



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

“ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ - ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ”

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Μελέτη Αντίστροφης Μηχανικής (Reverse Engineering Study) για τον προσδιορισμό των εκδόχων του πυρήνα του πρωτότυπου σκευάσματος της Πρασουγγέλης και επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων ποσοτικοποίησής τους

ΛΟΥΚΑΚΗΣ ΣΤΥΛΙΑΝΟΣ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2020

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Μελέτη Αντίστροφης Μηχανικής (Reverse Engineering Study) για τον προσδιορισμό των εκδόχων του πυρήνα του πρωτότυπου σκευάσματος της Πρασουγγέλης και επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων ποσοτικοποίησής τους

ΛΟΥΚΑΚΗΣ ΣΤΥΛΙΑΝΟΣ

Αριθμός Μητρώου: 170903

Επιβλέπων καθηγητής:

Ιωάννης Ντότσικας, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Ειρήνη Παντερή, Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ

Ευάγγελος Γκίκας, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ

Ιωάννης Ντότσικας, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ

“Somewhere, something incredible is waiting to be known.”

Benjamin Franklin

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα φάρμακα αποτελούν, σήμερα, το επίκεντρο των ερευνών πολλών σπουδαιών επιστημόνων και έχει αποδειχθεί η χρησιμότητά τους μέσα στους αιώνες, τόσο για τον θεραπευτικό όσο και για τον προληπτικό σκοπό για τον οποίο προορίζονται, με αποτέλεσμα να εντείνονται συνεχώς οι προσπάθειες ανάλυσής τους με την αρωγή της σύγχρονης φαρμακευτικής επιστήμης.

Αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας ειδίκευσης, με τίτλο *“Μελέτη Αντίστροφης Μηχανικής (Reverse Engineering Study) για τον προσδιορισμό των εκδόχων του πυρήνα του πρωτότυπου σκευάσματος της Πρασουγρέλης και επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων ποσοτικοποίησής τους”*, που πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών, αποτελεί η αποκωδικοποίηση της ποσοτικής σύστασης των εκδόχων που περιέχονται στον πυρήνα του συγκεκριμένου πρωτότυπου φαρμακευτικού σκευάσματος, με σκοπό την πιστότερη αντιγραφή του από τις φαρμακοβιομηχανίες παραγωγής γενόσημων φαρμάκων, ίδιας αποτελεσματικότητας αλλά μειωμένου κόστους.

Πιο συγκεκριμένα, τα έκδοχα της μαννιτόλης, της υπρομελλόζης, της μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης και του στεατικού μαγνησίου ποσοτικοποιήθηκαν στον πυρήνα του δισκίου, μετά από προηγούμενη αξιολόγηση της μεθοδολογίας που χρησιμοποιήθηκε, όσον αφορά την καταλληλότητα και εφαρμοσιμότητά της. Η περιεκτικότητα της κροσκαρμελλόζης, ωστόσο, υπολογίστηκε εκ διαφοράς των υπολοίπων εκδόχων.

Κατά την επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων, εξετάστηκαν χαρακτηριστικά ποιότητας, όπως η ειδικότητα, το όριο ποσοτικοποίησης, η γραμμικότητα, το εύρος γραμμικής περιοχής, η ακρίβεια και η πιστότητα για να αποδειχθεί ότι πράγματι, είναι κατάλληλες για τον σκοπό για τον οποίο προορίζονται (fitness for purpose).

Τέλος, πέραν των ποσοτικών πληροφοριών που εξήχθησαν από τη μελέτη αυτή, η ανάλυση και η σύγκριση των δειγμάτων, προερχόμενων από δύο διαφορετικούς τόπους παραγωγής, την Αυστραλία και την Ευρώπη, προσέδωσε μια πληθώρα ποιοτικών δεδομένων για την ολοκλήρωση της μελέτης.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Φαρμακευτική Ανάλυση

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Αντίστροφη Μηχανική, Πρασουγρέλη, έκδοχα, επικύρωση, φάρμακο, αντιθρομβωτικά

ABSTRACT

Medicines are, nowadays, the focus of many great scientists' research and their usefulness has been proven over the centuries, for both the therapeutic and the preventive purpose for which they are being developed. Therefore, their analysis efforts with the help of modern pharmaceutical science are continuously intensified.

The purpose of this diploma thesis, entitled as "Reverse Engineering Study for the determination of core' excipients of Prasugrel antithrombotic drug and validation of analytical methods for their quantitation", carried out as part of postgraduate program, is the decoding of quantitative composition of the excipients contained in the core of branded - original medicinal product, with the scope of faithfully copying it from generic drug industries, in order to achieve the same efficiency but lower cost.

More specifically, the excipients of mannitol, hypromellose, microcrystalline cellulose and magnesium stearate were quantified in the tablet's core, after previous evaluation of the methodology employed with regards to suitability / applicability. The content of croscarmellose was calculated, however, by difference from the other excipients.

The analytical methods employed for the determination of the aforementioned excipients were validated with respect to characteristics, such as specificity, limit of quantitation, linearity, range, accuracy and precision, in order to be proved that they are actually, fit for the purpose for which they are intended.

Finally, in addition to the quantitative information extracted from this study, the analysis and comparison of samples from two different production sites, Australia and Europe, provided a wealth of qualitative data for the completion of the study.

SUBJECT AREA: Pharmaceutical Analysis

KEYWORDS: Reverse Engineering, Prasugrel, excipients, validation, medicine,

antithrombotics

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία ειδίκευσης, πραγματοποιήθηκε στα Εργαστήρια Ανάλυσης της εταιρείας Qualimetrix S.A. στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών “Φαρμακευτική Ανάλυση - Έλεγχος Ποιότητας”, κατά την περίοδο Σεπτεμβρίου 2018 - Αυγούστου 2019.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Ντόσικα Ιωάννη, Επίκουρο Καθηγητή στον τομέα της Φαρμακευτικής Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την ανάθεση της μελέτης και για την καθοδήγησή του καθ'όλη τη διάρκεια αυτής. Με την ξεχωριστή προσωπικότητα που διαθέτει και το ήθος που τον χαρακτηρίζει, συνέβαλε καθοριστικά στην ολοκλήρωση όχι μόνο της παρούσας διπλωματικής εργασίας, αλλά και των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Θα ήθελα, ακόμη, να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, κ. Παντερή και κ. Γκίκα για τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσαν και τις εύστοχες παρατηρήσεις τους, κατά την αξιολόγηση της συγκεκριμένης εργασίας.

Ιδιαίτερα σημαντική ήταν και η συμβολή τόσο της Δρ. Άννας Μπλέτσου, όσο και του Νικόλαου Κρητικού, τους οποίους ευχαριστώ ειλικρινά για το ατέρμονο της επιστημονικής γνώσης που μου προσέφεραν και συνεχίζουν να μου προσφέρουν απλόχερα, μέχρι σήμερα. Δεν μπορώ να μην αναφερθώ και στη Βασιλική Γκόγκου, την οποία ευχαριστώ για την όμορφη συνεργασία μας και την βοήθειά της στη διεξαγωγή και ολοκλήρωση των πειραμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και το φιλικό μου περιβάλλον για την στήριξη που μου παρείχαν καθ'όλη τη διάρκεια ολοκλήρωσης των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο: ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ (REVERSE ENGINEERING STUDIES)2

1.1 Εισαγωγή	2
1.1.1 Ταξινόμηση των φαρμάκων	2
1.2 Μελέτες αντίστροφης μηχανικής	3
1.2.1 Εισαγωγικά στοιχεία και οφέλη	3
1.2.2 Ρόλος στην ανάπτυξη γενόσημων φαρμάκων	4
1.3 Άλλες εφαρμογές	8

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο: ΠΡΑΣΟΥΓΡΕΛΗ, ΕΝΑ ΕΥΡΕΩΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΟ ΑΝΤΙΘΡΟΜΒΩΤΙΚΟ ΦΑΡΜΑΚΟ10

2.1 Εισαγωγή	10
2.2 Αντιθρομβωτικά φάρμακα	11
2.3 Πρασουγρέλη, ή αλλιώς Effient	13
2.3.1 Εισαγωγή	13
2.3.2 Χημικά και Φυσικά χαρακτηριστικά	14
2.3.3 Μηχανισμός δράσης	15
2.3.4 Δοσολογία και τρόπος χορήγησης	16
2.3.5 Ειδικές προειδοποιήσεις και προφυλάξεις	17
2.3.6 Υπερδοσολογία	18
2.3.7 Κύηση και θηλασμός	18
2.3.8 Αλληλεπιδράσεις με άλλα φαρμακευτικά προϊόντα	18

2.3.9	Πιθανές ανεπιθύμητες παρανέργειες	19
2.4	Έκδοχα του φαρμάκου	21
2.5	Αναλυτικές τεχνικές προσδιορισμού των εκδόχων	25
2.5.1	Τεχνικές διαχωρισμού	25
2.5.2	Τεχνικές ταυτοποίησης	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)		27
3.1	Εισαγωγή - Ιστορική Αναδρομή	27
3.2	Αρχή της υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης	27
3.3	Οργανολογία χρωματογραφίας	29
3.4	Βελτιστοποίηση διαχωρισμών	35
3.5	Είδη υγροχρωματογραφίας	36
3.5.1	Χρωματογραφία Προσρόφησης	37
3.5.2	Χρωματογραφία Κατανομής	37
3.5.3	Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής	37
3.5.4	Χρωματογραφία Ζεύγους Ιόντων	38
3.5.5	Χειρόμορφη Χρωματογραφία	38
3.5.6	Χρωματογραφία υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο: ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ ΕΠΑΓΩΓΙΚΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ (ICP-MS)		39
4.1	Εισαγωγή	39
4.2	Αρχή λειτουργίας	39
4.3	Οργανολογία	40
4.4	Εφαρμογές της τεχνικής	47

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο: ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ	49
5.1 Εισαγωγή	49
5.2 Χαρακτηριστικά ορθής επικύρωσης	49
5.2.1 Ειδικότητα (Specificity)	50
5.2.2 Εκλεκτικότητα (Selectivity)	50
5.2.3 Όριο ανίχνευσης (Limit of Detection - LOD)	50
5.2.4 Όριο ποσοτικοποίησης (Limit of Quantitation - LOQ)	50
5.2.5 Γραμμικότητα (Linearity)	50
5.2.6 Εύρος γραμμικής περιοχής (Range)	51
5.2.7 Ακρίβεια (Accuracy)	51
5.2.8 Πιστότητα (Precision)	51
5.2.9 Σταθερότητα (Stability)	52
5.2.10 Ανθεκτικότητα (Ruggedness)	52
5.3 Μέθοδοι ποσοτικοποίησης	52
5.3.1 Μέθοδος ενός εξωτερικού προτύπου	52
5.3.2 Μέθοδος πολλαπλών εξωτερικών προτύπων / καμπύλης αναφοράς	53
5.3.3 Μέθοδος παρεμβολής	53
5.3.4 Μέθοδος προσθήκης γνωστής ποσότητας	54
5.3.5 Μέθοδος πολλαπλών γνωστών προσθηκών	54
5.3.6 Μέθοδος μείωσης γνωστής ποσότητας	55
5.3.7 Μέθοδος εσωτερικού προτύπου	55
5.3.8 Μέθοδος κανονικοποίησης	55

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο: ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΕΚΔΟΧΩΝ ΤΗΣ ΠΡΑΣΟΥΓΡΕΛΗΣ	57
--	----

6.1 Εισαγωγή - Σκοπός	57
6.2 Οργανολογία, αντιδραστήρια και πειραματική πορεία	57
6.2.1 Προσδιορισμός της Μαννιτόλης	57
6.2.1.1 Επικύρωση της μεθόδου	62
6.2.2 Προσδιορισμός της Υπρομελλόζης	65
6.2.2.1 Επικύρωση της μεθόδου	69
6.2.3 Προσδιορισμός της Μικροκρυσταλλικής Κυτταρίνης	73
6.2.3.1 Επικύρωση της μεθόδου	76
6.2.4 Προσδιορισμός του Στεατικού Μαγνησίου	80
6.2.4.1 Επικύρωση της μεθόδου	84
6.2.5 Προσδιορισμός της Κροσκαρμελλόζης	87

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ
ΜΕΘΟΔΩΝ**

7.1 Αποτελέσματα επικύρωσης της μεθόδου προσδιορισμού της Μαννιτόλης	88
7.2 Αποτελέσματα επικύρωσης της μεθόδου προσδιορισμού της Υπρομελλόζης ...	94
7.3 Αποτελέσματα επικύρωσης της μεθόδου προσδιορισμού της Μικροκρυσταλλικής Κυτταρίνης	101
7.4 Αποτελέσματα επικύρωσης της μεθόδου προσδιορισμού του Στεατικού Μαγνησίου	105
7.5 Σύνοψη των αποτελεσμάτων επικύρωσης - Συμπεράσματα	110

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

8.1 Ποσοτικά αποτελέσματα	113
8.2 Ποιοτικά αποτελέσματα	115
8.3 Συμπεράσματα	121

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	122
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ - ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ - ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	125
ΑΝΑΦΟΡΕΣ - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	127

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: Όργανο μέτρησης περιθλώμενων ακτίνων Χ	6
Εικόνα 2.1: Τρισδιάστατη αναπαράσταση των αιμοπεταλίων ή θρομβοκυττάρων ..	11
Εικόνα 2.2: Ετικέτα φαρμακευτικού σκευάσματος Efiend™, όπως διατίθεται στην αγορά	13
Εικόνα 2.3: Συντακτικός τύπος της Πρασουγρέλης	15
Εικόνα 2.4: Αντίδραση ενζυματικού μετασχηματισμού του προφαρμάκου της Πρασουγρέλης στον ενεργό μεταβολίτη του	16
Εικόνα 2.5: Μηχανισμός δράσης της Πρασουγρέλης	16
Εικόνα 2.6: Επιθυμητές ιδιότητες των εκδόχων ενός φαρμακευτικού προϊόντος	21
Εικόνα 2.7: Δομή της Μικροκρυσταλλικής Κυτταρίνης	23
Εικόνα 2.8: Δομή της Μαννιτόλης	23
Εικόνα 2.9: Δομή της Υπρομελλόζης, όπου R: CH ₃ ή CH ₃ CH(OH)CH ₂	24
Εικόνα 2.10: Δομή του Στεατικού Μαγνησίου	24
Εικόνα 2.11: Δομή της Κροσκαρμελλόζης	25
Εικόνα 3.1: Οργανολογία ενός χρωματογραφικού συστήματος HPLC	29
Εικόνα 3.2: Πολικότητα των συνηθέστερα, χρησιμοποιούμενων διαλυτών	30
Εικόνα 3.3: Αναλυτική στήλη χρωματογραφικών διαχωρισμών	32
Εικόνα 4.1: Αρχή λειτουργίας της Φασματομετρίας μαζών επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος	40
Εικόνα 4.2: Αρχή λειτουργίας του Πνευματικού Εκνεφωτή	41
Εικόνα 4.3: Πνευματικός Εκνεφωτής Διασταυρούμενης Ροής	41
Εικόνα 4.4: Πλάσμα οργάνου ICP-MS	42

Εικόνα 4.5: Ενδεικτικές θερμοκρασίες πλάσματος	43
Εικόνα 4.6: Περιοχή διασύνδεσης οργάνου ICP-MS	44
Εικόνα 4.7: Κώνος δειγματοληψίας (Sampler Cone) και αποκορυφωτής (Skimmer Cone)	44
Εικόνα 4.8: Τετραπολικός αναλυτής μαζών	46
Εικόνα 4.9: Φωτοπολλαπλασιαστής	47
Εικόνα 6.1: Αντίδραση παραγωγοποίησης της Μαννιτόλης με βενζόυλο χλωρίδιο	58
Εικόνα 6.2: Χρωματογραφικό σύστημα HPLC σειράς VP της εταιρείας Shimadzu	58
Εικόνα 6.3: Αρχή λειτουργίας του ανιχνευτή φορτισμένων αερολυμάτων (CAD)	66
Εικόνα 6.4: Αρχή λειτουργίας του φασματοφωτόμετρου	73
Εικόνα 6.5: Φασματόμετρο μαζών ICP τύπου NexION 350X, της εταιρείας Perkin Elmer	81
Εικόνα 7.1: Ενδεικτικό χρωματογράφημα του προτύπου διαλύματος της Μαννιτόλης	89
Εικόνα 7.2: Ενδεικτικό χρωματογράφημα του λευκού διαλύματος (Μαννιτόλη)	89
Εικόνα 7.3: Ενδεικτικό χρωματογράφημα του διαλύματος ειδικότητας (Specificity / Placebo) της Μαννιτόλης	89
Εικόνα 7.4: Ενδεικτικό χρωματογράφημα των προτύπων διαλυμάτων της Μαννιτόλης	90
Εικόνα 7.5: Ενδεικτικό χρωματογράφημα των προτύπων διαλυμάτων της Μαννιτόλης (Μεγέθυνση)	90
Εικόνα 7.6: Καμπύλη βαθμονόμησης της Μαννιτόλης	91
Εικόνα 7.7: Ενδεικτικό χρωματογράφημα του προτύπου διαλύματος Α της Μαννιτόλης	92
Εικόνα 7.8: Ενδεικτικό χρωματογράφημα του δείγματος και του Spiked διαλύματος της Μαννιτόλης	93
Εικόνα 7.9: Ενδεικτικό χρωματογράφημα του προτύπου διαλύματος της Υπρομελλόζης	95
Εικόνα 7.10: Ενδεικτικό χρωματογράφημα του λευκού διαλύματος (Υπρομελλόζη)	96

Εικόνα 7.11: Ενδεικτικό χρωματογράφημα του διαλύματος ειδικότητας (Specificity / Placebo) της Υπρομελλόζης	96
Εικόνα 7.12: Ενδεικτικό χρωματογράφημα των προτύπων διαλυμάτων της Υπρομελλόζης	97
Εικόνα 7.13: Καμπύλη βαθμονόμησης της Υπρομελλόζης	98
Εικόνα 7.14: Ενδεικτικό χρωματογράφημα του προτύπου διαλύματος A της Υπρομελλόζης	99
Εικόνα 7.15: Ενδεικτικό χρωματογράφημα του δείγματος και του Spiked διαλύματος της Υπρομελλόζης	99
Εικόνα 7.16: Καμπύλη βαθμονόμησης της Μικροκρυσταλλικής Κυτταρίνης	103
Εικόνα 7.17: Καμπύλη βαθμονόμησης του Στεατικού Μαγνησίου	106
Εικόνα 8.1 : Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων του Prasugrel με XRD (AUS: Lot. C804457 - Μπλε γραμμή, Lot. C745139 - Κόκκινη γραμμή, EU: Lot. C910328 - Μαύρη γραμμή, Lot. C889119 - Μωβ γραμμή	115
Εικόνα 8.2 : Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων του Prasugrel με IR (AUS: Lot. C804457 - Μπλε γραμμή, Lot. C745139 - Κόκκινη γραμμή)	120
Εικόνα 8.3 : Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων του Prasugrel με IR (EU: Lot. C910328 - Μπλε γραμμή, Lot. C889119 - Κόκκινη γραμμή)	120
Εικόνα 8.4 : Αποτελέσματα συγκριτικής ανάλυσης δειγμάτων του Prasugrel με IR (EU: Lot. C910328 - Μπλε γραμμή και AUS: Lot. C804457 - Κόκκινη γραμμή)	120

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ / ΠΙΝΑΚΩΝ

Σχήμα 1.1: Δέντρο απόφασης μελετών αντίστροφης μηχανικής (Reverse Engineering Studies)	7
Σχήμα 1.2: Στάδια ανάπτυξης ενός γενόσημου φαρμακευτικού προϊόντος	8
Πίνακας 5.1: Χαρακτηριστικά ορθής επικύρωσης	49
Πίνακας 6.1: Δείγματα προς ανάλυση, προερχόμενα από την Αυστραλία και την Ευρώπη	57
Πίνακας 6.2: Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον έλεγχο της ειδικότητας (Μαννιτόλη)	62
Πίνακας 6.3: Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον έλεγχο της ειδικότητας (Υπρομελλόζη)	69
Πίνακας 6.4: Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον έλεγχο της ειδικότητας (Μικροκρυσταλλική Κυτταρίνη)	77
Πίνακας 7.1: Αποτελέσματα ελέγχου καταλληλότητας του συστήματος (Μαννιτόλη)	88
Πίνακας 7.2: Αποτελέσματα ελέγχου γραμμικότητας (Μαννιτόλη)	90
Πίνακας 7.3: Αποτελέσματα ελέγχου ορίου ποσοτικοποίησης (Μαννιτόλη)	92
Πίνακας 7.4: Αποτελέσματα ελέγχου ακρίβειας (Μαννιτόλη)	93
Πίνακας 7.5: Αποτελέσματα ελέγχου πιστότητας (επαναληψιμότητας / ενδιάμεσης πιστότητας, Μαννιτόλη)	94
Πίνακας 7.6: Αποτελέσματα ελέγχου καταλληλότητας του συστήματος (Υπρομελλόζη)	95
Πίνακας 7.7: Αποτελέσματα ελέγχου γραμμικότητας (Υπρομελλόζη)	97
Πίνακας 7.8: Αποτελέσματα ελέγχου ορίου ποσοτικοποίησης (Υπρομελλόζη)	98
Πίνακας 7.9: Αποτελέσματα ελέγχου ακρίβειας (Υπρομελλόζη)	100
Πίνακας 7.10: Αποτελέσματα ελέγχου πιστότητας (επαναληψιμότητας / ενδιάμεσης πιστότητας, Υπρομελλόζη)	100

Πίνακας 7.11: Αποτελέσματα ελέγχου καταλληλότητας του συστήματος (MCC)	101
Πίνακας 7.12: Αποτελέσματα ελέγχου γραμμικότητας (MCC)	102
Πίνακας 7.13: Αποτελέσματα ελέγχου ορίου ποσοτικοποίησης (MCC)	103
Πίνακας 7.14: Αποτελέσματα ελέγχου ακρίβειας (MCC)	104
Πίνακας 7.15: Αποτελέσματα ελέγχου πιστότητας (επαναληψιμότητας / ενδιάμεσης πιστότητας, MCC)	105
Πίνακας 7.16: Αποτελέσματα ελέγχου καταλληλότητας του συστήματος (Στεατικό Μαγνήσιο)	106
Πίνακας 7.17: Αποτελέσματα ελέγχου ειδικότητας (Στεατικό Μαγνήσιο)	107
Πίνακας 7.18: Αποτελέσματα ελέγχου ορίου ποσοτικοποίησης (Στεατικό Μαγνήσιο)	108
Πίνακας 7.19: Αποτελέσματα ελέγχου ακρίβειας (Στεατικό Μαγνήσιο)	109
Πίνακας 7.20: Αποτελέσματα ελέγχου πιστότητας (επαναληψιμότητας / ενδιάμεσης πιστότητας, Στεατικό Μαγνήσιο)	109
Πίνακας 8.1: Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού των εκδόχων δειγμάτων Effient™ (AUS)	113
Πίνακας 8.2: Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού των εκδόχων δειγμάτων Effient™ (EU)	113
Πίνακας 8.3: Δεδομένα στατιστικής αξιολόγησης	114
Πίνακας 8.4: Εμφάνιση όλων των κορυφών για τα αντίστοιχα προφίλ XRD που αποκτήθηκαν για το Lot. C804457 (αριστερά) και το Lot. C745139 (δεξιά)	115
Πίνακας 8.5: Εμφάνιση όλων των κορυφών για τα αντίστοιχα προφίλ XRD που αποκτήθηκαν για το Lot. C910328 (αριστερά) και το Lot. C889119 (δεξιά)	117
Πίνακας 8.6: Αποτελέσματα ομοιότητας / συσχέτισης δειγμάτων Prasugrel	121

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο: ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ (REVERSE ENGINEERING STUDIES)

1.1 Εισαγωγή

Τα **φάρμακα** αποτελούν, σήμερα, το επίκεντρο των ερευνών πολλών σπουδαιών επιστημόνων και αυτό, διότι χαρακτηρίζονται ως αναγκαία κοινωνικά αγαθά τα οποία μελετώνται, αναπτύσσονται και αναλύονται ώστε να προστατεύσουν τη ζωή και την υγεία των ανθρώπων, καθώς και για να οδηγήσουν σε μια όσο το δυνατόν μεγαλύτερη και ποιοτικότερη διάρκεια ζωής. Κατέχουν εξέχουσα θέση στην ζωή και την υγεία του πληθυσμού και έχει αποδειχθεί η χρησιμότητά τους μέσα στους αιώνες, τόσο για τον θεραπευτικό όσο και για τον προληπτικό σκοπό για τον οποίο προορίζονται. Η συμβολή των φαρμάκων, λοιπόν, στη Δημόσια Υγεία και την κοινωνική ευημερία είναι αδιαμφισβήτητη, με αποτέλεσμα να εντείνονται συνεχώς οι προσπάθειες ανάλυσής τους με την αρωγή της σύγχρονης φαρμακευτικής επιστήμης^[1].

