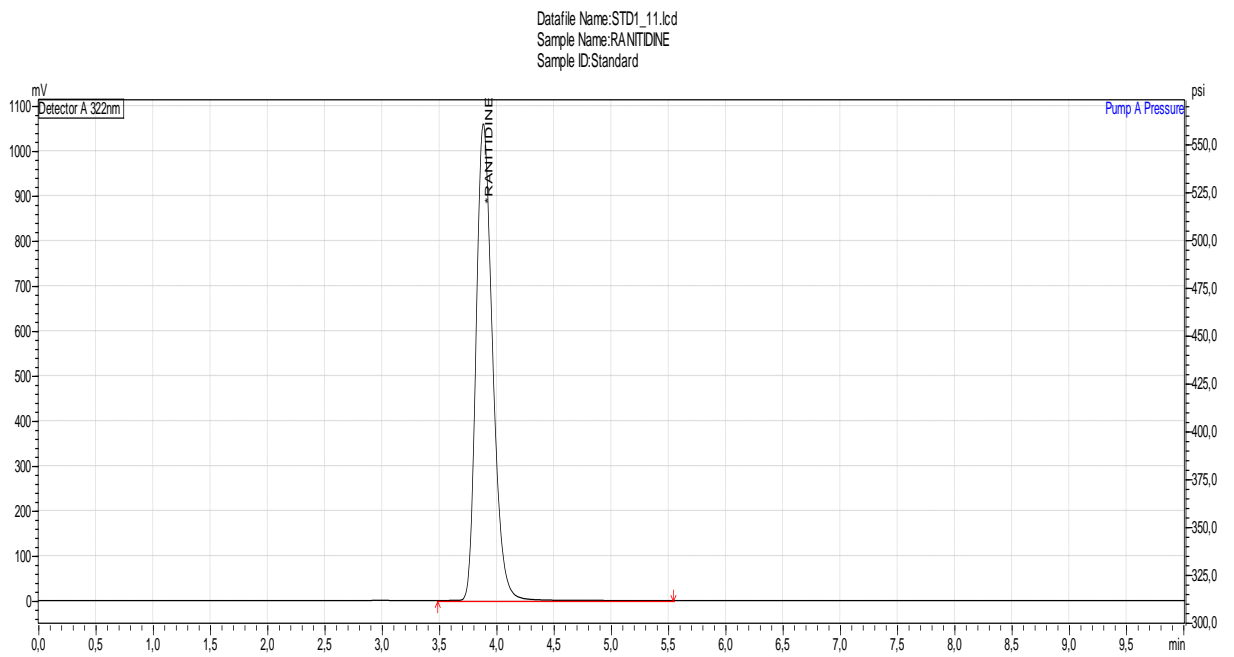
$$\% \text{Assay} = \frac{A_{\text{test}} \times W_{\text{t test}} \times W_{\text{r.std}}}{A_{\text{std}} \times W_{\text{r.test}} \times W_{\text{t.std}}} \times \%P = 100,1 \%$$

Τα αποτελέσματα είναι αποδεκτά καθώς είναι εντός των ορίων 95,0-105%

Στα σχήματα 8.1 και 8.2 δίνονται ενδεικτικά χρωματογραφήματα.



Σχήμα 8.1 Ενδεικτικό χρωματογράφημα περιεκτικότητας του δείγματος



Σχήμα 8.2 Ενδεικτικό χρωματογράφημα περιεκτικότητας του προτύπου

8.5 Διαλυτότητα (Dissolution)

$$DR = \frac{ATSD}{ARSD} \times \frac{CRSD}{CTSD} \times 100$$

8.5.1 Δισκία των 150 mg/tab

$$\% \text{Διαλυτότητα} = 100,3$$

8.5.2 Δισκία των 300 mg/tab (Batch No.4590616)

$$\% \text{Διαλυτότητα} = 98,8$$

8.5.3 Δισκία των 300 mg/tab (Batch No.4600616)

$$\% \text{Διαλυτότητα} = 98,7$$

Τα αποτελέσματα είναι αποδεκτά καθώς η επί τοις εκατό διαλυτότητα είναι μεγαλύτερη από 80%.

8.6 Ομοιομορφία περιεχομένου (Content uniformity)

8.6.1 Δισκία των 150 mg/tab

Η ομοιομορφία περιεχομένου μετρήθηκε 98,8 %

8.6.2 Δισκία των 300 mg/tab (Batch No.4590616)

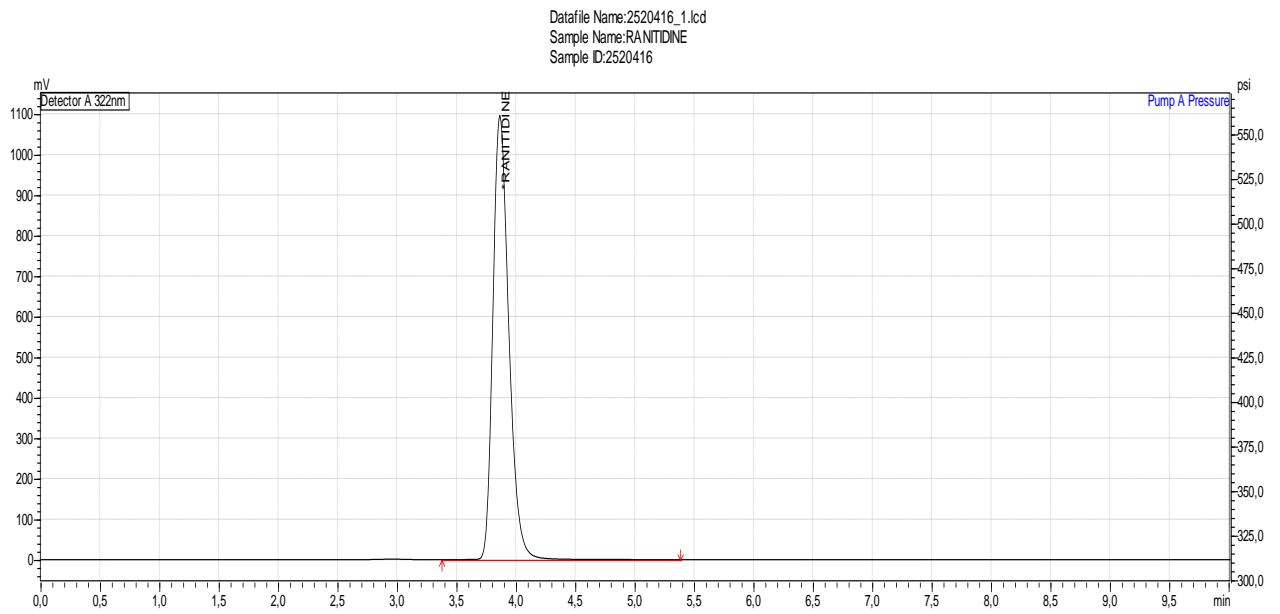
Η ομοιομορφία περιεχομένου μετρήθηκε 99,5 %

8.6.3 Δισκία των 300 mg/tab (Batch No.4600616)

Η ομοιομορφία περιεχομένου μετρήθηκε 98,5 %

Τα αποτελέσματα είναι αποδεκτά καθώς είναι εντός των ορίων 85,0-115,0%

Στο σχήμα 8.3 δίνεται ενδεικτικό χρωματογράφημα.



Σχήμα 8.3 Ενδεικτικό χρωματογράφημα ομοιομορφίας περιεχομένου του δείγματος

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- [1] Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO.) <http://www.who.int/en/>
- [2] Μ. Κουππάρης «Έλεγχος Ποιότητας Φαρμάκων» (σημειώσεις μαθήματος)
- [3] History of HPLC, (www.pharm.uky.edu)
- [4] Χ. Παύλος, Διδακτορική διατριβή, «Ανάπτυξη και Επικύρωση μεθόδου για τον προσδιορισμό βιταμινών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης μετά από εκχύλιση στερεάς φάσης – υγρού, εφαρμογή σε φαρμακευτικά σκευάσματα και βιολογικά υγρά». Α.Π.Θ., 2004.
- [5]. Ι. Παπαδογιάννης, Β. Σαμανίδου, *Ενόργανη Χημική Ανάλυση*, Θεσσαλονίκη, (2000).
- [6] Α. Στράτης, Α.Ν. Βουλγαρόπουλος, Ι.Α. Ζαχαριάδης, *Ποσοτική Χημική Ανάλυση*, Θεσσαλονίκη, 1999.
- [7] D.A. Skoog, F.J.Holler, T.A. Nieman, *Principles of instrumental Analysis*, 5th edition, 2002.
- [8] Ν. Θωμαΐδης, *Ενόργανη Ανάλυση II* (σημειώσεις Μαθήματος)
- [9] Π. Νικόλαος, Διδακτορική Διατριβή: «Προσδιορισμός ιχνών οργανικών ενώσεων με τη μέθοδο προσυγκέντρωσης» Ιωάννινα, 2006.
- [10] Ε. Αρχοντάκη, *Χημεία – Χρωματογραφικές Τεχνικές Ανάλυσης* (σημειώσεις μαθήματος)
- [11] Ζ.Δ. Τζουγανάκη, Διδακτορική διατριβή «Εφαρμογές χρωματογραφίας HPLC στον προσδιορισμό φαρμακευτικών ουσιών και συστατικών τροφίμων με εξατμιστικό ανιχνευτή σκέδασης ακτινοβολίας», Αθήνα, 2007.
- [12]<http://www.myoskeletiko.com/item/44-mixanismoι-drasis-antielkotikon-farmakon-aegeorgiadis.html> (Τελευταία επίσκεψη: Σεπτέμβριος 2016)

[13] <https://en.wikipedia.org/wiki/Ranitidine> (Τελευταία επίσκεψη: Σεπτέμβριος 2016)

[14] Ρανιτιδίνη, Γαληνός

<http://www.galinos.gr/web/drugs/main/substances/ranitidine#content>

(Τελευταία επίσκεψη: Σεπτέμβριος 2016)

[15] <http://www.uspbpep.com/ep50/Ranitidine%20hydrochloride.pdf> (Τελευταία επίσκεψη: Σεπτέμβριος 2016)

[16] European Pharmacopeia, Monography 04/2005:0946