Κάθε φαρμακευτικό προϊόν αποτελείται από δύο βασικά συστατικά, α) το ενεργό φαρμακευτικό συστατικό, δηλαδή την **δραστική ουσία** (Active Pharmaceutical Ingredient - API) και β) τα **έκδοχα** (συνδετικά, χρώματα, γεύσεις, αραιωτικά κλπ.), που ουσιαστικά συναποτελούν τα περιεχόμενα του φαρμάκου. Το ενεργό συστατικό σχετίζεται με τη φαρμακολογική δράση του φαρμάκου, ενώ τα έκδοχα, παρόλο που θεωρούνται φαρμακολογικά αδρανή συστατικά, μπορεί να επηρεάσουν την ίδια τη δράση του φαρμάκου, τη φαρμακοκινητική του και να το κάνουν περισσότερο αναγνωρίσιμο, συμβάλλοντας στη βελτίωση της γεύσης και την ενίσχυση του χρώματος. Ενδεικτικά, αναφέρεται ότι σε ένα μέσο χάπι που λαμβάνεται από το στόμα, μόνο το 29 % του βάρους του αφορά την δραστική θεραπευτική ουσία, ενώ το υπόλοιπο 71 % αφορά τα έκδοχα. Κατά μέσο όρο, ένα φάρμακο περιέχει τουλάχιστον 8 διαφορετικά έκδοχα, ενώ ο αριθμός αυτός μπορεί να φτάσει έως και τα 35^[2,3].

Από τα παραπάνω, γίνεται αντιληπτή η αναγκαιότητα της εξασφάλισης υψηλής ποιότητας φαρμάκων που διατίθενται στους ασθενείς, μέσω εκτεταμένων αναλύσεων. Η παραγωγή, εισαγωγή και κυκλοφορία τους, λοιπόν, διέπονται από αυστηρούς κανονισμούς, οι οποίοι σχεδιάζονται προσεκτικά, εφαρμόζονται και αναμορφώνονται όταν κρίνεται απαραίτητο.

1.1.1 Ταξινόμηση των φαρμάκων

Η ταξινόμηση των διαφόρων φαρμακευτικών προϊόντων, περιλαμβάνει τις ακόλουθες υποκατηγορίες:

α) χημική ταξινόμηση, όσον αφορά τη χημική ομάδα στην οποία ανήκουν, όπως τα

αλκαλοειδή.

β) φαρμακολογική ταξινόμηση, όσον αφορά τη φαρμακολογική τους δράση, όπως τα αναλγητικά, τα σπασμολυτικά, τα αντιμικροβιακά και τα αναισθητικά φάρμακα.

γ) θεραπευτική ταξινόμηση, όσον αφορά τη θεραπευτική τους δράση, όπως τα αντικαταθλιπτικά, τα ανθελονοσιακά και τα αγχολυτικά φάρμακα και

δ) σύνθετη ταξινόμηση, όσον αφορά την πάθηση του λειτουργικού συστήματος ή οργάνου για το οποίο χορηγούνται και του επιδιωκόμενου σκοπού, όπως τα αντισηπτικά, τα καθαρτικά και τα βλεννολυτικά^[2,4].

Με βάση την προέλευσή τους, διαχωρίζονται σε **πρωτότυπα (branded)**, ευρεσιτεχνίες με κατοχυρωμένα δικαιώματα προστασίας) και **γενόσημα (generics)**, τα οποία έχουν την ίδια χημική σύσταση με τα πρωτότυπα, αλλά παράγονται με διαφορετική μέθοδο, συνήθως αφού περάσει ο χρόνος κατοχύρωσης της πατέντας, καθώς και με ειδικές διαδικασίες. Εκτεταμένες έρευνες και μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί έως σήμερα, προκειμένου να αποσαφηνιστεί και να περιγραφεί με ακρίβεια η διαφορά ανάμεσα στα πρωτότυπα και τα γενόσημα φάρμακα.

Σύμφωνα, λοιπόν, με τον ορισμό που διατίθεται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration - FDA), ένα γενόσημο φάρμακο είναι συγκρίσιμο με το πρωτότυπο, όσον αφορά την δοσολογία, την περιεκτικότητα, την οδό χορήγησης, τα χαρακτηριστικά ποιότητας και την προβλεπόμενη χρήση. Οι αυστηροί κανονισμοί και οι ρυθμιστικές αρχές που διέπουν την υποβολή αιτήσεων γενόσημων φαρμάκων, είναι ιδιαίτερα περίπλοκες, με αποτέλεσμα να εντείνονται συνεχώς οι προσπάθειες των φαρμακοβιομηχανιών, για μία όσο το δυνατόν πιστότερη αντιγραφή των πρωτότυπων φαρμάκων. Η πιστότερη αυτή αντιγραφή επιτυγχάνεται μέσω των διαρκώς αναπτυσσόμενων μελετών αντίστροφης μηχανικής (**Deformation/Reverse Engineering Studies**)^[4,5].

1.2 Μελέτες αντίστροφης μηχανικής

1.2.1 Εισαγωγικά στοιχεία και οφέλη

Σύμφωνα με εκτεταμένες μελέτες και έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, έχει αποδειχθεί ότι οι Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, η Ινδία, η Κίνα και το Ισραήλ αποτελούν το επίκεντρο μιας ισχυρά εδραιωμένης φαρμακευτικής βιομηχανίας παραγωγής γενόσημων φαρμάκων, ενώ τα ταχύτερα αναπτυσσόμενα φαρμακευτικά κέντρα παραγωγής εντοπίζονται στη Νότια Κορέα, τη Βραζιλία, τη Μέση Ανατολή, τη Ρωσία και τη Νοτιοανατολική Ασία. Χώρες όπως η Αυστραλία, η Γαλλία, η **Ελλάδα**, η Ιαπωνία και η Ελβετία χαρακτηρίζονται από ποσοστό χρήσης γενόσημων φαρμάκων που αγγίζει το 30 %, σε αντίθεση με το ποσοστό των ΗΠΑ που φτάνει έως το 80 %. Παρατηρείται λοιπόν, μια διαρκής αύξηση των γενόσημων φαρμάκων που κυκλοφορούν στη παγκόσμια αγορά (πάνω από 850 αναγνωρισμένα φαρμακευτικά σκευάσματα, το 2018), γεγονός που οφείλεται κυρίως στις μελέτες αντίστροφης μηχανικής (**Reverse Engineering Studies**) και την πληθώρα των πλεονεκτημάτων που προσφέρουν^[6,7].

Οι μελέτες αυτές σχετίζονται με τη διαδικασία αποκωδικοποίησης και καθορισμού της σύστασης ενός πρωτότυπου και καινοτόμου φαρμακευτικού προϊόντος, με σκοπό να αναπτυχθεί ένα γενόσημο - παρόμοιο προϊόν. Ένα φαρμακευτικό προϊόν είναι παρόμοιο με το πρωτότυπο φάρμακο, όταν ικανοποιούνται τα κριτήρια της ίδιας ποιοτικής και ποσοτικής σύστασης, όσον αφορά τα δραστικά συστατικά, της ίδιας φαρμακοτεχνικής μορφής, της ίδιας βιοϊσοδυναμίας και της ίδιας αποτελεσματικότητας και ασφάλειας^[8]. Αναφέρεται λοιπόν, σε ένα σύνολο αναλυτικών διαδικασιών που χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση των μεμονωμένων συστατικών - εκδόχων που περιέχονται σε ένα φαρμακευτικό προϊόν, σύμφωνα με τις αρχές της αναλυτικής χημείας. Τα έκδοχα, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, είναι φαρμακολογικά αδρανή, ωστόσο μπορούν να επηρεάσουν ποικίλα χαρακτηριστικά του προϊόντος, όπως η διαλυτότητα και η βιοδιαθεσιμότητά του, με αποτέλεσμα ο ακριβής και αξιόπιστος προσδιορισμός τους να αποτελεί θεμέλιο λίθο για την ανάπτυξη των γενόσημων φαρμάκων.

Τα κυριότερα οφέλη που σχετίζονται με τις μελέτες αυτές είναι η αυξημένη γνώση που προσφέρουν, μέσω της κατανόησης του μηχανισμού δράσης και της διαδικασίας παραγωγής του πρωτότυπου φαρμακευτικού προϊόντος, το αυξημένο κίνητρο καινοτομίας για την παραγωγή γενόσημων φαρμάκων μειωμένου κόστους, αλλά ίδιας αποτελεσματικότητας και τέλος, η ενίσχυση του υγιούς ανταγωνισμού μεταξύ των μεγάλων φαρμακοβιομηχανιών^[9,10].

1.2.2 Ρόλος στην ανάπτυξη γενόσημων φαρμάκων^[11]

Οι περισσότερες φαρμακοβιομηχανίες παραγωγής γενόσημων φαρμάκων, για την διατήρηση της αύξησης των εσόδων τους σε μία αγορά στην οποία οι τιμές των προϊόντων διαρκώς μειώνονται, οφείλουν να εξασφαλίζουν μια συνεχή ροή νέων προϊόντων, λαμβάνοντας υπόψη την ποιότητα και την ταχύτητα, που αποτελούν τα βασικότερα κριτήρια της σύγχρονης αγοράς. Ως εκ τούτου, πρέπει να είναι εξειδικευμένες στην ανάπτυξη προϊόντων και διαδικασιών και στην επίτευξη της βιοϊσοδυναμίας με τα πρωτότυπα φαρμακευτικά σκευάσματα^[12].

Τα περισσότερα φαρμακευτικά σκευάσματα που κυκλοφορούν σήμερα στην αγορά, είναι μορφές δοσολογίας που χορηγούνται από το στόμα και περιέχουν διάφορα έκδοχα, καθένα από τα οποία έχει μια συγκεκριμένη λειτουργία^[13]. Για παράδειγμα, υπάρχουν λειτουργικά έκδοχα, όπως σταθεροποιητές και τροποποιητές διαλυτοποίησης, που συμβάλλουν στη διάλυση και τη βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου, και άλλα, που χρησιμοποιούνται απλώς ως υλικά επίστρωσης^[14]. Ο ποσοτικός προσδιορισμός τους, ο χαρακτηρισμός της δραστικής φαρμακευτικής ουσίας (API) και η κατανόηση της διαδικασίας παρασκευής του σκευάσματος αποτελούν τη βάση των μελετών αντίστροφης μηχανικής.

Παρόλο που ορισμένες ποιοτικές πληροφορίες σχετικά με τη δραστική ουσία και τα έκδοχα του πρωτότυπου φαρμακευτικού προϊόντος, μπορούν να βρεθούν σε κοινές

πηγές, όπως τα ενημερωτικά φυλλάδια χρήσης που υποχρεωτικά συνοδεύουν τα φάρμακα, εντούτοις σύμφωνα με το αμερικανικό δίκαιο, δεν απαιτείται να αποκαλυφθούν ποσοτικές πληροφορίες. Οι μελέτες αντίστροφης μηχανικής, λοιπόν, αποτελούν μια επιστημονικά άριστη και οικονομικά αποδοτική στρατηγική για την επιτάχυνση της ανάπτυξης των γενόσημων προϊόντων και παρόλο που χρησιμοποιούνται ευρέως περίπου για 1-2 δεκαετίες, το θέμα καλύπτεται ελάχιστα στη δημοσιευμένη βιβλιογραφία. Τα κυριότερα στοιχεία που απαρτίζουν τις μελέτες αυτές, συνοψίζονται ως εξής:

Αποκωδικοποίηση της ποσοτικής σύστασης

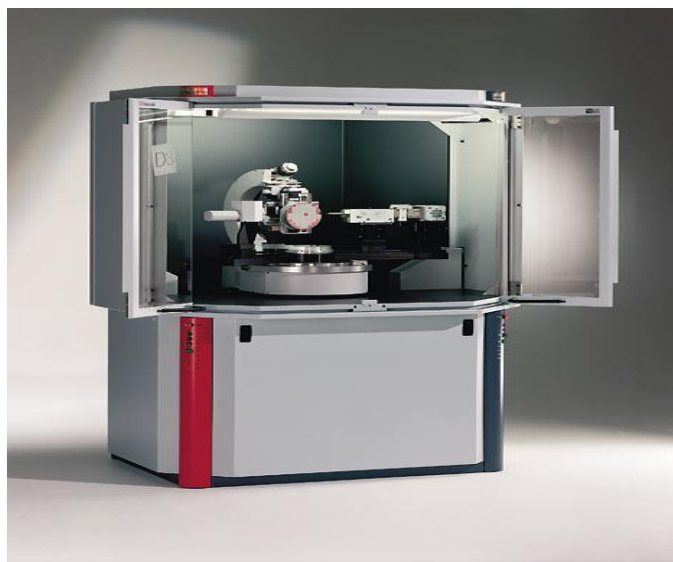
Η αποκωδικοποίηση της ποσοτικής σύστασης ενός πρωτότυπου φαρμακευτικού σκευάσματος (Reference Listed Drug - RLD) είναι μια εξαιρετικά χρονοβόρα διαδικασία που ξεκινά με τη συλλογή πληροφοριών σχετικά με την ποιοτική σύνθεση και τα αναμενόμενα επίπεδα συγκεντρώσεων των εκδόχων, μέσω βιβλιογραφικών πηγών. Οι παράγοντες ρύθμισης του pH, οι σταθεροποιητές, οι αντιοξειδωτικές ουσίες, οι τροποποιητές διαλυτοποίησης αλλά και οι επιφανειοδραστικές ουσίες αποτελούν τα συνηθέστερα έκδοχα για μελέτες αντίστροφης μηχανικής.

Το επόμενο βήμα είναι ο διαχωρισμός των εκδόχων και η επιλογή της καταλληλότερης αναλυτικής τεχνικής για την ακριβή ποσοτικοποίησή τους. Τα έκδοχα χαμηλού μοριακού βάρους προσδιορίζονται αποτελεσματικά με τη χρήση αναλυτικών τεχνικών, όπως η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) και εργαλεία ανίχνευσης όπως το υπεριώδες φως (Ultraviolet - UV) και ο δείκτης διάθλασης (Refractive Index - RI). Τα έκδοχα υψηλής πτητικότητας ποσοτικοποιούνται κυρίως με τεχνικές όπως η αεριοχρωματογραφία, ενώ τα έκδοχα υψηλού μοριακού βάρους, μπορούν να ποσοτικοποιηθούν αποτελεσματικά χρησιμοποιώντας χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού. Έπειτα από την επιλογή της αναλυτικής τεχνικής, ακολουθεί η ανάπτυξη της αναλυτικής μεθοδολογίας και η βελτιστοποίηση των αναλυτικών παραμέτρων / συνθηκών, όπως η επιλογή της στήλης, της κινητής ή στατικής φάσης, του προγράμματος ισοκρατικής ή βαθμιδωτής έκλουσης για την εξάλειψη φαινομένων επίδρασης του μητρικού υλικού και την επίτευξη αξιόπιστης ποσοτικοποίησης. Πραγματοποιούνται τέλος, αναλύσεις δειγμάτων γενόσημων φαρμάκων για την επιβεβαίωση των αρχικών συγκεντρώσεων των εκδόχων, τη περαιτέρω βελτιστοποίηση της αναλυτικής μεθοδολογίας και την επικύρωσή της.

Χαρακτηρισμός της δραστικής φαρμακευτικής ουσίας (API)

Η δραστική φαρμακευτική ουσία ενός πρωτότυπου φαρμακευτικού σκευάσματος χαρακτηρίζεται τόσο από μοριακές, όσο και από σωματιδιακές ιδιότητες που περιλαμβάνουν κρυσταλλικές μορφές, ένυδρα άλατα και διαλυτώματα^[15]. Το καινοτόμο προϊόν αναπτύσσεται συνήθως, χρησιμοποιώντας την πιο σταθερή πολυμορφική μορφή για να αποφευχθούν επιπλοκές μετασχηματισμού κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και της αποθήκευσης. Οι φαρμακοβιομηχανίες παραγωγής γενόσημων φαρμάκων λοιπόν, πρέπει να χρησιμοποιούν την ίδια πολυμορφική μορφή για να εξασφαλίσουν

παρόμοια σταθερότητα και διαλυτότητα. Συνεπώς, για τον χαρακτηρισμό στερεών μορφών, χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές, όπως η **περίθλαση ακτίνων X** σε σκόνη, η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy - FTIR), η φασματοσκοπία Raman και η θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης. Ένα τυπικό όργανο μέτρησης των ακτίνων X που περιθλώνται, φαίνεται στη Εικόνα 1.1.



Εικόνα 1.1: Όργανο μέτρησης περιθλώμενων ακτίνων X

Μία ακόμη, γενική πρακτική των φαρμακοβιομηχανιών που εξασφαλίζει αύξηση του ρυθμού διάλυσης των φαρμάκων που είναι ελάχιστα υδατοδιαλυτά, είναι η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων της δραστικής φαρμακευτικής ουσίας, ή αλλιώς η μικροποίηση. Οι πληροφορίες που παρέχονται από την κατανομή μεγέθους των σωματιδίων της δραστικής ουσίας του καινοτόμου προϊόντος είναι εξαιρετικά σημαντικές για την εξασφάλιση της βιοϊσοδυναμίας του γενόσημου φαρμάκου. Η μοναδική τεχνική που μπορεί να διακρίνει τη δραστική ουσία από τα περιεχόμενα έκδοχα με βάση χαρακτηριστικά όπως, τα σχήματα των σωματιδίων και τα διχρωμικά πρότυπα για την παροχή πληροφοριών, είναι η μικροσκοπία. Κάτω από το πολωμένο φως, τα κρυσταλλικά φάρμακα παρουσιάζουν διχρωμικά πρότυπα, ενώ τα μη κρυσταλλικά έκδοχα όχι. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναγνώριση και τον χαρακτηρισμό της δραστικής ουσίας του καινοτόμου φαρμάκου σε μοριακά και σωματιδιακά επίπεδα, γεγονός που οδηγεί στην ταχεία λήψη αποφάσεων και την ελάττωση του χρόνου ανάπτυξης γενόσημων φαρμάκων.

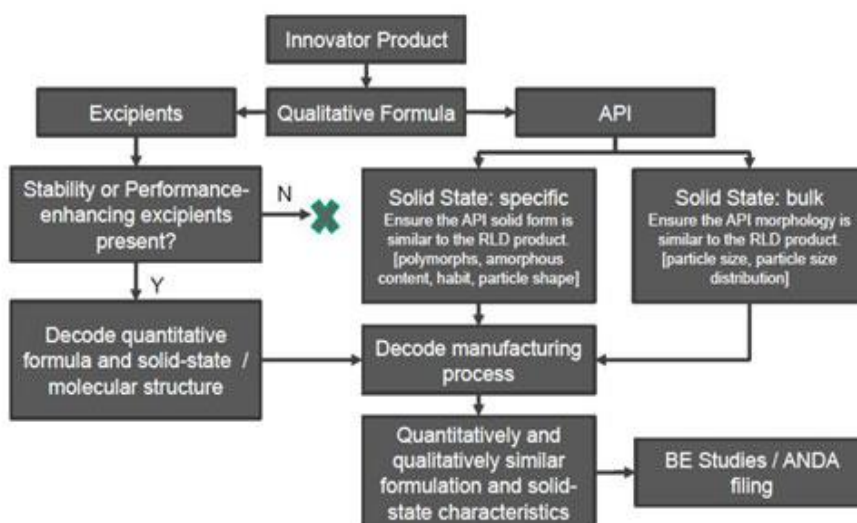
Καθορισμός της διαδικασίας παρασκευής

Τα περισσότερα φαρμακευτικά σκευάσματα που χορηγούνται από το στόμα, μπορούν να παρασκευασθούν χρησιμοποιώντας είτε υγρή κοκκοποίηση, είτε ξηρή κοκκοποίηση, είτε άμεση συμπίεση, ανάλογα με τη σταθερότητα της δραστικής φαρμακευτικής ουσίας, το συνολικό βάρος του σκευάσματος και τις φυσικοτεχνικές ιδιότητες των κύριων συστατικών, όπως η συμπιεστότητά τους. Συνήθως, η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του καινοτόμου προϊόντος μπορεί να προβλεφθεί

με βάση τις φυσικοχημικές ιδιότητες της δραστικής ουσίας και της οπτικής εξέτασης του θραυσματοποιημένου σκευάσματος. Η υγρή ή ξηρή κοκκοποίηση σχετίζεται με θραύσματα που είναι περισσότερο τραχεία από αυτά που παράγονται με άμεση συμπίεση.

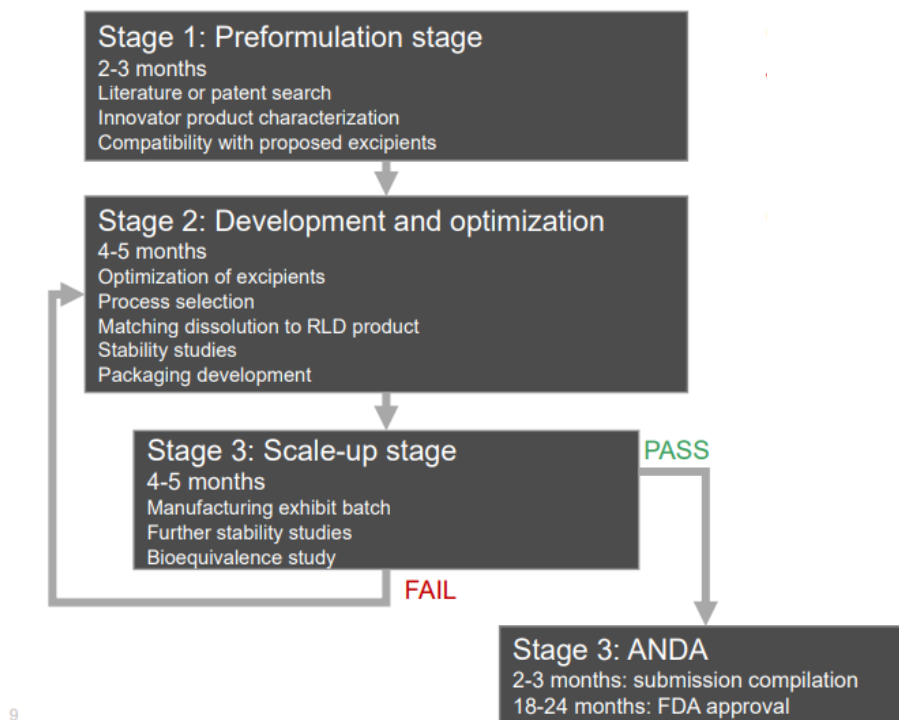
Ένας άλλος τρόπος καθορισμού της διαδικασίας παρασκευής, περιλαμβάνει την τοποθέτηση του σκευάσματος σε τρυβλίο petri που περιέχει νερό και την εξέταση της αποσάρθρωσής του με οπτικό μικροσκόπιο χαμηλής ισχύος. Τα σκευάσματα που παρασκευάζονται χρησιμοποιώντας άμεση συμπίεση, αποσυντίθενται σε ξεχωριστά σωματίδια, ενώ εκείνα που παρασκευάζονται με υγρή ή ξηρή κοκκοποίηση, αποσυντίθενται σε συσσωματώματα σωματιδίων (κόκκους). Αυτές οι πληροφορίες μπορούν να συνδυαστούν με την ποιοτική σύσταση για να επιβεβαιωθούν οι λειτουργίες των εκδόχων στη συγκεκριμένη μορφή δοσολογίας.

Στο παρακάτω σχήμα, παρουσιάζεται ένα δέντρο απόφασης για την πραγματοποίηση μιας μελέτης αντίστροφης μηχανικής σε ένα γενόσημο φαρμακευτικό προϊόν, συνοψίζοντας όλα όσα αναφέρθηκαν προηγουμένως.



Σχήμα 1.1: Δέντρο απόφασης μελετών αντίστροφης μηχανικής (Reverse Engineering Studies)

Οι μελέτες αντίστροφης μηχανικής, λοιπόν, διευκολύνουν σημαντικά τη διαδικασία λήψης αποφάσεων σε διάφορα στάδια ανάπτυξης του γενόσημου φαρμακευτικού προϊόντος, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα. Κατά τη διάρκεια του πρώτου σταδίου, οι πληροφορίες που παρέχονται σχετικά με τη σταθερή μορφή της δραστικής φαρμακευτικής ουσίας, μπορούν να οδηγήσουν στην ταχύτερη επιλογή κατάλληλων προμηθευτών, ενώ η αποκωδικοποίηση της ποσοτικής σύστασης, κατά το δεύτερο στάδιο, σχετίζεται με τη δραματική μείωση του αριθμού των πειραμάτων που απαιτούνται για την επίτευξη της βέλτιστης σύνθεσης.



Σχήμα 1.2: Στάδια ανάπτυξης ενός γενόσημου φαρμακευτικού προϊόντος

Συνοψίζοντας λοιπόν, το κόστος και η ταχύτητα στην παγκόσμια αγορά, αποτελούν τα σημαντικότερα κλειδιά για την επιτυχία μιας φαρμακοβιομηχανίας παραγωγής γενόσημων φαρμάκων. Οι μελέτες αντίστροφης μηχανικής καθίστανται το χρησιμότερο εργαλείο για την ανάπτυξη των γενόσημων φαρμάκων και την επίτευξη της βιοϊσοδυναμίας τους με τα πρωτότυπα φαρμακευτικά σκευάσματα, ενώ μια ορθολογική στρατηγική αντίστροφης μηχανικής που περιλαμβάνει την αποκωδικοποίηση της ποσοτικής σύστασης, τον χαρακτηρισμό της δραστικής ουσίας και του καθορισμού της διαδικασίας παρασκευής μπορεί να μειώσει σημαντικά τα χρονοδιαγράμματα ανάπτυξης και κόστους^[11].

1.3 Άλλες εφαρμογές^[16]

Πέραν του τομέα της φαρμακευτικής χημείας, οι μελέτες αντίστροφης μηχανικής χρησιμοποιούνται ευρέως και στην παραγωγή θεραπευτικών πεπτιδίων, που εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη γνώση των βιοσυνθετικών οδών από τις οποίες προέρχονται. Αξιοποιώντας λοιπόν, τις μελέτες αυτές, έχουν αποδειχθεί πολλές φυσικοχημικές ιδιότητες αντιμικροβιακών πεπτιδίων με βάση τις μελέτες σχέσεων δομής - δράσης των *de novo* πεπτιδίων που είναι ανάλογα των πεπτιδίων - ενδιαφέροντος και έχει μελετηθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ διαφορετικών παραμέτρων βιολογικών παραγόντων που ρυθμίζουν την αντιμικροβιακή δράση. Η έρευνα των φυσικοχημικών ιδιοτήτων, όπως το φορτίο και η ελικοειδής μορφή ενός πεπτιδίου, προσφέρει μια γενική εικόνα της βιολογικής δραστηριότητας που διαθέτει και διευκολύνει την ανάπτυξη συνθετικών πεπτιδίων, βασισμένων στις αλλαγές της αλληλουχίας των αμινοξέων.

Τέλος, τέτοιες μελέτες χρησιμοποιούνται διαρκώς και στον σχεδιασμό ιατρολογικών ειδών, με αποτέλεσμα η συγκεκριμένη εφαρμογή να εμπίπτει στο πεδίο της Ιατρικής Αντίστροφης Μηχανικής (Medical Reverse Engineering - MRE), κατά την οποία η μεθοδολογία παραγωγής διέπεται από την τελική χρήση της τεχνολογίας. Οι σύγχρονες εφαρμογές τελικής χρήσης MRE, περιλαμβάνουν εξατομικευμένα εμφυτεύματα για την ανακατασκευή του οστού, οδοντικά εμφυτεύματα, χειρουργικά εργαλεία, οπτική και οπτομετρία, ορθοπεδική και μηχανική οστών. Η μεθοδολογία παραγωγής MRE περιλαμβάνει τέσσερις φάσεις: α) τις εισροές MRE, β) την απόκτηση δεδομένων, γ) την επεξεργασία δεδομένων και δ) την ανάπτυξη και έρευνα της βιοϊατρικής εφαρμογής. Ωστόσο, ο σύνθετος σχεδιασμός, η έλλειψη διεπιστημονικής επικοινωνίας και συνεργασίας και το υψηλό κόστος της τεχνολογίας και των επενδύσεων, αναφέρονται συχνά ως οι λόγοι αυτής της μη εκτεταμένης εφαρμογής.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο: ΠΡΑΣΟΥΓΡΕΛΗ, ΕΝΑ ΕΥΡΕΩΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΟ ΑΝΤΙΘΡΟΜΒΩΤΙΚΟ ΦΑΡΜΑΚΟ

2.1 Εισαγωγή

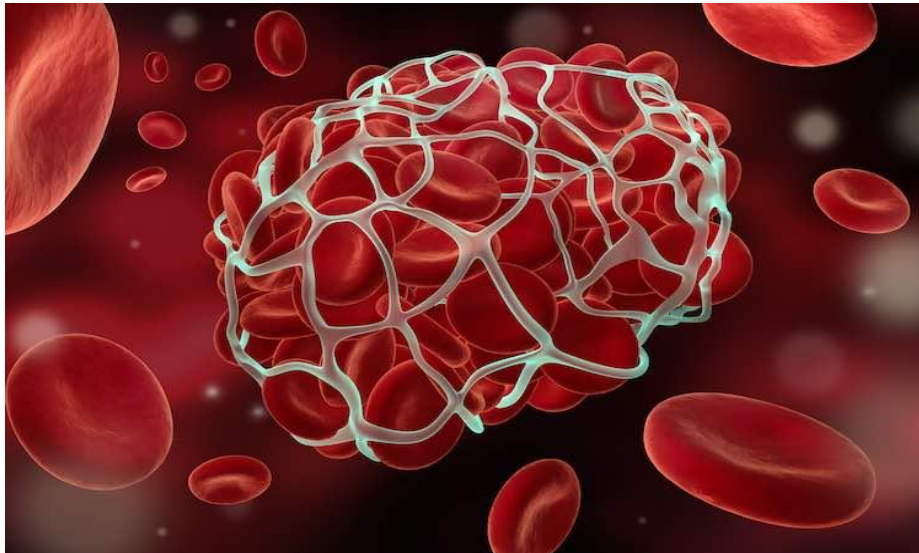
Τα αιμοπετάλια ή αλλιώς θρομβοκύτταρα, είναι μικρά, δισκοειδή, διάφανα κυτταρικά θραύσματα μεγαλύτερων κυττάρων με μέσο όρο διάρκειας ζωής τις 5 με 9 ημέρες. Αποτελούν μια φυσική πηγή αυξητικών παραγόντων και χρησιμεύουν ευρέως στην επούλωση των πληγών και των τραυμάτων. Ο χαμηλός αριθμός των αιμοπεταλίων σχετίζεται άμεσα με σοβαρές αιμορραγίες, ενώ ο υψηλός αριθμός σχετίζεται με τον σχηματισμό θρόμβων αίματος (θρόμβωση), οι οποίοι μπορεί να φράξουν τα αιμοφόρα αγγεία και να στερήσουν από τους ιστούς και τα όργανα το οξυγόνο και τα θρεπτικά συστατικά, με αποτέλεσμα περιστατικά όπως εγκεφαλικά επεισόδια, εμφράγματα, πνευμονικές εμβολές ή απόφραξη των αιμοφόρων αγγείων σε άλλα μέρη του σώματος κλπ^[17,18].

Συνήθως, προσκολλώνται στις θέσεις αγγειακής βλάβης και ενεργοποιούνται, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση μεσολαβητών σε υψηλές συγκεντρώσεις, όπως η διφωσφορική αδενοσίνη (ADP), η θρομβίνη, η θρομβοξάνη A₂ και το κολλαγόνο. Αυτό οδηγεί σε περαιτέρω ενεργοποίηση και εντονότερη συσσωμάτωσή τους, ενέργειες που αποτελούν ένα πρώιμο στάδιο μορφολογικών αλλαγών, έκκρισης και ανάπτυξης προθρομβωτικών και προφλεγμονωδών συνεπειών. Τα συσσωματώματα αυτά διαδραματίζουν κεντρικότατο ρόλο στη νέκρωση του μυοκαρδίου και στο πρώιμο σχηματισμό μιας οξείας στεφανιαίας θρόμβωσης, ασθένειας ευρύτατα γνωστής ως **Οξύ Στεφανιαίο Σύνδρομο** (Acute Coronary Syndrome - ACS).

Το σύνδρομο αυτό περιλαμβάνει καρδιακές προσβολές και ασταθή στηθάγχη και επηρεάζει περίπου 7,5 εκατομμύρια ανθρώπους ετησίως. Έχει σημαντικό κοινωνικοοικονομικό αντίκτυπο, καθώς οι ασθενείς χρειάζονται νοσηλεία, αποκατάσταση και συχνά υποφέρουν από μεταγενέστερα ισχαιμικά επεισόδια. Αποτελεί μία από τις κυριότερες αιτίες νοσηλείας σε όλο τον κόσμο, λόγω της διατήρησης των παραγόντων κινδύνου και του αυξανόμενου ηλικιακού εύρους των ασθενών. Οι περισσότεροι ασθενείς με ACS υφίστανται είτε διαδερμική στεφανιαία παρέμβαση (Percutaneous Coronary Intravenous - PCI), είτε φαρμακοθεραπεία με φάρμακα επαναιμάτωσης, αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα, αντιθρομβίνες, νιτρικά, μορφίνες^[19] κ.ά.

Συνεπώς, η ανακάλυψη, η σύνθεση και η ανάλυση των **αντιθρομβωτικών** φαρμάκων, αποτελεί μια συνεχή ανάγκη στην προσπάθεια της επιστήμης να βελτιωθεί η θεραπεία διαφόρων ασθενειών, να αναπτυχθεί θεραπεία για ασθένειες που μέχρι τώρα δεν μπορούν να αντιμετωπισθούν ή οι ασθένειες αυτές μόλις τώρα είχαν εντοπισθεί και τέλος, να παραχθούν πιο ασφαλή φάρμακα τα οποία να μειώνουν ή να μην

παρουσιάζουν ανεπιθύμητες παρενέργειες γνωστών υπαρχόντων φαρμάκων. Η συμβολή τέτοιων φαρμάκων, λοιπόν, στη Δημόσια Υγεία και την κοινωνική ευημερία είναι αδιαμφισβήτητη, με αποτέλεσμα να εντείνονται συνεχώς οι προσπάθειες ανάλυσής τους με την αρωγή της σύγχρονης φαρμακευτικής επιστήμης.



Εικόνα 2.1: Τρισδιάστατη αναπαράσταση των αιμοπεταλίων ή θρομβοκυττάρων

2.2 Αντιθρομβωτικά φάρμακα^[20]

Για την πρόληψη και τη θεραπεία των ισχαιμικών επεισοδίων χρησιμοποιούνται τα αντιθρομβωτικά φάρμακα, στα οποία υπάγονται τα αντιαιμοπεταλιακά, τα αντιπηκτικά και τα θρομβολυτικά.

Αντ αιμοπεταλιακά φάρμακα

Τα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα δεν επιτρέπουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και συνεπώς δεν επιτρέπουν στα κύτταρα να συγκολλώνται μεταξύ τους και να σχηματίζουν θρόμβους που αποφράσσουν αγγεία. Το πρώτο αντιαιμοπεταλιακό φάρμακο που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ασπιρίνη, η οποία σήμερα αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο για την αντιμετώπιση οξείων ισχαιμικών συνδρόμων και για την δευτερογενή προφύλαξη των καρδιαγγειακών επεισοδίων. Όταν η ασπιρίνη χορηγείται χρονίως, η ημερήσια δοσολογία της δεν θα πρέπει να ξεπερνά τα 100 mg, καθώς μεγαλύτερη δοσολογία ενέχει τον κίνδυνο αιμορραγίας.

Τα νεότερα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα, όπως η Κλοπιδογρέλη (Plavix), η Τικαγρελόρη (Brilique) και η **Πρασουγρέλη (Effient)**, πλεονεκτούν όσον αφορά την αντιαιμοπεταλιακή τους δράση έναντι της ασπιρίνης, ωστόσο επαυξάνουν την αιμορραγική διάθεση και είναι υψηλότερου κόστους. Μη κλινικές μελέτες έδειξαν ότι, η **Πρασουγρέλη** ήταν περίπου 10 - 100 φορές ισχυρότερη από την Κλοπιδογρέλη, όσον αφορά την αναστολή της συσσώρευσης αιμοπεταλίων *ex vivo* και του σχηματισμού θρόμβων *in vivo*, κάτι που

επιβεβαιώθηκε και από τα πρώιμα κλινικά δεδομένα σε υγιή άτομα. Φαίνεται, λοιπόν, να αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη επιλογή σε ασθενείς με υψηλό κίνδυνο ισχαιμικών επεισοδίων.

Θρομβολυτικά φάρμακα

Τα φάρμακα αυτά διαλύουν τον θρόμβο και έτσι επιτρέπουν την επαναιμάτωση των ιστών. Η χρησιμοποίησή τους γίνεται μόνο υπό αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες στο νοσοκομείο. Είναι δε αποτελεσματικά όταν χορηγούνται εντός 4-6 h από το καρδιαγγειακό επεισόδιο.

Αντιπηκτικά φάρμακα

Αυτά χορηγούνται για τη θεραπεία και την πρόληψη τόσο της θρόμβωσης, όσο και του θρομβοεμβολιασμού. Εδώ υπάγονται: 1. Οι Ηπαρίνες, όπως η κλασική ηπαρίνη (Unfractionated Heparin - UFH) και οι ηπαρίνες μικρού μοριακού βάρους (Low Molecular Weight Heparins - LMWHs), 2. Οι ανταγωνιστές της βιταμίνης K, 3. Οι άμεσοι αναστολείς της θρομβίνης (Direct Thrombin Inhibitors - DTIs) και 4. Τα νεότερα, εκ του στόματος, αντιπηκτικά.

1. Η κλασική ηπαρίνη και οι ηπαρίνες μικρού μοριακού βάρους δεν επιτρέπουν την αύξηση του θρόμβου, ενώ παρεμποδίζουν τον σχηματισμό του. Χορηγούνται, συνήθως, παρεντερικά. Η κλασική ηπαρίνη χορηγείται κυρίως ενδοφλεβίως και δρα άμεσα, ωστόσο για τη επίτευξη θεραπευτικού αποτελέσματος απαιτούνται συχνοί εργαστηριακοί έλεγχοι, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιείται κυρίως στο νοσοκομείο. Αντιθέτως, οι ηπαρίνες μικρού μοριακού βάρους χορηγούνται υποδοριώς και εκτός νοσοκομείου, είναι συνεπώς ευκολότερες στη χρήση τους, ενώ δεν απαιτούν συχνούς εργαστηριακούς αιματολογικούς ελέγχους. Για τους προαναφερθέντες λόγους έχουν αντικαταστήσει τη UFH στη Γενική Ιατρική και την επιστήμη της Καρδιολογίας.
2. Οι ανταγωνιστές της βιταμίνης K, όπως η Βαρφαρίνη και η Ασενοκουμαρόλη, λαμβάνονται κυρίως από το στόμα και ανταγωνίζονται τη βιταμίνη K, η οποία ευθύνεται για την ανεπιθύμητη πήξη του αίματος. Συνεπώς, δεν επιτρέπουν τον σχηματισμό θρόμβου. Η δράση αυτών των αντιπηκτικών επηρεάζεται από τη διατροφή και την ταυτόχρονη λήψη άλλων φαρμάκων, που σημαίνει ότι ο ασθενής δεν μπορεί να λάβει άλλα φάρμακα που αλληλεπιδρούν με αυτά, ενώ θα πρέπει να βρίσκεται σε συνεχή και σταθερή λήψη ποσότητας βιταμίνης K μέσω της διατροφής του, καθημερινά. Ο έλεγχος της αντιπηκτικής τους δράσης γίνεται μέσω του International Normalized Ratio (INR), και θα πρέπει να επαναλαμβάνεται τουλάχιστον κάθε 3 εβδομάδες. Με αυτόν τον τρόπο αποφεύγεται η υπερθεραπεία, που ενέχει τον κίνδυνο της αιμορραγίας, ή η υποθεραπεία, που οδηγεί δυνητικά σε θρόμβωση. Ένα ακόμα αδύνατο σημείο αυτών των αντιπηκτικών είναι η αργή δράση τους κατά την έναρξη της χορήγησής τους (2-7 ημέρες), με αποτέλεσμα να απαιτείται συνχορήγηση με UFH ή LMWH στη αρχή, έως ότου το INR είναι ισοδύναμο ή μεγαλύτερο του 2. Η διατήρηση ενός INR μεταξύ 2.0 - 3.0 (ήπια αντιπηκτική αγωγή) συνιστάται για τη

προφύλαξη και τη θεραπεία της φλεβικής θρόμβωσης και των θρομβοεμβολικών επιπλοκών που συνδέονται με κολπική μαρμαρυγή, για την προφύλαξη από συστηματικές εμβολές μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου, καθώς και για βιοπροσθετικές καρδιακές βαλβίδες.

3. Οι άμεσοι αναστολείς της θρομβίνης (DTIs) είναι ισχυρά αντιπηκτικά φάρμακα που χορηγούνται μόνο σε νοσοκομείο (ενδοφλεβίως). Εδώ υπάγεται το πεπτίδιο ιρουδίνη, που προέρχεται από τους σιελογόνους αδένες της ιατρικής βδέλλας και διάφορα συνθετικά παράγωγά της.
4. Στα νεότερα, εκ του στόματος, αντιπηκτικά υπάγονται η Νταμπιατράνη (Pradaxa), η Ριβαροξαμπάνη (Xarelto) και η Απιξαμπάνη (Eliquis). Σε αντίθεση με τους ανταγωνιστές της βιταμίνης Κ, τα αντιπηκτικά αυτά είναι πολύ πιο εύκολα στη χρήση, καθώς δεν απαιτούν αιματολογικούς ελέγχους, δρουν ταχέως και δεν επηρεάζονται από το είδος της διατροφής. Στα μειονεκτήματά τους συγκαταλέγονται το υψηλό κόστος και η έλλειψη ειδικού antidotou (εκτός του Pradaxa) σε περίπτωση αιμορραγίας.

2.3 Πρασουγρέλη, ή αλλιώς Effient

2.3.1 Εισαγωγή

Η **Πρασουγρέλη** (εμπορική ονομασία **Effient** στις ΗΠΑ, την Αυστραλία και την Ινδία και **Efient** στην Ευρωπαϊκή Ένωση) ανήκει στην κατηγορία των αντιθρομβωτικών φαρμάκων, και πιο συγκεκριμένα στα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Είναι ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται ευρέως για την πρόληψη του σχηματισμού θρόμβων αίματος, μέσω της μη αναστρέψιμης σύνδεσής του με υποδοχείς του κυτοχρώματος.

Αναπτύχθηκε από την Daiichi Sankyo Co. και σήμερα διατίθεται στην αγορά, στις Ηνωμένες Πολιτείες και τον Καναδά, σε συνεργασία με την Elli Lilly and Company για τη μείωση των θρομβωτικών καρδιαγγειακών επεισοδίων σε άτομα με οξεία στεφανιαία σύνδρομο ή ασθενείς που πρόκειται να υποστούν διαδερμική στεφανιαία παρέμβαση (PCI). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) ενέκρινε τη χρήση του στην Ευρώπη τον Φεβρουάριο του 2009 και στις ΗΠΑ τον Ιούλιο του ίδιου έτους^[21].



Εικόνα 2.2: Ετικέτα φαρμακευτικού σκευάσματος Effient™, όπως διατίθεται στην αγορά

Το συγκεκριμένο, λοιπόν, φαρμακευτικό προϊόν, χρησιμοποιείται ευρέως σε συνδυασμό με την ασπιρίνη από ασθενείς με καρδιακές παθήσεις (πρόσφατη καρδιακή προσβολή, αστάθειες καρδιακών παλμών) για την πρόληψη σοβαρότερων προβλημάτων καρδιάς / αιμοφόρων αγγείων, όπως εγκεφαλικά επεισόδια, θρόμβοι αίματος κυρίως ενήλικων ασθενών, συμβάλλοντας στη διατήρηση της ομαλής ροής του αίματος στο ανθρώπινο σώμα^[22].

Η μεγαλύτερη ανησυχία, όσον αφορά την συγχρόνηση αυτή, είναι η εμφάνιση ανεπιθύμητων παρενεργειών, ωστόσο λαμβάνοντας υπόψη τη σχέση οφέλους / κινδύνου, τείνει σταδιακά να εξαλειφθεί.

2.3.2 Χημικά και Φυσικά χαρακτηριστικά

Το πρωτότυπο φαρμακευτικό προϊόν της πρασουγγέλης κυκλοφορεί στην αγορά με τη μορφή υποκίτρινων λεπτά επικαλυπτόμενων δισκίων, που περιέχουν 5 ή 10 mg υδροχλωρικού άλατος πρασουγγέλης ως δραστικής ουσίας. Η δομή της δραστικής αυτής ουσίας διασαφηνίστηκε με έναν συνδυασμό στοιχειακής ανάλυσης, υπέρυθρης φασματοσκοπίας (IR), υπεριώδους ακτινοβολίας (UV), φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και φασματομετρίας μάζας (MS), ενώ συνήθως απαντάται ως ρακεμικό μείγμα δύο εναντιομερών μορφών, με αποτέλεσμα να μην παρατηρείται καμία οπτική περιστροφή.

Πέραν από αυτή τη δραστική ουσία, το Effient αποτελείται και από μια πληθώρα εκδόχων, τα οποία αν και φαρμακολογικά αδρανή, προστίθενται στα διάφορα φαρμακευτικά σκευάσματα δρώντας ως χρωστικά, λιπαντικά, συνδετικά, αραιωτικά ή απορροφητικά μέσα, με σκοπό είτε να βελτιώσουν κάποιο χαρακτηριστικό τους, είτε να συμβάλλουν στη καλύτερη απορρόφηση, κατανομή, διάλυση και δράση της δραστικής ουσίας. Στο συγκεκριμένο αντιθρομβωτικό φάρμακο, απαντώνται έκδοχα του πυρήνα, όπως:

- **Μικροκρυσταλλική κυτταρίνη**
- **Μαννιτόλη (E421)**
- **Υπρομελλόζη (E464)**
- **Στεατικό Μαγνήσιο**
- **Κροσκαρμελλόζη**

αλλά και έκδοχα της εξωτερικής επικάλυψης, όπως η μονοϋδρική λακτόζη, το διοξείδιο του τιτανίου (E171), η τριακετίνη (E1518), το κόκκινο και το κίτρινο οξείδιο του σιδήρου (E172), αλλά και ο τάλκης.

Η απορρόφηση και ο μεταβολισμός του φαρμάκου αυτού πραγματοποιούνται ταχέως μετά την χορήγησή του, ενώ η μέγιστη συγκέντρωση του ενεργού μεταβολίτη στο

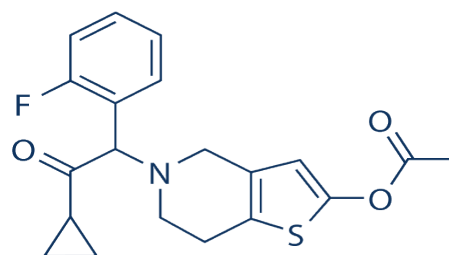
πλάσμα (C_{max}) απαντάται μετά από περίπου 30 min. Κατά την πραγματοποίηση μελετών σε υγιή άτομα, αποδείχθηκε ότι ο σχηματισμός του ενεργού μεταβολίτη δεν επηρεάζεται κατά την χορήγηση ύστερα από γεύμα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά οξέα και θερμίδες, ωστόσο η C_{max} μειώθηκε κατά 49 % και ο χρόνος για την επίτευξη της C_{max} (T_{max}) αυξήθηκε από 0,5 σε 1,5 h.

Ο χρόνος ημίσειας ζωής του ενεργού μεταβολίτη του φαρμάκου αυτού είναι περίπου 7,4 h, ενώ περίπου το 68 % της χορηγούμενης δόσης απεκκρίνεται στα ούρα και μόλις το 27 % στα κόπρανα με την μορφή ανενεργών μεταβολιτών. Παρακάτω, συνοψίζονται μερικά ακόμα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά του φαρμάκου αυτού, καθώς και ο συντακτικός τύπος με τον οποίο απαντάται^[23].

Μοριακός τύπος: $C_{20}H_{20}FNO_3S$

Σχετική Μοριακή μάζα: **373,442**

pKa (ισχυρότερη όξινη ομάδα): **14,25**

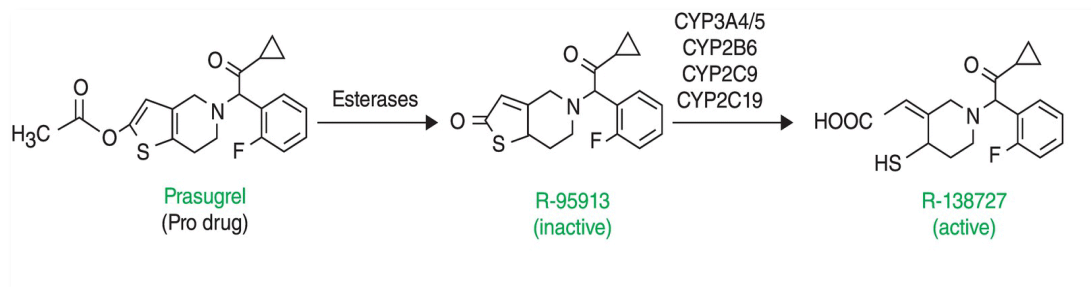


Εικόνα 2.3: Συντακτικός τύπος της Πρασουγρέλης

2.3.3 Μηχανισμός δράσης^[24]

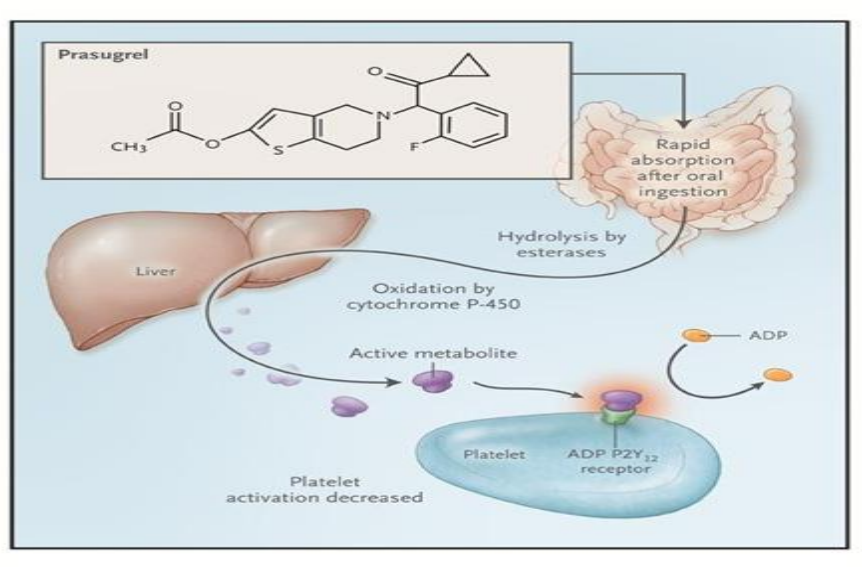
Από εκτεταμένες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, έχει αποδειχθεί ότι η δράση του φαρμάκου της **Πρασουγρέλης** και όλων των αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων (Τικλοπιδίνη - Ticlid, Κλοπιδογρέλη - Plavix), σχετίζεται με την αναστολή της ενεργοποίησης και της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων μέσω της μη αναστρέψιμης πρόσδεσης του ενεργού μεταβολίτη τους στην ομάδα P2Y₁₂ των υποδοχέων της διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP) των αιμοπεταλίων. Καθώς τα αιμοπετάλια συμμετέχουν στην έναρξη ή/και στην εξέλιξη των θρομβωτικών επιπλοκών της αθηροσκληρωτικής νόσου, η αναστολή της λειτουργίας τους μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του ποσοστού των καρδιαγγειακών επιπλοκών, όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου, το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, ακόμη και ο θάνατος.

Πιο συγκεκριμένα, η Πρασουγρέλη αποτελεί ένα προφάρμακο που απαιτεί *in vivo* ενζυματικό μετασχηματισμό στο ήπαρ και στο έντερο, για τον σχηματισμό του ενεργού μεταβολίτη του, R-138727. Ο ενεργός αυτός μεταβολίτης, είναι μια ένωση σουλφυδρυλίου που δεσμεύεται ομοιοπολικά, μέσω δισουλφιδικών δεσμών, με υπολείμματα κυστεΐνης στις θέσεις 97 και 175 του υποδοχέα P2Y₁₂, συμβάλλοντας στο μόνιμο αποκλεισμό του. Λόγω της ξεχωριστής χημικής δομής αυτού του φαρμακευτικού προϊόντος, η μετατροπή αυτή πραγματοποιείται ταχύτατα, με τη βοήθεια καρβοξυλεστερασών, αλλά και πολλαπλών ενζύμων του κυτοχρώματος P450 (CYP3A4, CYP2B6, CYP2C9 και CYP2C19), όπως φαίνεται και στην Εικόνα 2.3:



Εικόνα 2.4: Αντίδραση ενζυματικού μετασχηματισμού του προφαρμάκου της Πρασουγρέλης στον ενεργό μεταβολίτη του

Σε σύγκριση με την Κλοπιδογρέλη, η Πρασουγρέλη αναστέλλει τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων ταχύτερα, πιο σταθερά και σε μεγαλύτερη έκταση από τις καθιερωμένες και υψηλότερες δόσεις κλοπιδογρέλης που χρησιμοποιήθηκαν σε υγιείς εθελοντές και ασθενείς με στεφανιαία νόσο. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι 2-14 % του παγκόσμιου πληθυσμού που υποφέρει από τέτοια νοσήματα, έχει χαμηλά επίπεδα του ενζύμου του ήπατος CYP2C19, που απαιτείται για τον μεταβολισμό της κλοπιδογρέλης, με αποτέλεσμα μη ικανοποιητικές ενδείξεις^[25,26]. Ο μηχανισμός δράσης της Πρασουγρέλης, λοιπόν, περιγράφεται λεπτομερώς στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 2.5: Μηχανισμός δράσης της Πρασουγρέλης

2.3.4 Δοσολογία και τρόπος χορήγησης^[27]

Το συγκεκριμένο φάρμακο χορηγείται από το στόμα και πρέπει να λαμβάνεται αμάσητο και αθρυμμάτιστο. Η διάρκεια της θεραπείας εξαρτάται από τη βαρύτητα της καρδιακής νόσου και την κλινική εξέλιξη του ασθενούς. Ο τρόπος χορήγησης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ηλικία του ασθενούς, αλλά και από τυχόν άλλες διαταραχές που

αντιμετωπίζει. Συνεπώς, είναι σκόπιμο να διακριθούν οι ακόλουθες κατηγορίες ανθρώπων:

1. Ενήλικες. Στους ενήλικες ασθενείς, η αντιθρομβωτική θεραπεία σηματοδοτείται με την χορήγηση μιας απλής δόσης των 60 mg και συνεχίζεται με δόσεις των 10 mg, μια φορά την ημέρα. Σε ασθενείς, ωστόσο, που πρόκειται να υποστούν στεφανιαία αγγειογραφία, η αρχική δόση πρέπει να λαμβάνεται λίγο πριν τη διαδερμική στεφανιαία παρέμβαση (PCI). Το συγκεκριμένο φάρμακο, χορηγείται σε συνδυασμό με την ασπιρίνη (75 - 325 mg), ενώ η πρόωρη διακοπή οποιουδήποτε αντιαιμοπεταλιακού παράγοντα, μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένο κίνδυνο θρόμβωσης, εμφράγματος του μυοκαρδίου ή θανάτου. Συνιστάται θεραπεία έως 12 μηνών, εκτός και αν η πρόωρη διακοπή της είναι κλινικά ενδεδειγμένη.

2. Υπερήλικες. Η χρήση του αντιθρομβωτικού αυτού φαρμάκου σε ασθενείς ηλικίας ≥ 75 ετών, δεν συνιστάται. Ωστόσο, εάν μετά από μια προσεκτική μεμονωμένη αξιολόγηση οφέλους / κινδύνου, η θεραπεία θεωρείται και κρίνεται απαραίτητη στην ηλικιακή αυτή ομάδα, τότε μετά την αρχική δόση των 60 mg, πρέπει να συνταγογραφηθεί μειωμένη δόση συντήρησης των 5 mg. Αυτό συμβαίνει, διότι αυτοί οι ασθενείς έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία στην αιμορραγία και την έκθεση του ενεργού μεταβολίτη της πρασουγρέλης.

3. Ασθενείς βάρους <60 kg. Και σε αυτή την περίπτωση ασθενών, μετά την αρχική δόση των 60 mg, πρέπει να συνταγογραφείται μειωμένη δόση συντήρησης των 5 mg. Σε διαφορετική περίπτωση, θα εμφανιστούν ανεπιθύμητες παρενέργειες με δυσμενείς επιπτώσεις για την υγεία των ασθενών.

4. Νεφρική Ανεπάρκεια / Ηπατική Δυσλειτουργία. Δεν απαιτείται προσαρμογή της δόσης σε ασθενείς με νεφρική ή/και ηπατική δυσλειτουργία, αν και υπάρχει περιορισμένη θεραπευτική εμπειρία σε αυτή την ομάδα των ασθενών.

5. Παιδιατρικός πληθυσμός. Η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα της Πρασουγρέλης, δεν έχει επαρκώς τεκμηριωθεί σε παιδιά ηλικίας κάτω των 18 ετών, ενώ περιορισμένα δεδομένα υπάρχουν και για τα παιδιά που νοσούν από την δρεπανοκυτταρική αναιμία.

2.3.5 Ειδικές προειδοποιήσεις και προφυλάξεις^[27]

Κατά τη διάρκεια των κλινικών μελετών του συγκεκριμένου φαρμακευτικού προϊόντος, οι βασικότερες αμφιβολίες περιελάμβαναν συμπτώματα, όπως ο αυξημένος κίνδυνος αιμορραγίας, η θρομβοπενία κλπ. Αυτό παρατηρήθηκε, κυρίως, σε ασθενείς με οξεία στεφανιαία σύνδρομο, λόγω της συγχρησιμοποιούμενης θεραπείας Πρασουγρέλης και ασπιρίνης. Επομένως, η χρήση του φαρμάκου αυτού, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη μόνο όταν τα οφέλη της πρόληψης ισχαιμικών επεισοδίων υπερτερούν του κινδύνου σοβαρών αιμορραγιών. Η ανησυχία αυτή ισχύει ιδιαίτερα για τους ασθενείς:

- ≥ 75 ετών

- με τάση προς αιμορραγία (π.χ. λόγω πρόσφατου τραύματος, πρόσφατης χειρουργικής επέμβασης, πρόσφατης ή υποτροπιάζουσας γαστρεντερικής αιμορραγίας ή ενεργού πεπτικού έλκους)

- με σωματικό βάρος <60 kg

- με ταυτόχρονη χορήγηση φαρμάκων που ενδέχεται να αυξάνουν τον κίνδυνο αιμορραγίας, συμπεριλαμβανομένων των από του στόματος αντιπηκτικών, της κλοπιδογρέλης, των μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs - NSAIDs) και των ινωδολυτικών φαρμάκων.

Πέραν όλων αυτών, εξαιρετικά σημαντική είναι και η ενημέρωση των ασθενών, πριν από κάθε προγραμματισμένη χειρουργική επέμβαση και αυτό διότι η χορήγηση του συγκεκριμένου φαρμάκου θα πρέπει να διακόπτεται 7 ημέρες πριν τη πραγματοποίησή της. Τέλος, ασθενείς με σπάνια κληρονομικά προβλήματα δυσανεξίας στη γαλακτόζη, ανεπάρκεια λακτάσης ή δυσαπορρόφηση γλυκόζης-γαλακτόζης, δεν πρέπει να λαμβάνουν αντιθρομβωτική θεραπεία με Πρασουγρέλη.

2.3.6 Υπερδοσολογία^[27]

Η υπερδοσολογία είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την πρόκληση εμετού, ενώ τόσο η πλύση στομάχου για την απομάκρυνση των καταποθέντων δισκίων, όσο και μια υποστηρικτική αντιμετώπιση είναι απαραίτητη.

2.3.7 Κύηση και θηλασμός^[27]

Τα αποτελέσματα μελετών σε ζώα δεν αποδεικνύουν επιβλαβείς επιδράσεις, όσον αφορά την εγκυμοσύνη, την ανάπτυξη του εμβρύου, τον τοκετό ή τη μεταγεννητική ανάπτυξη. Για το λόγο αυτό, η Πρασουγρέλη μπορεί να χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, μόνο όταν το δυνητικό όφελος για τη μητέρα δικαιολογεί τον πιθανό κίνδυνο για το έμβρυο.

Όσον αφορά την περίοδο του θηλασμού των νεογνών (γαλουχία), έχει αποδειχθεί ότι η Πρασουγρέλη απεκκρίνεται στο μητρικό γάλα, επομένως πρέπει να λαμβάνεται απόφαση σχετικά με το αν θα διακοπεί η γαλουχία ή η χορήγηση του φαρμάκου.

2.3.8 Αλληλεπιδράσεις με άλλα φαρμακευτικά προϊόντα^[27]

Η εκδήλωση της επιθυμητής φαρμακολογικής δράσης της Πρασουγρέλης, σχετίζεται άμεσα με το πιο διαδεδομένο φαρμακευτικό προϊόν, την **ασπιρίνη**. Η ασπιρίνη, χρησιμοποιείται ευρέως ως αναλγητικό, αντιπυρετικό και αντιφλεγμονώδες φάρμακο, ωστόσο σε χαμηλές δόσεις λειτουργεί και ως αντιθρομβωτικό. Συνεπώς, η συγχορήγησή

τους αποτελεί την αποτελεσματικότερη θεραπεία των καρδιαγγειακών νοσών.

Εκτεταμένες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, έχουν αποδείξει ότι μια απλή ενδοφλέβια δόση μη κλασματοποιημένης **ηπαρίνης** δεν επηρεάζει σημαντικά την αναστολή της συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων, ενώ ούτε η Πρασουγγρέλη επιδρά στην αντιπηκτική δράση της ηπαρίνης. Συνεπώς, αμφότερα τα φαρμακευτικά προϊόντα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ταυτόχρονα με ιδιαίτερη προσοχή, ωστόσο, λόγω του αυξημένου κινδύνου αιμορραγίας που ενέχει η συγχορήγησή τους. Όσον αφορά τις **στατίνες**, όπως η ατορβαστατίνη, που αποτελούν υποστρώματα των ενζύμων CYP3A του κυτοχρώματος, δεν αλλοιώνουν τη φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική των αντιθρομβωτικών φαρμάκων, συνεπώς δεν αναμένεται να έχουν επίδραση στην αναστολή που αυτά προκαλούν.

Η καθημερινή χορήγηση **ρανιτιδίνης** και **λανσοπραζόλης**, φαρμάκων που αυξάνουν το γαστρικό pH, σε ασθενείς που υποφέρουν από οξύ στεφανιαίο σύνδρομο, δεν επηρεάζει την T_{max} του δραστικού μεταβολίτη της πρασουγγρέλης, ωστόσο μειώνει την C_{max} κατά 14 % και 29 %, αντίστοιχα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη βραδύτερη έναρξη δράσης, και ως εκ τούτου δεν ενδείκνυται η συγχορήγησή τους. Αντιθέτως, φαρμακευτικά προϊόντα που δρουν ως αναστολείς των ενζύμων CYP3A του κυτοχρώματος, όπως η **κετοκοναζόλη**, και ως επαγωγείς αυτού, όπως η **ριφαμπικίνη**, δεν συμβάλλουν στη προκαλούμενη αναστολή της συσσώρευσης και ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, ούτε έχουν σημαντική επίδραση στη φαρμακοκινητική του ενεργού μεταβολίτη, ωστόσο μειώνουν τη C_{max} κατά 34 έως 46 %, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιούνται με προσοχή.

Τα περισσότερα οπιοειδή, όπως η **μορφίνη**, οδηγούν σε αργή έναρξη της φαρμακολογικής δράσης της πρασουγγρέλης, πιθανώς λόγω μειωμένης γαστρεντερικής κινητικότητας. Τα δεδομένα των κλινικών μελετών παραμένουν άγνωστα, ωστόσο σε ασθενείς που υποφέρουν από οξύ στεφανιαίο σύνδρομο, στους οποίους η μορφίνη δε μπορεί να κατακρατηθεί και η αναστολή των υποδοχέων P2Y₁₂ θεωρείται κρίσιμη, μπορεί να γίνει χρήση παρεντερικών αναστολέων P2Y₁₂ σε συνδυασμό με το αντιθρομβωτικό φάρμακο.

Τέλος, μια πληθώρα φαρμακευτικών προϊόντων, όπως η **βαρφαρίνη**, η **διγοξίνη** αλλά και τα **μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα**, ενέχουν τη πιθανότητα εμφάνισης ανεπιθύμητων παρενεργειών, όπως αυτές θα συζητηθούν παρακάτω, με αποτέλεσμα να συγχορηγούνται με προσοχή.

2.3.9 Πιθανές ανεπιθύμητες παρενέργειες

Σύμφωνα με τις μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στις Η.Π.Α και τα επίσημα δεδομένα του Οργανισμού Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration - FDA), κάθε χρόνο καταγράφονται περίπου δύο εκατομμύρια ανεπιθύμητες παρενέργειες γνωστών υπαρχόντων φαρμάκων, εκ των οποίων οι 124.000 οδηγούν σε

δυσμενείς επιπτώσεις, όπως ο θάνατος. Το πιο πρόσφατο παράδειγμα στη φαρμακευτική αφορά, αποτελεί η απόσυρση από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων ενός φαρμάκου που χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία της σκλήρυνσης κατά πλάκας. Το συγκεκριμένο φαρμακευτικό προϊόν (Daclizumad) ανακλήθηκε στις 7 Μαρτίου του 2018, επειδή μέσα στους πρώτους οκτώ μήνες από την έναρξη της θεραπείας, υπήρξαν 12 αναφορές σοβαρής μηνιγγοεγκεφαλίτιδας παγκοσμίως, εκ των οποίων οι 3 ήταν θανατηφόρες.

Η κυριότερη εξήγηση για την πληθώρα των παρενεργειών των φαρμάκων, πρέπει να αναζητηθεί στις κλινικές μελέτες, οι οποίες διαρκούν μεν 10 με 12 χρόνια πριν οδηγήσουν στην έγκριση και κυκλοφορία του φαρμάκου, ωστόσο έχουν κάποιους περιορισμούς. Αυτοί οι περιορισμοί αφορούν το μέγεθος του δείγματος των ασθενών που χρησιμοποιείται και τη χρονική διάρκεια που έχουν οι μελέτες αυτές, με αποτέλεσμα να αποτρέπονται τα ασφαλή συμπεράσματα. Ο περιορισμός στη χρονική διάρκεια των μελετών, το μέγεθος των δειγμάτων και η έλλειψη πειραματικών μοντέλων που αφορούν τη νόσο που μελετάται, δημιουργούν ένα πεδίο άγνωστο, όσον αφορά τις παρενέργειες που πιθανώς εμφανιστούν στο μέλλον. Αντιθέτως, όταν το φάρμακο κυκλοφορεί στο πραγματικό κόσμο και καταναλώνεται από όλους τους ασθενείς με τις συννοσηρότητές τους, οι οποίοι παίρνουν περισσότερες από μία φαρμακευτικές αγωγές, εμφανίζονται οι αλληλεπιδράσεις και εξακριβώνεται ασφαλέστερα το προφίλ του φαρμάκου στην αγορά. Είναι άλλωστε γεγονός ότι, το 20 % των φαρμάκων μετά την έγκριση, εμφανίζουν κάποια ανεπιθύμητη παρενέργεια και περίπου 4-5 % από αυτά, αποσύρονται από την αγορά μετά τη κυκλοφορία τους^[28].

Όπως όλα τα φάρμακα λοιπόν, έτσι και η Πρασουγγρέλη, μπορεί να εμφανίσει ανεπιθύμητες παρενέργειες, αν και δεν παρουσιάζονται οι ίδιες παρενέργειες σε όλους τους ανθρώπους. Το συγκεκριμένο φαρμακευτικό προϊόν, δεν πρέπει να χορηγείται σε ασθενείς με ενεργή παθολογική αιμορραγία ή έντονο ιστορικό ισχαιμικών επεισοδίων, λόγω του υψηλότερου κινδύνου εμφράγματος, ενδοκρανιακής αιμορραγίας κλπ. Πέρα από αυτό ωστόσο, έχουν αναφερθεί αρκετές αντιδράσεις υπερευαισθησίας σε ασθενείς που λαμβάνουν Πρασουγγρέλη, όπως το αγγειοοίδημα, με αποτέλεσμα να συνιστάται η παρακολούθηση των ασθενών αυτών με γνωστή αλλεργία στις θειενοπυριδίνες.

Συνοπτικά, οι ανεπιθύμητες ενέργειες που σχετίζονται με το **Effient**, περιλαμβάνουν:

1. Καρδιαγγειακές: Υπέρταση (8%), υπόταση (4%), κολπική μαρμαρυγή (3%), βραδυκαρδία (3%), μη καρδιακός πόνος στο θώρακα (3%), περιφερικό οίδημα (3%) θρομβωτική θρομβοκυτταροπενική πορφύρα (8%).

2. Κεντρικό νευρικό σύστημα: Κεφαλαλγία (6%), ζάλη (4%), κόπωση (4%), πυρετός (3%), πόνος στα άκρα (3%)

3. Δερματολογικές: Εξάνθημα (3%)

4. Ενδοκρινικές και μεταβολικές: Υπερχοληστερολαιμία / υπερλιπιδαιμία (7%)

5. Γαστρεντερικές: Ναυτία (5%), διάρροια (2%), γαστρεντερική αιμορραγία (2%)

6. Αιματολογικές: Λευκοπενία (3%), αναιμία (2%)

7. Νευρομυϊκές και σκελετικές: Πόνος στην πλάτη (5%)

8. Αναπνευστικές: Επίσταξη (6%), δύσπνοια (5%), βήχας (4%)

9. Υπερευαισθησία, συμπεριλαμβανομένου του αγγειοοιδήματος^[29].

2.4 Έκδοχα του φαρμάκου

Τα περισσότερα φαρμακευτικά προϊόντα που κυκλοφορούν σήμερα στην αγορά, αποτελούνται πέραν του δραστικού φαρμακευτικού συστατικού (Active Pharmaceutical Ingredient - API), και από φαρμακολογικά αδρανή συστατικά, τα έκδοχα. Αυτά μπορούν να επηρεάσουν ποικίλα χαρακτηριστικά του φαρμάκου, όπως η διαλυτότητα, η κατανομή και η βιοδιαθεσιμότητά του, με αποτέλεσμα η ακριβής και αξιόπιστη ποσοτικοποίησή τους να κρίνεται απαραίτητη για την επίτευξη της μέγιστης ποιότητας και ασφάλειας των φαρμάκων. Οι επιθυμητές ιδιότητες των εκδόχων σχετίζονται με τη μέγιστη σταθερότητα, λειτουργικότητα και αποδοτικότητά τους και την ελάχιστη αλληλεπίδρασή τους με το φαρμακευτικό προϊόν, όπως συνοψίζονται στην Εικόνα 2.5:



Εικόνα 2.6: Επιθυμητές ιδιότητες των εκδόχων ενός φαρμακευτικού προϊόντος

Συνήθως, προστίθενται μαζί με την δραστική ουσία, προκειμένου να:

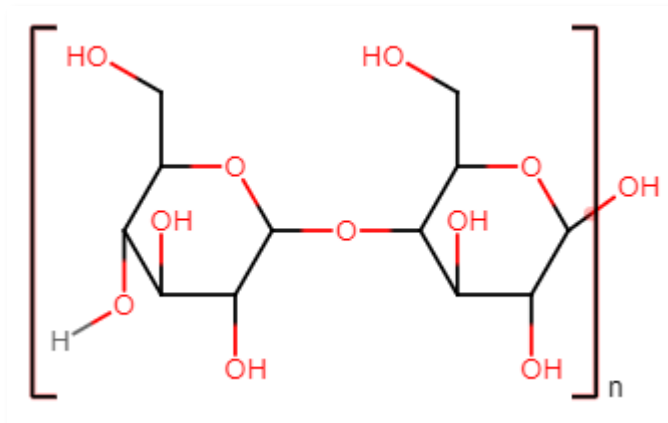
- Προστατεύσουν, υποστηρίξουν και ενισχύσουν τη σταθερότητα του φαρμακευτικού σκευάσματος. Έχει παρατηρηθεί ότι, οι περισσότερες δραστικές ουσίες, στη καθαρή τους μορφή, δε διατηρούν τη σταθερότητά τους για μεγάλο χρονικό διάστημα, με αποτέλεσμα να μετουσιώνονται και να αλλοιώνεται η σύνθεση του προϊόντος. Συνεπώς, κρίνεται απαραίτητη η προσθήκη εκδόχων που να ενισχύσουν αυτή τη σταθερότητα και να αυξάνουν με το τρόπο αυτό, το χρόνο ζωής του φαρμάκου.

- Βελτιώσουν τη βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το ακετυλοσαλικυλικό οξύ, η δραστική ουσία της ασπιρίνης, η οποία δεν απορροφάται εύκολα από το ανθρώπινο σώμα, με αποτέλεσμα να διαλύεται ή να αναμειγνύεται με έκδοχα που δρουν ως διαλύτες και ως εκ τούτου, αυξάνουν την απορρόφησή της.
- Συμβάλλουν στη συνολική ασφάλεια και αποτελεσματικότητα του σκεύασματος καθ'όλη τη διάρκεια της χρήσης και αποθήκευσής του^[3,30,31].

Ωστόσο, τα έκδοχα, αν και θεωρούνται φαρμακολογικά αδρανή, έχουν τη τάση να αλληλεπιδρούν με τα υπόλοιπα συστατικά του φαρμάκου, με άλλα έκδοχα ή ακόμη και με τη συσκευασία του φαρμάκου, επιφέροντας προσμίξεις που επιδρούν στην αποσύνθεση της δραστικής ουσίας. Οι κυριότερες αλληλεπιδράσεις εκδόχων - φαρμάκων, περιλαμβάνουν **φυσικές** (διαλυτότητα), **χημικές** (σχηματισμός ασταθών παραπροϊόντων) ή **βιοφαρμακευτικές** (μετά τη χορήγηση) μεταβολές. Όσον αφορά τις αλληλεπιδράσεις εκδόχων - εκδόχων, αν και παρατηρούνται πολύ σπάνια, είναι πρωταρχικής σημασίας για τον καθορισμό της σταθερότητας του φαρμακευτικού προϊόντος. Μπορεί να είναι, είτε ανεπιθύμητες, είτε ευεργετικές για τη βελτίωση της λειτουργίας και απόδοσης του φαρμάκου. Τέλος, η συσκευασία των φαρμακευτικών προϊόντων αποτελεί ζωτικό μέρος των σταδίων επεξεργασίας και η επιλογή της σχετίζεται με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του προϊόντος, τις προστατευτικές του ανάγκες και φυσικά, τις απαιτήσεις του marketing. Η συσκευασία που επιλέγεται πρέπει να είναι αδρανής και να προστατεύει το προϊόν από τις εξωτερικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Τα συνηθέστερα υλικά συσκευασίας που χρησιμοποιούνται είναι γυάλινα, πλαστικά ή μεταλλικά, τα οποία μπορεί να οδηγήσουν σε επιβλαβείς επιδράσεις, αλληλεπιδρώντας με τα έκδοχα, προκαλώντας μερική απώλεια της ποιότητας του φαρμάκου. Τέλος, τα έκδοχα μπορούν να ταξινομηθούν με βάση τη προέλευσή τους σε φυσικής, ζωϊκής ή συνθετικής προέλευσης και με βάση τη λειτουργικότητά τους σε αραιωτικές, χρωστικές ή αρωματικές ουσίες, ενώ μπορούν ακόμα να δράσουν και ως αποσαρθρωτικά, λιπαντικά, συντηρητικά, γλυκαντικά κλπ^[32,33].

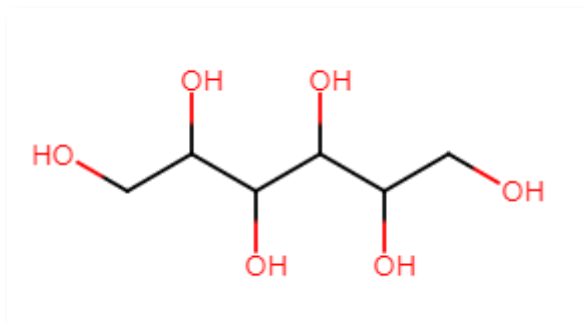
Στο συγκεκριμένο αντιθρομβωτικό φάρμακο, απαντώνται έκδοχα του πυρήνα, όπως η μικροκρυσταλλική κυτταρίνη, η μαννιτόλη (E421), η υπρομελλόζη (E464), το στεατικό μαγνήσιο και η κροσκαρμελλόζη.

Πιο συγκεκριμένα, η **μικροκρυσταλλική κυτταρίνη (Microcrystalline Cellulose - MCC)** είναι μερικώς αποπολυμερισμένη κυτταρίνη, αποτελούμενη από πορώδη σωματίδια και εμφανίζεται ως λευκό, άοσμο και άγευστο κρυσταλλικό στερεό. Χρησιμοποιείται συνηθέστερα στη βιομηχανία των καλλυντικών, ως λιπαντικός, απορροφητικός και αντιπηκτικός παράγοντας, ενώ στη φαρμακοβιομηχανία ως αραιωτικό - αποσαρθρωτικό μέσο σε δισκία και κάψουλες που χορηγούνται από το στόμα. Δεν απορροφάται πλήρως από τον ανθρώπινο οργανισμό, επομένως έχει έναν ελάχιστο τοξικό χαρακτήρα. Η δομή της, παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 2.7: Δομή της Μικροκρυσταλλικής Κυτταρίνης

Όσον αφορά τη **μαννιτόλη (Mannitol, E421)**, το συγκεκριμένο έκδοχο προέρχεται κυρίως από κωνοφόρα δέντρα, φύκη και μανιτάρια και χρησιμοποιείται ως γλυκαντική ουσία και ως συστατικό διόγκωσης. Απορροφάται σε μεγάλο ποσοστό, μεταβολίζεται σε φρουκτόζη από τον ανθρώπινο οργανισμό, ενώ ένα μέρος της υφίσταται ζύμωση στο παχύ έντερο. Η ποσότητα της μαννιτόλης που χρησιμοποιείται ως έκδοχο, είναι συνήθως μικρή, με αποτέλεσμα να σχετίζεται με μικρότερη συχνότητα εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών και αλλεργικών αντιδράσεων. Διαθέτει την ακόλουθη χαρακτηριστική δομή:



Εικόνα 2.8: Δομή της Μαννιτόλης

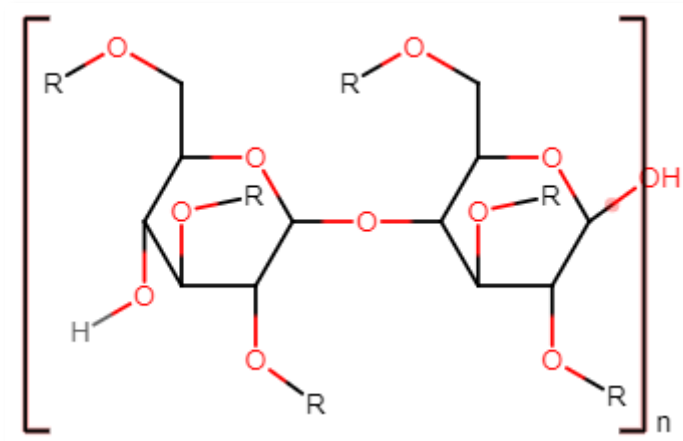
Δεν θεωρείται ότι η κατανάλωσή της συνιστά κίνδυνο για την υγεία, ωστόσο ενδεικτικά αναφέρεται η θανατηφόρος δόση του 50% του πληθυσμού ποντικών ή αρουραίων (**LD50**), είναι:

LD50 (ποντίκια, στοματική χορήγηση): 22 g / kg

LD50 (αρουραίοι, στοματική χορήγηση): 13,5 g / kg

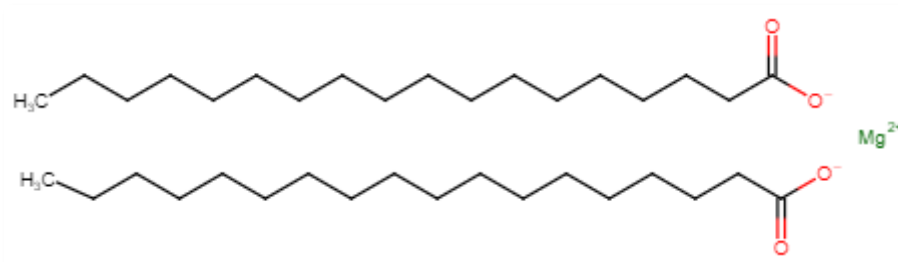
Η **υπρομελλόζη (Hypromellose)** χρησιμοποιείται ευρέως σε στοματικά, οφθαλμικά και ρινικά φαρμακευτικά σκευάσματα, σε καλλυντικά αλλά και σε προϊόντα διατροφής. Δρα

κυρίως ως γαλακτωματοποιητής, παράγοντας εναιώρησης και σταθεροποίησης και διατίθεται στο εμπόριο σε διάφορους τύπους που διακρίνονται από το ιξώδες και την έκταση της υποκατάστασης που υφίστανται. Περιέχει μεθόξυ και υδροξυπροπόξυ ομάδες, με μοριακό βάρος από 10.000 έως 1.500.000 Da. Σε σύγκριση με τη μεθυλοκυτταρίνη, η υπομελλόζη παράγει υδατικά διαλύματα μεγαλύτερης διαύγειας, με λιγότερες αδιάλυτες ίνες και ως εκ τούτου προτιμάται σε σκευάσματα οφθαλμικής χρήσεως. Στη δομή της εντοπίζονται τόσο οι μεθόξυ, όσο και οι υδροξυπροπόξυ ομάδες που αναφέρθηκαν προηγουμένως:



Εικόνα 2.9: Δομή της Υπομελλόζης, όπου R: CH₃ ή CH₃CH(OH)CH₂

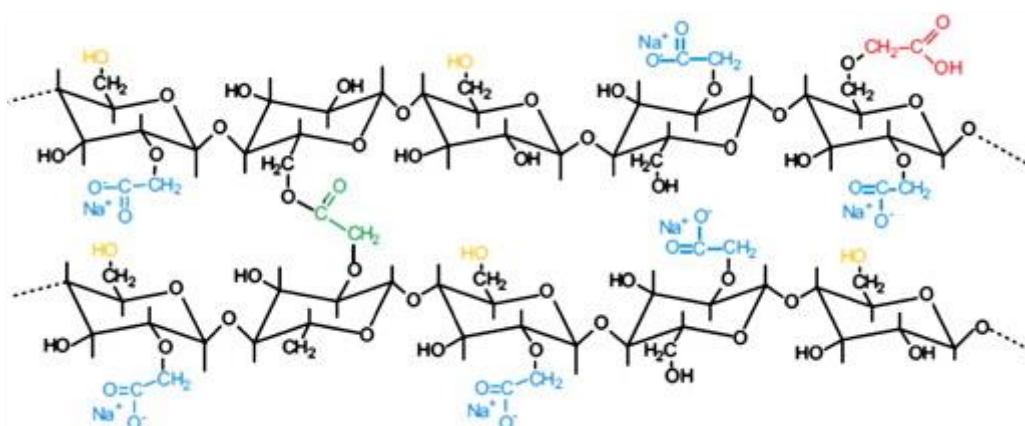
Το **στεατικό μαγνήσιο (Magnesium Stearate)**, ή αλλιώς μετά μαγνησίου άλας του στεατικού οξέος, είναι μια λευκή σκόνη υψηλής ποιότητας και καθαρότητας, που χρησιμοποιείται συνήθως σε φαρμακευτικά προϊόντα, τρόφιμα ή καλλυντικά (πούδρα μωρών) ως παράγοντας αντι-συσσωμάτωσης και γαλακτωματοποιητής. Δεν έχουν αναφερθεί σοβαρές ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις κατά τη χρήση του, ωστόσο σύμφωνα με μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, το στεατικό οξύ στο οποίο μετατρέπεται το στεατικό μαγνήσιο, μπορεί να προκαλέσει καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα να εμποδίζει τη λειτουργία των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, ανάλογα βέβαια με την ποσότητα που εισέρχεται στον οργανισμό και το χρονικό διάστημα που λαμβάνεται. Η δομή του περιγράφεται ως εξής:



Εικόνα 2.10: Δομή του Στεατικού Μαγνησίου

Τέλος, η **κροσκαρμελλόζη (Croscarmellose Sodium)**, αποτελεί ένα από τα πιο εύχρηστα

έκδοχα λόγω των πολλών πλεονεκτημάτων που προσφέρει. Η σταυροσύνδεση που παρατηρείται στη δομή της, επιτρέπει στο υλικό να διογκώνεται (σαν σφουγγάρι) και να απορροφά μεγαλύτερες ποσότητες νερού, με αποτέλεσμα να παρέχει εξαιρετικά χαρακτηριστικά διαλυτοποίησης και αποσύνθεσης του φαρμάκου, βελτιώνοντας παράλληλα τη βιοδιαθεσιμότητά του. Είναι η λύση στις ανησυχίες των παρασκευαστών σχετικά με τη μακροπρόθεσμη λειτουργική σταθερότητα και τη μειωμένη αποτελεσματικότητα σε υψηλά επίπεδα σκληρότητας των σκευασμάτων. Το βασικότερο πλεονέκτημα, ωστόσο, στα περισσότερα φαρμακευτικά προϊόντα που χρησιμοποιείται, είναι η άμεση αποσύνθεση του φαρμάκου στον γαστρεντερικό σωλήνα, εκμηδενίζοντας τις ανεπιθύμητες παρενέργειες που συνεπάγεται η αργή έως καθόλου αποσύνθεσή τους^[34]. Διαθέτει την ακόλουθη δομή:



Εικόνα 2.11: Δομή της Κροσκαρμελλόζης

2.5 Αναλυτικές τεχνικές προσδιορισμού των εκδόχων^[35]

Η ποιότητα, η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα ενός φαρμακευτικού προϊόντος, όπως η **Πρασουγγέλη**, επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την παρουσία των εκδόχων. Οι αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και ακριβή ποσοτικοποίηση τους αποτελούν καθοριστικότερο παράγοντα στον τομέα της φαρμακευτικής ανάλυσης. Το κυριότερο κριτήριο της επιλεγμένης αναλυτικής μεθοδολογίας, είναι η δυνατότητα διαφοροποίησης των εκδόχων-ενδιαφέροντος, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιούνται συνήθως αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού και ταυτοποίησης των εκδόχων, τόσο ξεχωριστά όσο και σε συνδυασμό. Η χρησιμοποιούμενη τεχνική εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη φύση του φαρμακευτικού σκευάσματος και την πολυπλοκότητα του διαχωρισμού και πρέπει να προκαλεί διάλυση όλων των εκδόχων και να επιτρέπει την ακριβή ποσοτικοποίησή τους.

2.5.1 Τεχνικές διαχωρισμού

Οι κυριότερες τεχνικές διαχωρισμού των εκδόχων που χρησιμοποιούνται ευρέως, περιλαμβάνουν την χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC), την

αεριοχρωματογραφία (GC), την χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) και την χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού (SFC). Ωστόσο, η **υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)** είναι η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη τεχνική για τον διαχωρισμό των εκδόχων λόγω της ευελιξίας της, ενώ η διαθεσιμότητα διαφορετικών στηλών όπως η κανονική φάση, η αντίστροφη φάση με διαφορετικό μήκος, διάμετρο και μέγεθος σωματιδίων εξασφαλίζει την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό ιχνών ποσοτήτων εκδόχων. Οι κυριότεροι ανιχνευτές της τεχνικής αυτής είναι οι ανιχνευτές απορρόφησης υπεριώδους ακτινοβολίας, και αυτό γιατί η πλειοψηφία των φαρμακευτικών προϊόντων εμφανίζουν απορρόφηση στο UV. Με την πρόοδο της τεχνολογίας των ανιχνευτών, επεκτάθηκε η χρήση των ανιχνευτών συστοιχίας φωτοδιόδων (PDA), οι οποίοι παρέχουν τα φάσματα υπεριώδους ακτινοβολίας της κορυφής έκλυσης ενώ μπορούν να λειτουργήσουν, είτε σε ένα είτε σε πολλαπλά μήκη κύματος, όπως θα περιγραφεί αναλυτικά σε επόμενο κεφάλαιο.

2.5.2 Τεχνικές ταυτοποίησης

Οι κυριότερες φασματοσκοπικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό των εκδόχων που περιέχονται στα τελικά φαρμακευτικά σκευάσματα, είναι: α) η Φασματοσκοπία υπερύθρου (IR), β) η Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και γ) η **Φασματομετρία μάζας (MS)**.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)

3.1 Εισαγωγή - Ιστορική Αναδρομή^[36,37]

Η σύγχρονη υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (**High Performance Liquid Chromatography - HPLC**), έχει τις ρίζες της σε μια συγκεκριμένη μορφή διαχωρισμού, που μπορεί να θεωρηθεί ως η πρώτη μορφή υγροχρωματογραφίας. Στις αρχές του εικοστού αιώνα χρησιμοποιήθηκε, λοιπόν, για πρώτη φορά μια αναλυτική τεχνική ως μέθοδος διαχωρισμού χρωματισμένων ενώσεων, από την οποία προέκυψε το όνομα **χρωματογραφία**. Ένας Ρώσος βοτανολόγος με το όνομα Mikhail S. Tswett, χρησιμοποίησε μια στοιχειώδη μορφή χρωματογραφικού διαχωρισμού για να καθαρίσει ένα μίγμα φυτικών χρωστικών ουσιών στα καθαρά συστατικά του. Διαχώρισε τις χρωστικές αυτές με βάση την αλληλεπίδρασή τους με μια στατική φάση, που είναι απαραίτητη για κάθε χρωματογραφικό διαχωρισμό. Η στατική φάση που χρησιμοποίησε ήταν κονιοποιημένη κιμωλία και αλουμίνα, ενώ η κινητή φάση ήταν ένας διαλύτης. Αφού η στερεά στατική φάση συσκευάσθηκε σε μια γυάλινη στήλη (ουσιαστικά ένα μακρύ κοίλο γυάλινο σωλήνα), έχυσε το μίγμα φυτικών χρωστικών ουσιών αλλά και το διαλύτη στην κορυφή της στήλης. Στη συνέχεια, εισήγαγε επιπλέον διαλύτη εντός της στήλης, μέχρις ότου οι φυτικές χρωστικές εκλουσθούν στο κάτω μέρος της στήλης. Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας, το πιο σημαντικό για την έρευνά του, ήταν ότι οι χρωστικές των φυτών διαχωρίστηκαν σε ζώνες καθαρών συστατικών καθώς περνούσαν από τη στατική φάση.

Κατά τη δεκαετία του 1970, εμφανίστηκαν οι πρώτες εμπορικά διαθέσιμες χρωματογραφικές συσκευές. Η χρωματογραφία ανοιχτής στήλης, η χρωματογραφία χάρτου και η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας ήταν οι πρώτες χρωματογραφικές τεχνικές, επιτυγχάνοντας αρχικά ένα σημαντικότατο αριθμό χρωματογραφικών διαχωρισμών. Παρά την καταλυτική τους συνεισφορά για τους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς, οι τεχνικές αυτές εμφάνιζαν σημαντικά μειονεκτήματα, με βασικότερο το γεγονός ότι ήταν ανεπαρκείς για τον προσδιορισμό κάποιων ενώσεων και για το διαχωρισμό παρόμοιων συστατικών.

Τα γεγονότα αυτά συνετέλεσαν στην επέκταση της χρήσης της υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (πίεσης) με την οποία επιτυγχάνονταν μικρότεροι χρόνοι ανάλυσης αν και παρέμεναν οι αμφιβολίες σχετικά με τη χρησιμοποίηση σταθερής ροής ή σταθερής πίεσης^[38].

3.2. Αρχή της υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης^[39,40]

Τα συστατικά του μίγματος, στην υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης, διαχωρίζονται

μέσω της διασποράς τους μεταξύ δύο φάσεων, μιας στατικής και μιας κινητής (φέρουσας) που βρίσκονται μέσα στη χρωματογραφική στήλη. Η αρχή της τεχνικής αυτής, είναι παρόμοια με αυτή της εκχύλισης και της κλασματικής απόσταξης. Ουσίες που συγκρατούνται περισσότερο στη κινητή φάση, διαχωρίζονται διαδοχικά από άλλες που συγκρατούνται στη στατική φάση.

Ο διαχωρισμός βασίζεται στις διαφορές των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των συστατικών ενός μίγματος, όπως είναι η πολικότητα και το μέγεθος των μορίων, αλλά και 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. Η κινητή φάση, καθώς διέρχεται μέσα από τη χρωματογραφική στήλη προκαλεί διαφορετική μετατόπιση των συστατικών του μίγματος επάνω στην στατική φάση, με αποτέλεσμα το διαχωρισμό των συστατικών και την έκλουσή τους από τη στήλη σε διαφορετικούς χρόνους. Οι δύο φάσεις επιλέγονται έτσι, ώστε τα συστατικά του δείγματος να κατανέμονται σε διαφορετικό βαθμό μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης. Η ταχύτητα με την οποία θα μεταφερθεί η κάθε ουσία κατά μήκος της στήλης, είναι ανάλογη της σχετικής συγγένειας της ουσίας προς τις δύο φάσεις. Τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση εκλούνται αργότερα, ενώ εκείνα τα οποία κατακρατούνται ασθενέστερα εκλούνται ταχύτερα.

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 χρειάζονται μεγάλες πιέσεις για να αποδώσουν την επιθυμητή ταχύτητα ροής. Για τον λόγο αυτό, στα σύγχρονα όργανα χρησιμοποιούνται αντλίες υψηλής πίεσης και βελτιωμένα συστήματα συνεχούς παροχής διαλύτη, ενώ 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 στέλνει το αντίστοιχο ηλεκτρικό σήμα σε έναν υπολογιστή. Η κινητή φάση τέλος, εξέρχεται από τον ανιχνευτή και συλλέγεται ή αποστέλλεται στα απόβλητα^[41].

Η υδροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης είναι σήμερα, ένα από σημαντικότερα εργαλεία της αναλυτικής χημείας. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ποικίλα είδη δειγμάτων, όπως φαρμακευτικά προϊόντα, καλλυντικά, περιβαλλοντικά και ιατροδικαστικά δείγματα, βιομηχανικά χημικά προϊόντα και πετρελαϊκά μίγματα. Μέσω της τεχνικής αυτής, είναι δυνατός ο διαχωρισμός, η ανίχνευση, αλλά και ο ποσοτικός προσδιορισμός των **εκδόχων** που περιέχονται σε ένα φαρμακευτικό προϊόν. Είναι γεγονός ότι ενώσεις σε ίχνη, με συγκεντρώσεις εξαιρετικά χαμηλές, μπορούν εύκολα να προσδιοριστούν.

διαχωρισμού.

Επιλογή κινητής φάσης

Η εύρεση της καταλληλότερης κινητής φάσης αποτελεί τη σημαντικότερη παράμετρο στην ανάπτυξη των αναλυτικών μεθόδων. Η επιλογή γίνεται με κριτήριο τον επιτυχή διαχωρισμό των συστατικών του μίγματος σε εύλογο χρονικό διάστημα. Η βελτιστοποίηση της σύστασης της κινητής φάσης αποτελεί επίπονη και χρονοβόρα διαδικασία. Οι παράμετροι που εξετάζονται συνήθως είναι η πολικότητα, η εκλουστική ισχύς, η τοξικότητα καθώς και η συμβατότητα με τον χρησιμοποιούμενο ανιχνευτή.

1. Πολικότητα. Η πολικότητα ενός διαλύτη σε συνδυασμό με τη πολικότητα των υπό διαχωρισμό ουσιών, καθορίζει τον χρόνο συγκράτησής τους στην επιφάνεια της στήλης. Όσο πιο πολικός είναι ένας διαλύτης, τόσο πιο γρήγορα εκλούνται οι πολικές ενώσεις και τόσο πιο αργά οι μη πολικές.



Εικόνα 3.2: Πολικότητα των συνηθέστερα, χρησιμοποιούμενων διαλυτών

2. Εκλουστική ισχύς, E. Είναι μια παράμετρος που σχετίζεται με τη πολικότητα των διαφόρων διαλυτών και καθορίζεται από τη στατική φάση που χρησιμοποιείται. Τη μικρότερη εκλουστική ισχύ στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης την έχει το νερό (H₂O), που είναι ο διαλύτης με τη μεγαλύτερη πολικότητα, ενώ έχει τη μεγαλύτερη εκλουστική ισχύ στη χρωματογραφία κανονικής φάσης. Το αντίστροφο συμβαίνει με το εξάνιο, που είναι ο διαλύτης με τη μικρότερη πολικότητα.

3. Τοξικότητα. Αποφεύγονται διαλύτες με τοξικές και ερεθιστικές ιδιότητες.

4. Συμβατότητα με τον χρησιμοποιούμενο ανιχνευτή. Όταν χρησιμοποιείται ο φασματοφωτομετρικός ανιχνευτής UV-Vis, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα κατώτερα όρια απορρόφησης (cut off) των διαφόρων διαλυτών στο υπεριώδες. Ιδιαίτερη προσοχή στην επιλογή της κινητής φάσης/διαλυτών πρέπει να δίνεται στη περίπτωση που ο ανιχνευτής είναι ένα φασματοφωτόμετρο μαζών. Είναι ευρέως γνωστό ότι υπάρχει περιορισμένος αριθμός κινητών φάσεων κατάλληλων για ανάλυση LC-MS, επειδή οι ενώσεις πρέπει να ιοντίζονται για να ανιχνεύονται.

Σύστημα απαέρωσης διαλυτών: Το σύστημα αυτό, χρησιμοποιείται για να απομακρύνει τον διαλυμένο αέρα που βρίσκεται στη κινητή φάση. Κατά την εφαρμογή υψηλής πίεσης, δημιουργούνται συνήθως φυσαλίδες όταν υπάρχει διαλυμένος αέρας στη κινητή φάση, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν αστάθεια στη πίεση του συστήματος,

ανομοιογένεια στη ταχύτητα ροής της κινητής φάσης και αύξηση του θορύβου της γραμμής βάσης, με αποτέλεσμα τη μείωση της ευαισθησίας του οργάνου.

Σύστημα ανάμιξης διαλυτών: Με το σύστημα αυτό, ελέγχεται και πραγματοποιείται η ανάμιξη των διαλυτών, σε προγράμματα τόσο ισοκρατικής, όσο και βαθμιδωτής έκλουσης.

Σύστημα άντλησης - αντλία: Αποτελεί το μέσο προώθησης της κινητής φάσης, αναγκάζοντάς τη να διέλθει από τη στήλη κάτω από συνθήκες υψηλής πίεσης. Οι αντλίες πρέπει να είναι ικανές να λαμβάνουν ακριβή όγκο διαλύτη, με επαναλαμβανόμενη σταθερή ταχύτητα ροής και πίεσης. Οι ταχύτητες ροής που μπορούν να επιτευχθούν χρησιμοποιώντας τέτοιου είδους αντλίες είναι 0.01 - 10 mL/min, ενώ μπορούν να λειτουργήσουν σε πιέσεις 5-40 MPa. Πρέπει ακόμη, να είναι κατασκευασμένες από αδρανές υλικό ως προς όλα τα είδη των διαλυτών που θα χρησιμοποιηθούν και να μπορεί να παρέχει σταθερή ροή με ακρίβεια και χωρίς διακυμάνσεις, ώστε να μην συνεισφέρει στο θόρυβο του ανιχνευτή. Επειδή κατά τη λειτουργία της αντλίας δημιουργούνται παλμοί ροής που διαταράσσουν τη σταθερότητα του χρωματογραφήματος, συνήθως παρεμβάλλεται μία συσκευή αποσβέσεως των παλμών για την εξομάλυνση του χρωματογραφήματος. Τέλος, υπάρχουν τόσο δυαδικές αντλίες (binary pump) που προσφέρουν ακρίβεια στη προεπιλεγμένη ροή της κινητής φάσης, όσο και τετραεδρικές αντλίες (quaternary pump) που προσφέρουν αξιοπιστία στο επιλεγμένο ποσοστό κάθε κινητής φάσης^[44].

Δειγματολήπτης: Συχνά, ο περιοριστικός παράγοντας στην επαναληψιμότητα των μετρήσεων στην HPLC, είναι ο τρόπος εισαγωγής των δειγμάτων στη στήλη. Το πρόβλημα επιδεινώνεται με τη διεύρυνση των κορυφών, που προκαλεί η υπερφόρτωση των στηλών. Συνεπώς, οι όγκοι πρέπει να είναι οι ελάχιστοι δυνατοί, από μερικές δεκάδες μL έως 500 μL . Επιπλέον, είναι σημαντικό να εισάγεται το δείγμα χωρίς να προκαλείται αποσυμπίεση του συστήματος. Η μονάδα εισαγωγής του δείγματος παρεμβάλλεται μεταξύ της αντλίας και της χρωματογραφικής στήλης και πρέπει να εξασφαλίζει την εισαγωγή του χωρίς αραίωση, ενώ ταυτόχρονα ο διαχωρισμός να επιτυγχάνεται χωρίς διάχυση. Η εισαγωγή του δείγματος, μπορεί να επιτευχθεί:

- α. με μικροσύριγγα
- β. με ειδική βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος και
- γ. με αυτόματο δειγματολήπτη.

Οι αυτόματοι δειγματολήπτες αποτελούνται από ένα περιστρεφόμενο δίσκο όπου τοποθετούνται τα δείγματα, τα φιαλίδια με τα δείγματα, τη βαλβίδα εισαγωγής, το βρόχο δείγματος και τη σύριγγα. Όταν το δείγμα εισάγεται, ο δίσκος περιστρέφεται μέχρι το



προγραμματισμένο φιαλίδιο να βρεθεί κάτω από τη μικροσύριγγα. Η τελευταία λαμβάνει μια ορισμένη ποσότητα δείγματος που στη συνέχεια διοχετεύεται στο βρόχο της βαλβίδας^[45,46].

Αναλυτική στήλη: Αποτελεί το σημαντικότερο τμήμα ενός συστήματος HPLC, αφού μέσα σε αυτή πραγματοποιείται ο χρωματογραφικός διαχωρισμός. Το είδος της στατικής φάσης ανήκει στους χημικούς παράγοντες που επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την εκλεκτικότητα και το βαθμό διαχωρισμού της αναλυτικής πορείας.

Εικόνα 3.3: Αναλυτική στήλη χρωματογραφικών διαχωρισμών

Επιλογή στατικής φάσης - στήλης

Η επιλογή της στατικής φάσης και της αναλυτικής στήλης είναι εξίσου σημαντικές παράμετροι για την ανάπτυξη της αναλυτικής μεθόδου και καθορίζονται από τις επιμέρους ιδιότητες:

- α. Το μέγεθος των σωματιδίων του υλικού πληρώσεως (υποσφαιρίδια) και τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της στήλης
- β. Τη φύση της ομάδας που είναι δεσμευμένη στο υπόστρωμα, η οποία καθορίζει και την εκλεκτικότητα της στατικής φάσης
- γ. Τη χημική αδράνεια του υποστρώματος και
- δ. Την περιεκτικότητα της στήλης σε ελεύθερα σιλανολικά υδροξύλια. Όσο μεγαλύτερο

είναι το ποσοστό τους, τόσο πιο πολική (όξινη) είναι η στήλη και τόσο ασθενέστερη είναι η συγκράτηση των μη πολικών ενώσεων.

Βασικά κριτήρια επιλογής αναλυτικής στήλης

Τα κυριότερα κριτήρια επιλογής αναλυτικής στήλης είναι:

1. Γεωμετρικά χαρακτηριστικά στήλης. Σε αυτά συγκαταλέγονται:

- Το μήκος της στήλης. Αύξηση του μήκους της στήλης συνεπάγεται αύξηση του χρόνου ανάλυσης, αλλά και καλύτερο διαχωρισμό.
- Η εσωτερική διάμετρος. Η εσωτερική διάμετρος της στήλης επιλέγεται τυπικά, ανάλογα με τις αναλυτικές απαιτήσεις και τους περιορισμούς του συστήματος. Καθορίζει την ταχύτητα της ανάλυσης και επηρεάζει την ευαισθησία της μεθόδου. Η πλέον χρησιμοποιούμενη διάμετρος είναι τα 4.6 mm για παραδοσιακά συστήματα HPLC, ενώ για UPLC συστήματα χρησιμοποιούνται στήλες μικρότερης διαμέτρου.
- Το μέγεθος των σωματιδίων. Τα μικρότερα μεγέθη σωματιδίων προσφέρουν μεγαλύτερη απόδοση. Ωστόσο, αυτό συμβαίνει συνήθως σε βάρος της αύξησης της οπισθοπίεσης του συστήματος, εκτός εάν η παροχή ρυθμίζεται προς τα κάτω. Τα ευρέως χρησιμοποιούμενα σωματίδια έχουν διάμετρο 5 μm και παρέχουν αποτελεσματική απόδοση όταν χρησιμοποιούνται με παραδοσιακά συστήματα HPLC. Σε UPLC συστήματα είναι δυνατή η χρήση στηλών με μικρότερο μέγεθος σωματιδίων.
- Το μέγεθος των πόρων. Το χαρακτηριστικό αυτό, περιγράφει τη μέση διάμετρο των πόρων στην επιφάνεια του υλικού πλήρωσης. Χρησιμοποιούνται πόροι 6-12 nm για αναλύτες κάτω από 2000 Da και πόροι 30 nm για αναλύτες άνω των 4000 Da.

2. Η τιμή logP και logD. Μια βασική παράμετρος που χαρακτηρίζει συχνά μια χημική ουσία είναι η τιμή logP. Η τιμή αυτή περιγράφει πόσο υδρόφοβη είναι μια ένωση, με θετικές τιμές να υποδεικνύουν ότι το μόριο είναι υδρόφοβο και αρνητικές τιμές να υποδεικνύουν ότι είναι υδρόφιλο. Ο ορισμός του logP, ισχύει μόνο για τις ουδέτερες μορφές ενός μορίου, εντούτοις πολλές ενώσεις έχουν όξινες ιδιότητες (δότες πρωτονίων) ή βασικές (δέκτες πρωτονίων) και έτσι η λογαριθμική κατανομή του D, logD, φαίνεται να είναι καλύτερη για το χαρακτηρισμό της υδροφοβικότητας.

3. Η φύση της ομάδας που είναι συνδεδεμένη στο αδρανές υπόστρωμα. Αυτή μπορεί να είναι, μεταξύ άλλων:

- Πηκτής πυριτίας με υποκατεστημένες υδρογονανθρακικές αλυσίδες. Αποτελεί τη συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη στατική φάση, με άμεση εφαρμογή στις περισσότερες αναλυτικές μεθόδους φαρμακευτικών σκευασμάτων. Οι πρώτες στατικές φάσεις τέτοιου είδους που αναπτύχθηκαν, παρουσίασαν προβλήματα κατά την ανάλυση ισχυρά βασικών ενώσεων λόγω της ατελούς επικάλυψης των ομάδων σιλανόλης (Si-OH). Αυτό το φαινόμενο, είναι περισσότερο έντονο όταν η στατική φάση χρησιμοποιείται σε ενδιάμεσες τιμές pH 4-8, όπου οι ελεύθερες σιλανόλες και πολλές βασικές ενώσεις ιοντίζονται προκαλώντας μεγάλη επιφανειακή οξυγύτητα και δίνοντας κορυφές με ουρά.

Μεταγενέστερα, δημιουργήθηκαν οι στήλες τύπου Β (Base Deactivated Silica - BDS) με λιγότερες όξινες επιφάνειες και μια πιο ομοιογενή κατανομή των ομάδων σιλανόλης και πυκνότερη σύνδεση των αλυσίδων αλκυλίου. Οι περισσότερες στήλες με βάση το διοξείδιο του πυριτίου είναι κατασκευασμένες, σήμερα, με υλικά βάσης τύπου Β και οι πιο δημοφιλείς φάσεις αυτών, βασίζονται σε χημικές διεργασίες C₈ και C₁₈ αλκυλοσιλανών (Octadecyl Deactivated Silica - ODS). Όταν διαχωρίζονται βασικές ενώσεις, οι βασικές ενεργοποιημένες στατικές φάσεις είναι εξαιρετικά δημοφιλείς και πολλές από αυτές είναι διαθέσιμες στην αγορά.

- Πηκτή πυριτίας με φαινυλιωμένα σιλοξάνια. Αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για ελαφρώς εκλεκτικότερες αναλύσεις ενώσεων που φέρουν μεγάλο αριθμό αρωματικών δακτυλίων, όπως η προπανολόνη και το ναπροξένιο, όπου μπορούν να εμφανιστούν μερικές πρόσθετες αλληλεπιδράσεις με τις φαινυλομάδες της στατικής φάσης. Όμως, αυτές οι αλληλεπιδράσεις είναι σχεδόν ανίσχυρες.
- Πηκτή πυριτίας με φθοριωμένα και κυανιούχα σιλοξάνια. Οι κυανικές και φθοριωμένες στατικές φάσεις αλληλεπιδρούν έντονα με βασικά, αζωτούχα και αλογωνομένα μόρια^[47,48].

7. Ανιχνευτής: Πρόκειται για ένα από τα κρισιμότερα τμήματα στην HPLC. Παράγει ένα ενισχυμένο ηλεκτρικό σήμα, ανάλογο της ποσότητας-συγκέντρωσης της ουσίας που εκλούεται, κάνοντας ορατό το διαχωρισμό που γίνεται στη στήλη και επιτρέποντας την αξιοποίηση αυτού του σήματος στην ανάλυση. Είναι συνδεδεμένος στην έξοδο της χρωματογραφικής στήλης και πρέπει να είναι ικανός να αναγνωρίζει τον αναλύτη-ενδιαφέροντος τη στιγμή που εκλούεται από τη στήλη. Ένας ιδανικός ανιχνευτής πρέπει να έχει τις ακόλουθες ιδιότητες:

1. Να επιτρέπει χαμηλά όρια ανίχνευσης στην περιοχή των ng-μg, να έχει ικανοποιητική ευαισθησία και χαμηλό θόρυβο.
2. Να χαρακτηρίζεται από σταθερότητα και αναπαραγωγικότητα.
3. Να παρέχει γραμμική απόκριση στην περιοχή συγκεντρώσεων των αναλυτών, ώστε να είναι εφικτή η χρησιμοποίησή του στην ποσοτική ανάλυση.
4. Να έχει μεγάλο εύρος θερμοκρασιών λειτουργίας.
5. Να σχετίζεται με σύντομους χρόνους απόκρισης ανεξάρτητους από την ταχύτητα ροής της κινητής φάσης.
6. Να μην αποκρίνεται στην κινητή φάση
7. Να αποκρίνεται σε όλους τους αναλύτες (γενικός ανιχνευτής) ή η εκλεκτικότητα απόκρισής του να είναι γνωστή (ειδικός ανιχνευτής).

8. Να μην προκαλεί καταστροφή του δείγματος.

9. Να έχει αμελητέο νεκρό όγκο, ώστε να μη συμμετέχει στη διεύρυνση ζώνης κάθε αναλύτη και κατά συνέπεια της κορυφής του.

10. Να χαρακτηρίζεται από εξαιρετική αξιοπιστία και ευκολία στη χρήση.

Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές στον τομέα της φαρμακευτικής ανάλυσης, είναι ο **ανιχνευτής υπεριώδους - ορατού (UV-Vis)** και ο **ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων (Photodiode Array Detector - PDA)**, που καλύπτουν σχεδόν το 70 % των εφαρμογών. Ωστόσο, διαθέσιμοι ανιχνευτές είναι και ο ανιχνευτής φθορισμού, ο ηλεκτροχημικός ανιχνευτής, ο ανιχνευτής δείκτη διάθλασης, ο ανιχνευτής σκέδασης ακτινοβολίας κλπ.

Ανιχνευτής υπεριώδους - ορατού

Πρόκειται για ένα φασματοφωτόμετρο, του οποίου η ένδειξη σχετίζεται με την απορρόφηση του αναλύτη - ενδιαφέροντος. Διαθέτουν εξαιρετικά καλή ευαισθησία και επιτρέπουν την ανίχνευση πολύ μικρών ποσοτήτων αναλυτών, της τάξης των ng. Χρησιμοποιούνται τόσο ανιχνευτές σταθερού μήκους κύματος, όσο και ανιχνευτές μεταβαλλόμενου μήκους κύματος.

Ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων

Πρόκειται για έναν προηγμένο τύπο ανιχνευτή UV με τη δυνατότητα να παρακολουθεί ταυτόχρονα όλο το εύρος της περιοχής, χρησιμοποιώντας μια σειρά φωτοδιόδων. Είναι ο συνηθέστερα χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής κατά την ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου, προσφέροντας τη δυνατότητα εξέτασης της απορρόφησης των ουσιών σε ένα ή περισσότερα μήκη κύματος.

Έχει ως ιδιαίτερο χαρακτηριστικό την ικανότητά να εκτελεί φασματοσκοπικές σαρώσεις και ακριβείς αναγνώσεις απορρόφησης σε μια σειρά από μήκη κύματος ταυτόχρονα. Ο ανιχνευτής μετρά την ένταση του φωτός που προσπίπτει στις φωτοδιόδους, και υπολογίζει την απορρόφηση του δείγματος μέσα στην κυψελίδα ροής. Το φως προσπίπτει αρχικά σε ένα φράγμα περίθλασης, το οποίο χωρίζει και διαθλά το φως σε δέσμες διαφόρων μηκών κύματος που ταξιδεύουν σε διαφορετικές κατευθύνσεις. Η συστοιχία αποτελείται από 512 φωτοδιόδους, που η κάθε μία λειτουργεί ως πυκνωτής και αρχικά περιέχει μια συγκεκριμένη ποσότητα ηλεκτρικού φορτίου. Το φως κάθε διαφορετικού μήκους κύματος προσπίπτει στις φωτοδιόδους και αποφορτίζει το ηλεκτρικό φορτίο, ενώ το μέγεθος της αποφόρτισης είναι ανάλογο της ποσότητας του φωτός που προσπίπτει. Ο ανιχνευτής μετρά την ποσότητα ηλεκτρικού φορτίου που χρειάζεται για να ξαναφορτίσει την φωτοδίοδο, και υπολογίζεται η απορρόφηση του φωτός, σε όλα τα μήκη κύματος ταυτόχρονα^[49].

8. Καταγραφέας – σύστημα επεξεργασίας δεδομένων, με το οποίο καταγράφεται,

αποθηκεύεται, επεξεργάζεται και ύστερα ποσοτικοποιείται το σήμα που λαμβάνεται από τον ανιχνευτή. Τα σύγχρονα συστήματα διαθέτουν ηλεκτρονικούς υπολογιστές για την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων.

Όλα τα παραπάνω τμήματα, συνδέονται μεταξύ τους με σωληνώσεις και διάφορα εξαρτήματα, ώστε να διέρχεται η κινητή φάση και το δείγμα μέσω του χρωματογράφου. Επίσης, ορισμένοι χρωματογράφοι διαθέτουν και φούρνο για τον έλεγχο της θερμοκρασίας της στήλης και αυτόματο δειγματολήπτη (ψυχόμενο ή μη).

3.4 Βελτιστοποίηση διαχωρισμών

Κατά την ανάπτυξη μιας νέας αναλυτικής μεθόδου ή την προσαρμογή μιας ήδη υπάρχουσας σε άλλα φαρμακευτικά σκευάσματα απαιτείται βελτιστοποίηση, δηλαδή εύρεση των τιμών των πειραματικών παραμέτρων της μεθόδου που δίνουν τα καλύτερα αποτελέσματα. Μια αναλυτική τεχνική, επηρεάζεται από πλήθος αριθμήσιμων παραμέτρων. Οι μέθοδοι βελτιστοποίησης, λοιπόν, παρέχουν τη δυνατότητα να εντοπισθούν οι τιμές αυτές που παρέχουν τη βέλτιστη απόκριση.

Οι κυριότερες τεχνικές βελτιστοποίησης είναι:

1. Διαδοχική μεταβολή ενός παράγοντα. Όλες οι παράμετροι εκτός από μία, διατηρούνται σταθερές και μέσω πειραμάτων προσδιορίζεται η βέλτιστη τιμή της. Στη συνέχεια, μεταβάλλεται η επόμενη παράμετρος κατά αντίστοιχο τρόπο, χρησιμοποιώντας τη βέλτιστη τιμή της προηγούμενης. Το βασικότερο μειονέκτημα ωστόσο, της συγκεκριμένης τεχνικής, είναι ότι δεν λαμβάνονται υπόψη οι τυχόν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραμέτρων.

2. Μέθοδος Simplex. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει α) την ταυτόχρονη μεταβολή των τιμών όλων των παραμέτρων, αυξάνοντας την αποτελεσματικότητά της, β) τη ταχεία εύρεση της βέλτιστης απόκρισης μέσω ενός λογαρίθμου που κωδικοποιείται από τις γλώσσες προγραμματισμού, γ) τη δυνατότητα αξιόπιστης και αποτελεσματικής βελτιστοποίησης παραμέτρων που αλληλεπιδρούν και δ) την αποφυγή εξακολουθητικά λανθασμένων κινήσεων.

3. Πειραματικός Σχεδιασμός (Design of Experiments - DOE). Πρόκειται ουσιαστικά, για την συστηματική στατιστική μελέτη των πειραματικών αποκρίσεων με στόχο την βελτιστοποίηση των παραμέτρων (ελεγχόμενων μεταβλητών) που τις επηρεάζουν, μέσω συγκεκριμένων πειραμάτων που δίδουν το μέγιστο αριθμό πληροφοριών από τα δεδομένα, με το μικρότερο αριθμό πειραματικών διαδικασιών. Συνήθως, γίνεται χρήση μαθηματικών μοντέλων για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Ένας χρωματογραφικός διαχωρισμός, τώρα, βελτιστοποιείται με ρύθμιση των πειραματικών συνθηκών έτσι, ώστε τα συστατικά ενός μίγματος να διαχωρίζονται στο συντομότερο δυνατό χρόνο και με τη μέγιστη διαχωριστική ικανότητα. Με δεδομένη την εξάρτηση της διαχωριστικής ικανότητας από τα μεγέθη της εκλεκτικότητας, της συγκράτησης και του αριθμού των θεωρητικών πλακών, είναι δυνατό να γίνουν οι κατάλληλες ρυθμίσεις για τη βελτιστοποίηση της κάθε μεταβλητής, τόσο ξεχωριστά όσο

και σε συνδυασμό.

Κατά τον διαχωρισμό μιγμάτων που περιέχουν δύο ή περισσότερες ουσίες με παρόμοια συγκράτηση, 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 περισσότερο 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 διαχωριστική ικανότητα σε υψηλά επίπεδα^[50].

3.5. Είδη υγροχρωματογραφίας

Το είδος της εφαρμοζόμενης χρωματογραφίας καθορίζεται κυρίως από τη φύση του πληρωτικού υλικού και τον τρόπο αλληλεπίδρασης των αναλυτών, όπως τα έκδοχα ενός φαρμακευτικού προϊόντος, με αυτό. Διακρίνονται, λοιπόν, τα ακόλουθα διαφορετικά είδη χρωματογραφίας:

3.5.1. Χρωματογραφία Προσρόφησης

Η αρχή αυτής της χρωματογραφίας, στηρίζεται στην ιδιότητα που έχουν ορισμένα συστατικά ενός διαλύματος να προσροφώνται πάνω στην επιφάνεια μιας στατικής φάσης που ονομάζεται προσροφητικό μέσο. Το φαινόμενο της προσρόφησης ερμηνεύεται ως μια ενεργητική συγκράτηση ενός συστατικού σε μία στερεή επιφάνεια και οφείλεται σε διαφόρων ειδών αλληλεπιδράσεις, όπως οι ηλεκτροστατικές. Για να χρησιμοποιηθεί το φαινόμενο της προσρόφησης πρέπει να είναι αντιστρεπτό, ώστε με τη βοήθεια της κινητής φάσης να επιτυγχάνεται και εκρόφηση των αναλυτών.

3.5.2. Χρωματογραφία Κατανομής

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός στηρίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ της κινητής και της υγρής στατικής φάσης και εφαρμόζεται στην ανάλυση ομόλογων, μη ιοντικών ενώσεων. Διακρίνονται οι ακόλουθοι δύο τύποι:

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

και νερό^[51,52].

3.5.3. Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής

Στη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (Ion-Exchange Chromatography - IEC), η στατική φάση είναι ένας ιοντοανταλλάκτης, δηλαδή ένα στερεό υπόστρωμα που συνδέεται ομοιοπολικά με χαρακτηριστικές ομάδες που είναι ιοντισμένες. Αυτές οι χαρακτηριστικές ομάδες φέρουν ένα σταθερό αρνητικό ή θετικό φορτίο και ευκίνητα ιόντα αντίθετου φορτίου, έτσι ώστε το περιβάλλον να είναι ηλεκτρικά ουδέτερο. Τα είδη των αναλυτών που διαχωρίζονται με τη χρωματογραφία αυτού του είδους είναι ιοντισμένα μόρια ή μόρια που μπορούν να ιοντισθούν με κατάλληλη ρύθμιση της τιμής του pH της κινητής φάσης. Οι κυριότερες παράμετροι που καθορίζουν τη συγκράτηση είναι το αντισταθμιστικό ιόν της δραστικής ομάδας της στατικής φάσης, η ιοντική ισχύς, το pH, ο τροποποιητής της κινητής φάσης και η θερμοκρασία. Χρησιμοποιείται συνήθως στην ανάλυση φαρμακευτικών μορίων, αλλά και για τον διαχωρισμό και τον καθαρισμό πρωτεϊνών, πολυπεπτιδίων κλπ.

3.5.4. Χρωματογραφία Ζεύγους Ιόντων

Η αρχή της συγκεκριμένης τεχνικής βασίζεται στο σχηματισμό ενός συμπλόκου ανάμεσα στον ιοντισμένο αναλύτη και ένα αντισταθμιστικό ιόν κατάλληλου χημικού αντιδραστηρίου που διοχετεύεται με την κινητή φάση. Το σύμπλοκο αυτό ορίζεται ως “ζεύγος ιόντων” και έχει ουδέτερο φορτίο. Έχει καθιερωθεί ως τεχνική επιλογής στη φαρμακευτική ανάλυση για αναλύτες που φέρουν χαρακτηριστικές ομάδες που μπορούν να ιοντισθούν (ασθενή οξέα ή βάσεις)^[53].

3.5.5. Χειρόμορφη Χρωματογραφία

Τα εναντιομερή, είναι ισομερείς δομές ενός ασύμμετρου μορίου που χαρακτηρίζονται από τις ίδιες φυσικές και χημικές ιδιότητες, διαφέρουν μόνο ως προς το σημείο στροφής του επιπέδου του πολωμένου φωτός, όπου το ένα εναντιομερές στρέφει το επίπεδο του πολωμένου φωτός προς τα δεξιά, ενώ το άλλο προς τα αριστερά. Αναγκαία και ικανή συνθήκη για να παρουσιάζει ένα μόριο στροφική ικανότητα είναι να μην μπορεί να ταυτιστεί με το κατοπτρικό είδωλό του. Η χειρόμορφη χρωματογραφία χρησιμοποιείται ευρέως για τον διαχωρισμό χειρόμορφων ή εναντιομερών ενώσεων, μέσω είτε ενός χειρόμορφου αντιδραστηρίου που οδηγεί στο σχηματισμό διαστερεοϊσομερών παραγώγων, πριν τη χρωματογραφική διαδικασία, είτε μέσω χειρόμορφων στατικών φάσεων^[54].

3.5.6. Χρωματογραφία υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων

Αποτελεί μια τεχνική χρωματογραφικού διαχωρισμού πολικών και υδρόφιλων

αναλυτών, χρησιμοποιώντας υδρόφιλες στατικές φάσεις. Οι περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν ότι στη χρωματογραφία HILIC επικρατεί ένας μικτός μηχανισμός συγκράτησης, που περιλαμβάνει φαινόμενα κατανομής, προσρόφησης, ιοντικής και υδρόφοβης αλληλεπίδρασης κλπ. Μέχρι σήμερα, έχει αναπτυχθεί ποικιλία στατικών φάσεων που ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις της HILIC, γεγονός που εξηγεί την ολοένα αυξανόμενη εφαρμογή της για την ανάλυση πολικών ενώσεων, σε συνδυασμό κυρίως με ανιχνευτές φασματομέτρων μαζών^[55].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο: ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ ΕΠΑΓΩΓΙΚΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ (ICP-MS)

4.1. Εισαγωγή

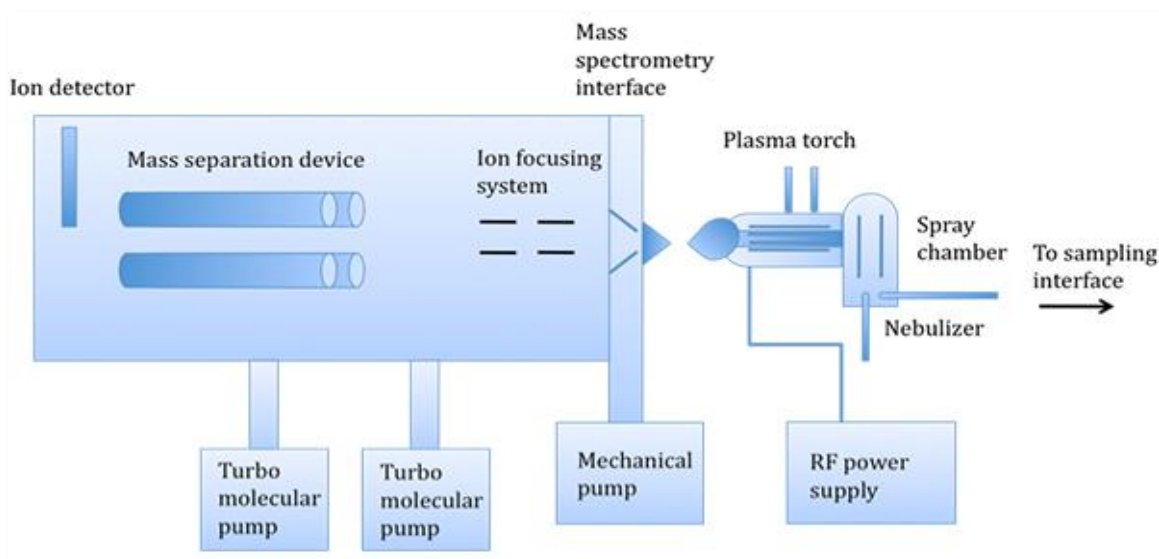
Η φασματομετρία μαζών επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (**Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry**), αποτελεί σήμερα την πιο διαδεδομένη πολυστοιχειακή αναλυτική τεχνική, προσφέροντας τη δυνατότητα ταυτόχρονου προσδιορισμού πολλών αναλυτών σε εξαιρετικά σύντομο χρονικό διάστημα. Η τεχνική αυτή έχει μια πληθώρα χαρακτηριστικών που την κάνουν μοναδικά κατάλληλη για την επίλυση αναλυτικών χημικών προβλημάτων σε πάρα πολλές εφαρμογές, όπως και στις μελέτες αντίστροφης μηχανικής (**Reverse Engineering / Deformulation Studies**). Τα χαρακτηριστικά αυτά περιλαμβάνουν αφενός την ικανότητα να ταυτοποιεί και να ποσοτικοποιεί με ακρίβεια όλα τα στοιχεία του περιοδικού πίνακα, ακόμα και των σπάνιων γαιών και των δύστηκτων μετάλλων, και αφετέρου να προσδιορίζει ξεχωριστά κάθε ισότοπο ενός αναλύτη, δίνοντας τη δυνατότητα για ισοτοπική ανάλυση.

Υπερέχει σε ευαισθησία και χρόνο ανάλυσης συγκριτικά με τις συμβατικές ραδιοαναλυτικές τεχνικές, ενώ προσφέρει τη δυνατότητα ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης σε πάρα πολύ χαμηλά επίπεδα, που αναλόγως τον εξοπλισμό φτάνουν ακόμα και τα 1 - 10 ng/L. Χαρακτηριστικά όπως η μεγάλη δυναμική περιοχή, η υψηλή ακρίβεια και πιστότητα, οι περιορισμένες χημικές παραμποδίσεις και η ανθεκτικότητα,

είναι άρρηκτα συνδεδεμένα με τη συγκεκριμένη τεχνική. Στις μελέτες αντίστροφης μηχανικής, η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται ευρέως για την ακριβή ποσοτικοποίηση των εκδόχων στοιχειακής φύσης, προσφέροντας αξιόπιστα και ασφαλή συμπεράσματα^[56,57].

4.2. Αρχή λειτουργίας^[58]

Κατά τη εφαρμογή της συγκεκριμένης τεχνικής, το δείγμα, που συνήθως είναι σε υγρή μορφή, αντλείται με τη βοήθεια της περισταλτικής αντλίας (peristaltic pump) μέσα στον εκνεφωτή (nebulizer), με αποτέλεσμα να μετατρέπεται σε αερόλυμα (aerosol). Οι μικρές και καλοσηματισμένες σταγόνες (αντιπροσωπεύουν το 1-2% του δείγματος) διαχωρίζονται από τις μεγαλύτερες μέσω του θαλάμου ψεκασμού (spray chamber) και εν συνεχεία μεταφέρονται στον πυρσό (torch). Το πλάσμα, που σχηματίζεται μέσα στον πυρσό, παράγει θετικά φορτισμένα ιόντα, τα οποία κατευθύνονται προς τον φασματογράφο μάζας μέσω μιας περιοχής διασύνδεσης (interface region) που παραμένει υπό κενό. Στην περιοχή αυτή υπάρχουν δύο κώνοι, ο πρώτος είναι ο κώνος δειγματοληψίας (sampler cone) και ο δεύτερος ο αποκορυφωτής (skimmer cone), οι οποίοι έχουν μια οπή στο κέντρο τους ώστε να επιτρέπουν την διόδο των ιόντων στους ιοντικούς φακούς (ion optics). Η λειτουργία των ιοντικών φακών είναι να συγκεντρώσουν ηλεκτροστατικά τη δέσμη ιόντων προς τον αναλυτή μαζών, ενώ παράλληλα εμποδίζουν τα φωτόνια, τα αιωρούμενα και ουδέτερα σωματίδια να φτάσουν στον ανιχνευτή. Ο σκοπός του αναλυτή μαζών είναι να επιτρέψει στους αναλύτες με συγκεκριμένο λόγο μάζας προς φορτίο (mass to charge ratio), να κατευθυνθούν προς τον ανιχνευτή και να παρεμποδίσει τα υπόλοιπα ιόντα.



Εικόνα 4.1: Αρχή λειτουργίας της Φασματομετρίας μαζών επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος

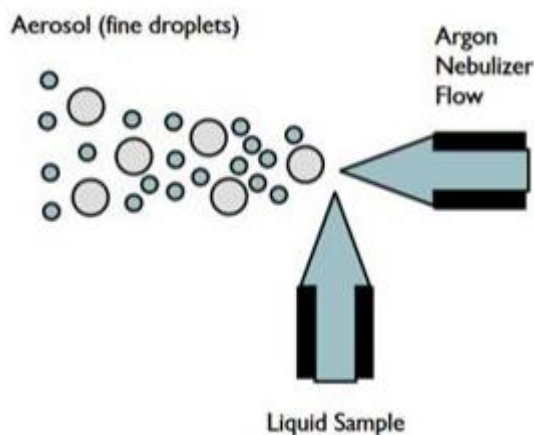
Πολλά όργανα που χρησιμοποιούν τετραπολικό αναλυτή μαζών, έχουν ακόμα μια κυψελίδα συγκρούσεων ή/και αντιδράσεων (collision/reaction cell), που προσφέρει επιπλέον πλεονεκτήματα. Το τελευταίο μέρος ενός οργάνου ICP - MS, είναι ο ανιχνευτής

που μετατρέπει τα ιόντα σε ηλεκτρικό σήμα.

4.3. Οργανολογία

Τα σημαντικότερα τμήματα της φασματομετρίας μαζών επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος είναι ο εκνεφωτής, ο θάλαμος ψεκασμού, ο πυρσός, η περιοχή διασύνδεσης, οι ιοντικοί φακοί, ο αναλυτής μαζών και ο ανιχνευτής. Παρακάτω αναπτύσσονται τα επιμέρους τμήματα.

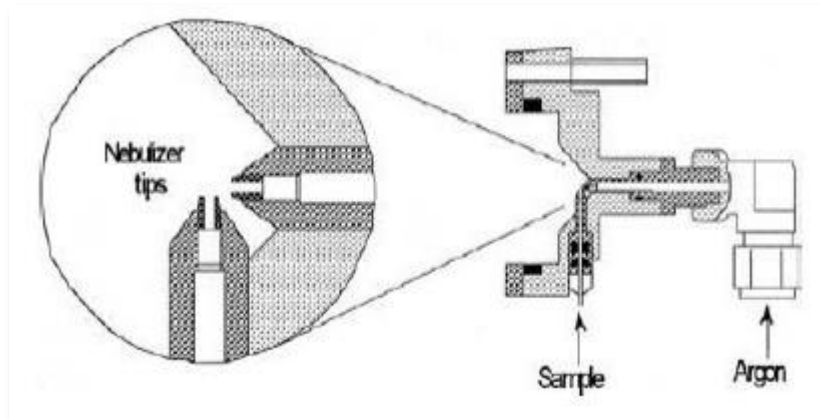
Εκνεφωτής: Κατά τον προσδιορισμό αναλυτών στοιχειακής φύσης σε υγρά, συνήθως, δείγματα, το υγρό πρέπει να φέρει μορφή αποδεκτή από το πλάσμα του οργάνου. Αυτό επιτυγχάνεται κυρίως, με την εισαγωγή του δείγματος σε έναν εκνεφωτή. Ο εκνεφωτής ορίζεται ως το όργανο, το οποίο μετατρέπει ένα υγρό δείγμα σε καλοσχηματισμένα σταγονίδια ή αλλιώς αερόλυμα. Το αερόλυμα περιγράφεται από το μέσο μέγεθος και την κατανομή των σταγόνων του, οι οποίες αποκτούν ταχύτητα ένα σφαιρικό σχήμα και ανάλογες αεροδυναμικές ιδιότητες. Είναι γεγονός ότι όσο πιο μικρές είναι οι σταγόνες που σχηματίζονται, τόσο πιο ομοιόμορφο δείγμα εισέρχεται στο πλάσμα χωρίς να το διαταράσσει. Συνήθως, οι σταγόνες διαμέτρου 5-100 μm θεωρούνται ως βέλτιστες, ενώ οι σταγόνες μεγαλύτερου μεγέθους οδηγούνται στα απόβλητα.



Υπάρχουν διάφοροι τύποι εκνεφωτών, με σημαντικότερο τον πνευματικό εκνεφωτή διασταυρούμενης ροής, η λειτουργία του οποίου στηρίζεται στη παρακάτω γενική αρχή:

1. Μία ροή αερίου διέρχεται κάθετα στον κώνο που φέρει το υγρό δείγμα.
2. Η ροή αυτή τεμαχίζει το δείγμα σε πολύ μικρά σταγονίδια, με αποτέλεσμα να σχηματίζεται το αερόλυμα.
3. Μέσα στο θάλαμο ψεκασμού, τα σταγονίδια υφίστανται διαχωρισμό αναλόγως του μεγέθους τους, με εκείνα που χαρακτηρίζονται από το κατάλληλο μέγεθος και τη ταχύτητα να κατευθύνονται προς το πλάσμα.

Εικόνα 4.2: Αρχή λειτουργίας του Πνευματικού Εκνεφωτή



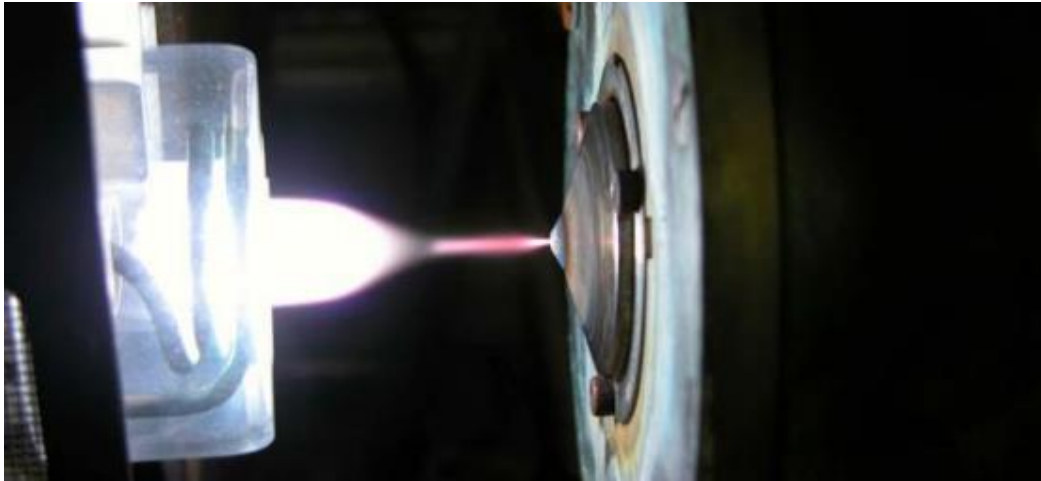
Εικόνα 4.3: Πνευματικός Εκνεφωτής Διασταυρούμενης Ροής

Υπάρχουν και άλλοι τρόποι εισαγωγής του δείγματος, όπως οι εκνεφωτές υπερήχων, οι εκνεφωτές θερμικού ψεκασμού, η παραγωγή υδριδίων, οι ηλεκτροθερμικοί εξαερωτές και η αποσύνθεση με χρήση λέιζερ^[59].

Θάλαμος ψεκασμού: Η λειτουργία του θαλάμου ψεκασμού είναι να απορρίπτει τα μεγαλύτερα σταγονίδια του αερολύματος και να εξομαλύνει τους εκνεφωτικούς παλμούς που παράγονται από την περισταλτική αντλία. Οι περισσότεροι θάλαμοι που χρησιμοποιούνται στο ICP-MS ψύχονται εξωτερικά για την επίτευξη θερμικής σταθεροποίησης του δείγματος και τη μείωση της ποσότητας του διαλύτη που εισέρχεται στο πλάσμα. Τα βασικά πλεονεκτήματα της ψύξης είναι η μείωση των οξειδίων, η εξομάλυνση της ολίσθησης του σήματος και η μείωση της ποσότητας των πτητικών οργανικών διαλυτών.

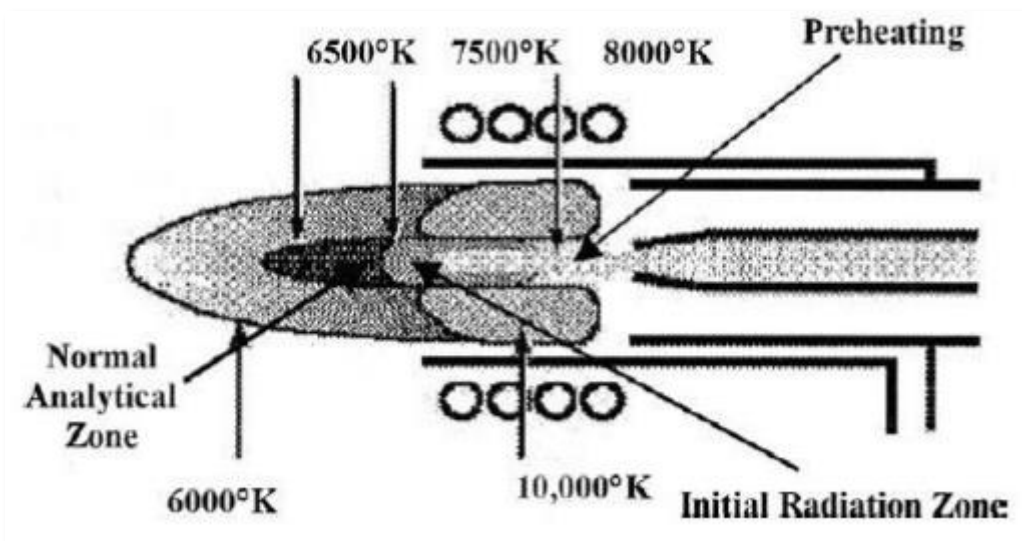
Τα φαινόμενα που συμμετέχουν από την παραγωγή του αερολύματος έως και την εισαγωγή των σταγονιδίων στο πλάσμα, ονομάζονται **φαινόμενα μεταφοράς αερολύματος**. Τα βασικότερα φαινόμενα, λοιπόν, είναι η εξάτμιση, η κροκίδωση ή η συγχώνευση και οι κρούσεις που προκαλούνται από την αδράνεια των σταγονιδίων, τη βαρύτητα και την στροβιλώδη αναταραχή. Η ένταση του κάθε φαινομένου εξαρτάται από το σχεδιασμό του θαλάμου ψεκασμού, από τα χαρακτηριστικά του αερολύματος (π.χ. καθαρότητα, ταχύτητα, σχήμα σταγονιδίων) και από τις φυσικές ιδιότητες του διαλύματος. Συνήθως, έχουν ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση υψηλών ποσοτήτων μεγάλων σταγονιδίων, την ελάττωση της συνολικής μάζας του αερολύματος και την αποβολή των πολυμοριακών σταγονιδίων με βάση τη διάμετρο. Το αερόλυμα που φτάνει τελικά ως το πλάσμα είναι γνωστό ως "tertiary aerosol".

Πυρσός - Πλάσμα: Ως πλάσμα ορίζεται ένα αεριώδες, ηλεκτρικά ουδέτερο και αγώγιμο μίγμα, που περιέχει σημαντικές συγκεντρώσεις κατιόντων και ηλεκτρονίων. Στο πλάσμα αργού, τα ιόντα αργού και τα ηλεκτρόνια είναι οι κύριοι φορείς ηλεκτρικού φορτίου, ενώ συχνά εντοπίζονται και κατιόντα που προέρχονται από το δείγμα, σε μικρότερες ωστόσο, ποσότητες.



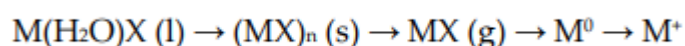
Εικόνα 4.4: Πλάσμα οργάνου ICP - MS

Η πηγή επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος, καλείται **πυρσός**. Αποτελείται από τρεις ομόκεντρους σωλήνες χαλαζία μέσα από τους οποίους ρέει αέριο υγρό. Γύρω από τον εξωτερικό σωλήνα υπάρχει ένα υδρόψυκτο επαγωγικό πηνίο, το οποίο τροφοδοτείται από μια γεννήτρια ραδιοσυχνοτήτων, ενώ η έναρξη του ιοντισμού γίνεται μέσω ενός σπινθήρα από πηνίο Tesla. Τα σχηματιζόμενα ιόντα και τα αντίστοιχα ηλεκτρόνια αλληλεπιδρούν στη συνέχεια με το μεταβαλλόμενο μαγνητικό πεδίο, που παράγεται από το επαγωγικό πηνίο και η αλληλεπίδραση αυτή αναγκάζει τα ιόντα και τα ηλεκτρόνια εντός του πηνίου να κινούνται σε κλειστές δακτυλιοειδείς διαδρομές. Λόγω αυτής της κίνησης, δημιουργείται ωμική θέρμανση από την αντίσταση στη κίνηση των ιόντων και ηλεκτρονίων. Η θερμοκρασία του πλάσματος που δημιουργείται με τον τρόπο αυτό, είναι πολύ υψηλή (περίπου 6000 °C), σημείο που απαιτείται θερμική μόνωση του εξωτερικού κυλίνδρου χαλαζία. Η μόνωση αυτή επιτυγχάνεται με ροή αργού εφαπτομενικά γύρω από τα τοιχώματα του σωλήνα, ενώ η εφαπτομενική ροή ψύχει τα εσωτερικά τοιχώματα του κεντρικού σωλήνα και επικεντρώνει το πλάσμα ακτινωτά.



Εικόνα 4.5: Ενδεικτικές θερμοκρασίες πλάσματος

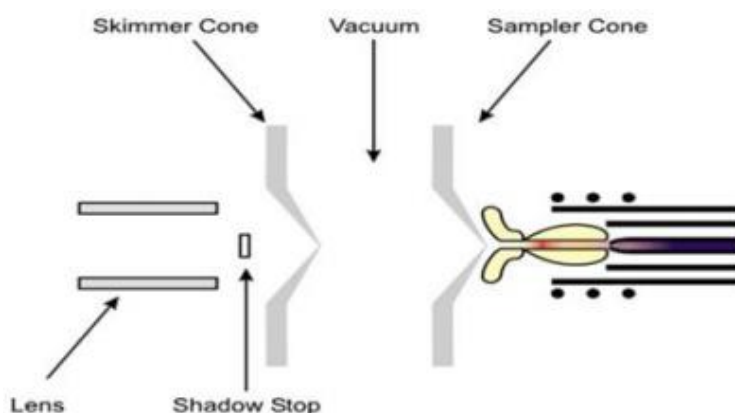
Αφού σχηματιστεί το πλάσμα, το αερόλυμα του δείγματος διέρχεται μέσα από αυτό και ιοντίζεται. Αν για παράδειγμα ο αναλύτης βρίσκεται υπό μορφή άλατος στο διάλυμα, τότε το πρώτο βήμα είναι η αποδιαλύτωση. Στη συνέχεια, τα μόρια του νερού απομακρύνονται και λαμβάνονται μικρού μεγέθους στερεά σωματίδια. Καθώς το δείγμα κατευθύνεται προς το πλάσμα, τα στερεά σωματίδια μετατρέπονται σε αέρια και ακολουθεί η διαδικασία της ατομοποίησης. Τέλος, τα άτομα συγκρούονται με τα ηλεκτρόνια που προέρχονται από το πλάσμα και ιοντίζονται. Συνοπτικά, ο μηχανισμός που λαμβάνει χώρα είναι ο ακόλουθος:

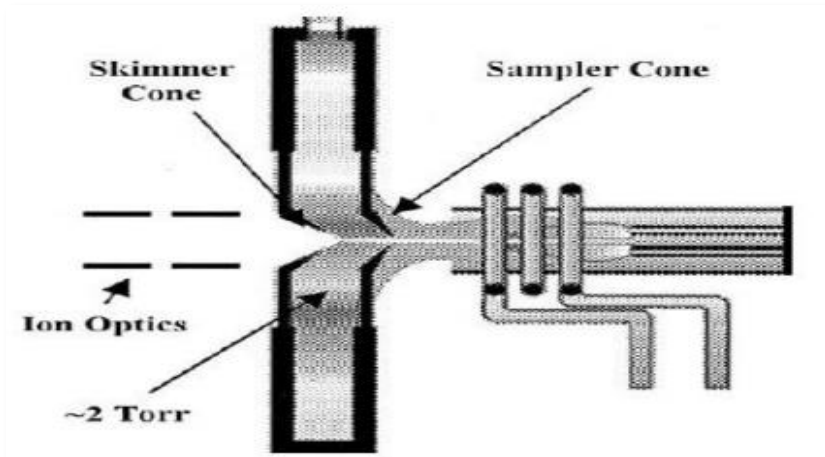


Τα μεμονωμένα φορτισμένα ιόντα βγαίνουν από το πλάσμα και εισέρχονται στη περιοχή διασύνδεσης.

Υπάρχουν τρεις τύποι πλάσματος υψηλής θερμοκρασίας, το επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα, το πλάσμα συνεχούς ρεύματος και το μικροκυματικά επαγόμενο πλάσμα.

Περιοχή διασύνδεσης: Εκτός από τη μεγάλη διαφορά θερμοκρασίας, το πλάσμα λειτουργεί σε μία πίεση που είναι πολύ υψηλότερη, όσον αφορά τα τμήματα των ιοντικών φακών και του φασματομέτρου μαζών του μέσου κενού. Η διεπαφή επιτρέπει στο πλάσμα και στο σύστημα των φακών να συνυπάρχουν και τα ιόντα που δημιουργούνται από το πλάσμα, να εισέρχονται μέσα στην περιοχή των ιοντικών φακών με μεγαλύτερη ευκολία.





Εικόνα 4.6: Περιοχή διασύνδεσης οργάνου ICP - MS

Αναλυτικά, ο ρόλος της περιοχής διασύνδεσης είναι να εξαγάγει τα κατιόντα του αναλύτη από το πλάσμα και να τα κατευθύνει προς τον αναλυτή μαζών. Αυτό πρακτικά σημαίνει, ότι πρέπει να μεταφέρει τα κατιόντα από ένα περιβάλλον υψηλής θερμοκρασίας (περίπου 7500 K) και ατμοσφαιρικής πίεσης (1000 mbar), στο περιβάλλον του φασματοφωτομέτρου που λειτουργεί σε θερμοκρασία δωματίου (περίπου 300 K) και χαμηλών πιέσεων (10^{-5} - 10^{-9} mbar), προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ανάλυση και ανίχνευση των κατιόντων του αναλύτη. Συνεπώς, απαιτείται σημαντική μείωση της πίεσης, η οποία μάλιστα πρέπει να πραγματοποιηθεί σε πολύ μικρή απόσταση (<10 cm), χρησιμοποιώντας μικρές αντλίες κενού. Οι πιέσεις και το σχήμα των κώνων μέσα στην περιοχή διασύνδεσης, επηρεάζουν σημαντικά την ευαισθησία, την απόκριση, την ανοχή στην έντονη επίδραση της μήτρας και τα επίπεδα των μοριακών παρεμποδίσεων.

Εικόνα 4.7: Κώνος δειγματοληψίας (Sampler Cone) και αποκορυφωτής (Skimmer Cone)

Το πλάσμα κεντράρεται σε μια οπή διαμέτρου ~ 1 mm η οποία βρίσκεται στη κορυφή ενός κώνου, που συνήθως είναι κατασκευασμένος από νικέλιο, αν και κώνοι από λευκόχρυσο, χαλκό και αλουμίνιο χρησιμοποιούνται ευρέως σε συγκεκριμένες εφαρμογές. Τα σημαντικότερα φυσικά χαρακτηριστικά ενός κώνου είναι το σημείο τήξεως, η θερμική ειδική αγωγιμότητα, η αντίσταση στις μεταβολές της θερμοκρασίας και η χημική αντίσταση.

Ο πρώτος κώνος ονομάζεται **κώνος δειγματοληψίας** (sampler cone) που ψύχεται συνεχώς με παγωμένο νερό (υδρόψυκτο μεταλλικό περίβλημα για την πρόληψη ζημιών από την θερμότητα του πλάσματος), για να αποφευχθεί η τήξη του. Πίσω από τον κώνο δειγματοληψίας εντοπίζεται ο θάλαμος διαστολής, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με μία αντλία και δημιουργεί πίεση ίση με 2-5 mbar. Το σύνολο των ατόμων, μορίων, ιόντων και ηλεκτρονίων εισέρχεται στο θάλαμο διαστολής στον οποίο αυξάνεται η ταχύτητα κίνησής του, λόγω της μειωμένης πίεσης. Η στιγμιαία αυτή αύξηση της ταχύτητας του αερίου απαιτεί ενέργεια, η οποία παρέχεται από τη μετατροπή της θερμικής ενέργειας του αερίου σε κινητική, με αποτέλεσμα τη μείωση της θερμοκρασίας από 5000-7500 K

σε 100-200 K και μάλιστα, σε εξαιρετικά μικρή απόσταση (< 1 cm). Η περιοχή που συμβαίνουν όλα τα παραπάνω είναι γνωστή ως **ζώνη σιωπής**.

Μετά τον κώνο δειγματοληψίας, υπάρχει ο δεύτερος κώνος, ο αποκορυφωτής (skimmer cone), ο οποίος έχει μικρότερη οπή (0.4-0.7 mm) και για να λειτουργήσει αποτελεσματικά πρέπει να βρίσκεται μέσα στη ζώνη σιωπής, γιατί σε αντίθετη περίπτωση μειώνεται εξαιρετικά η ευαισθησία. Η κορυφή του κώνου είναι πιο αιχμηρή, ώστε να διατηρείται στο βέλτιστο η δίοδος των ιόντων του δείγματος από την παρεμπόδιση της διαστολής του αέρα. Το σχήμα του αποκορυφωτή και η κατάσταση της κορυφής έχουν άμεση επίδραση στην απόκριση, στο μοριακό υπόβαθρο, στα φαινόμενα μήτρας και στη γεωμετρία των ιοντικών φακών που θα περιγραφούν στη συνέχεια.

Αξίζει να αναφερθεί ότι η διάμετρος των οπών στους κώνους πρέπει να είναι με τέτοιο τρόπο κατασκευασμένη, ώστε να είναι ταυτόχρονα τόσο μεγάλη για την αποφυγή κινδύνων απόφραξης υλικών και εξάτμισή τους, και τόσο μικρή για τη διατήρηση του απαραίτητου κενού στην άλλη πλευρά της διεπαφής. Γενικότερα, συνίσταται η ανάλυση δειγμάτων με μικρή περιεκτικότητα σε διαλυμένα στερεά για την καλύτερη απόδοση και σταθερότητα του οργάνου. Αυτός είναι και ο λόγος που τα περισσότερα δείγματα, συμπεριλαμβανομένων των φαρμακευτικών προϊόντων, πρέπει να αραιώνονται πριν την ανάλυσή τους με την τεχνική ICP-MS.

Σημαντικό στοιχείο που αφορά την ορθή λειτουργία του οργάνου είναι η συχνότητα καθαρισμού των φακών, μια διαδικασία που περιγράφεται αναλυτικά στον οδηγό συντήρησης του οργάνου, η οποία καθορίζεται αφενός από τη χρήση του και αφετέρου από την αυξημένη συχνότητα εμφάνισης αποτελεσμάτων μειωμένης ευαισθησίας.

Η απόσταση από το σημείο της διεπαφής με τον ανιχνευτή ενός ICP-MS είναι τυπικά 1 cm ή και λιγότερο. Κάθε ιόν του αναλύτη πρέπει να ταξιδέψει αυτή την απόσταση, με την πιθανότητα σύγκρουσης με τα μόρια του φέροντος αερίου να είναι αυξημένη. Συνεπώς, απαιτείται η απομάκρυνση όλων των μορίων του αερίου στο χώρο μεταξύ της διεπαφής και του ανιχνευτή και η δημιουργία συνθηκών κενού. Το έργο αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση ενός συνδυασμού από στροβιλομοριακές αντλίες και μηχανικές αντλίες. Οι πρώτες λειτουργούν σαν τουρμπίνες και φέρουν το απαραίτητο κενό σε σύντομο χρονικό διάστημα ($< 10^{-5}$ torr).

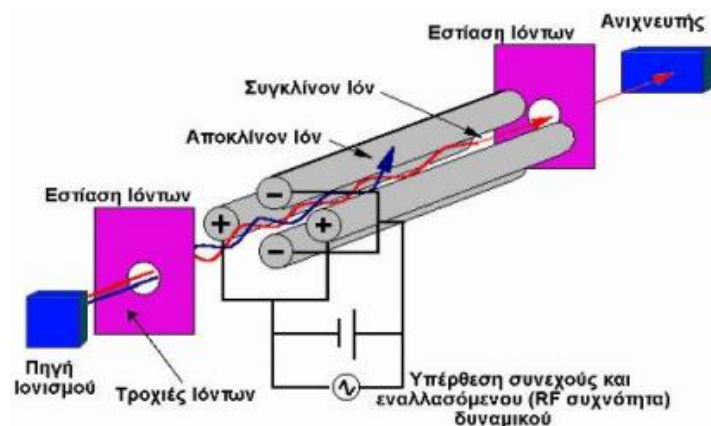
Ιοντικοί φακοί: Οι ιοντικοί φακοί είναι σχεδιασμένοι για να συμβάλλουν στη μεταφορά των θετικά φορτισμένων ιόντων, καθώς απομακρύνονται από την περιοχή διασύνδεσης. Μεταβάλλοντας το δυναμικό του κάθε φακού ανεξάρτητα, η ιοντική δέσμη

ευθυγραμμίζεται και συγκεντρώνεται. Στην αρχή των ιοντικών φακών υπάρχει ένα σύστημα που ονομάζεται “photon stop”, του οποίου ο ρόλος είναι να αποκόπτει τα ανεπιθύμητα φωτόνια και ουδέτερα μόρια που παράγονται από το ICP. Ο ρόλος του είναι εξαιρετικά σημαντικός, αφού με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνονται χαμηλά επίπεδα υποβάθρου, τα οποία οδηγούν σε χαμηλά όρια ανίχνευσης.

Αφού διαχωριστούν τα θετικά φορτισμένα ιόντα από τα υπόλοιπα ανεπιθύμητα μόρια, πρέπει να ευθυγραμμιστούν και να κατευθυνθούν προς τον αναλυτή μαζών. Όλα τα ιόντα χαρακτηρίζονται από την ίδια ταχύτητα, αλλά από διαφορετική κινητική ενέργεια που εξαρτάται από τη μάζα τους, με αποτέλεσμα τα βαρύτερα ιόντα να έχουν υψηλότερη ενέργεια από τα ελαφρύτερα. Αυτή η διαφορά στην κινητική ενέργεια των ιόντων οδηγεί σε διαφορετικά βέλτιστα δυναμικά των ιοντικών φακών για κάθε στοιχείο. Έτσι, σε μια πολυστοιχειακή ανάλυση πραγματοποιείται ένας συμβιβασμός, ο οποίος είναι πιο έντονος όσο πιο διαφορετικές είναι οι μάζες των στοιχείων^[60,61].

Αναλυτής μαζών: Τα ιόντα που παράγονται από το ICP μετρώνται με την βοήθεια του αναλυτή μάζας, που λειτουργεί ως φίλτρο μαζών, σχεδιασμένο να απομονώνει ένα συγκεκριμένο λόγο μάζας προς φορτίο (m/z) από μία δέσμη πολλών ιόντων. Τα ιόντα αυτά, μετά τον διαχωρισμό τους, κατευθύνονται στον ανιχνευτή για την μέτρηση του ιοντικού ρεύματος που φέρουν, το οποίο είναι ανάλογο του πληθυσμού των ιόντων του κάθε αναλύτη. Επομένως, η μέτρηση του λόγου m/z ενός ιόντος επιτρέπει την ποιοτική ταυτοποίησή του, ενώ η τάξη του ιοντικού ρεύματος που φέρει, τον ποσοτικό προσδιορισμό του αναλύτη στο δείγμα.

Η διαδικασία διαχωρισμού των ιόντων επιτυγχάνεται με διάφορους τρόπους, που εξαρτώνται κυρίως από το είδος του αναλυτή μαζών που είναι εφοδιασμένο το κάθε όργανο. Όλοι, ωστόσο, έχουν τον ίδιο κοινό σκοπό που δεν είναι άλλος, από τον διαχωρισμό του αναλύτη από τα υπόλοιπα ιόντα του διαλύτη, της μήτρας κλπ. Υπάρχουν τεσσάρων ειδών αναλυτές μαζών με ευρεία χρήση, α) οι τετραπολικί αναλυτές, β) οι αναλυτές χρόνου πτήσης, γ) οι αναλυτές μαγνητικού τομέα διπλής εστίασης, δ) οι



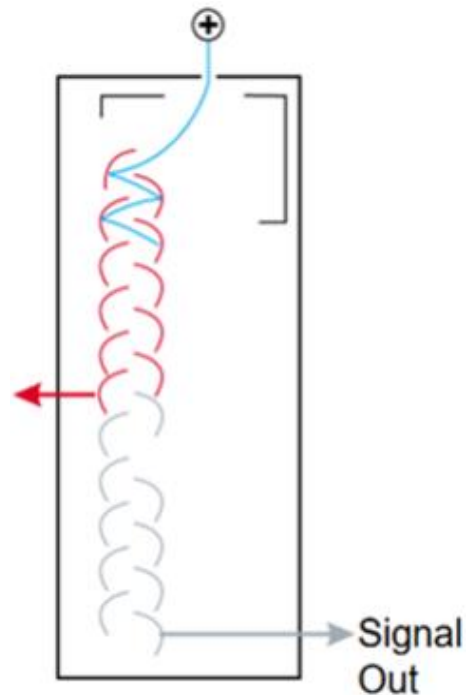
αναλυτές παγίδας ιόντων και προσφάτως η τεχνολογία κυψελίδας συγκρούσεων ή/και αντιδράσεων. Ο τετραπολικός αναλυτής μαζών είναι ο τύπος που χρησιμοποιείται περισσότερο σε κάθε εργαστήριο. Αποτελείται από τέσσερις ράβδους περίπου 20 cm σε μήκος και 1 cm σε διάμετρο, που διατάσσονται αντιπαράλληλα μεταξύ τους, όπως φαίνεται και στη διπλανή εικόνα. Λειτουργεί, επιτρέποντας μόνο έναν λόγο m/z να κατευθυνθεί προς τον ανιχνευτή, σε κάθε δεδομένη χρονική στιγμή. Ο συγκεκριμένος αναλυτής μαζών δημιουργεί τον σωστό συνδυασμό τάσεων και ραδιοσυχνοτήτων για να καθοδηγήσει τα ιόντα με τον επιλεγμένο λόγο m/z μεταξύ των τεσσάρων ράβδων του.

Ιόντα

Εικόνα 4.8: Τετραπολικός αναλυτής μαζών

που δεν έχουν τον επιλεγμένο λόγο, διέρχονται έξω από τις ράβδους και απομακρύνονται ταχύτατα. Έτσι, το τετράπολο λειτουργεί στην πραγματικότητα ως ένα ηλεκτροστατικό φίλτρο, με τις ρυθμίσεις του να αλλάζουν κάθε φορά για συγκεκριμένο λόγο μάζας προς φορτίο. Υπάρχουν περιπτώσεις ωστόσο, που το φίλτρο αυτό δεν αρκεί για τον διαχωρισμό επικαλυπτόμενων μοριακών ή ισοβαρών παρεμβολών, κυρίως όμως σε ισοτοπικές αναλύσεις^[62].

Ανιχνευτής: Οι ανιχνευτές αποτελούν ένα σημαντικότατο τμήμα του φασματομέτρου μάζας, ανιχνεύοντας και ποσοτικοποιώντας τα ιόντα που διέρχονται από τον αναλυτή μαζών. Συνήθως μετατρέπουν τα ιόντα σε ηλεκτρικούς παλμούς, οι οποίοι μετρώνται χρησιμοποιώντας ένα ηλεκτρικό κύκλωμα ολοκλήρωσης. Το μέγεθος των ηλεκτρικών παλμών αντιστοιχεί στον αριθμό των ιόντων του αναλύτη που υπάρχουν στο δείγμα, οι οποίοι συγκρινόμενοι με το σήμα των προτύπων διαλυμάτων επιτρέπουν την ποσοτικοποίησή τους.



Κατά την ανάπτυξη της τεχνικής ICP-MS και την εφαρμογή της στις αναλύσεις φαρμακευτικών προϊόντων και μη, διάφοροι τύποι ανιχνευτών χρησιμοποιήθηκαν, με πιο δημοφιλείς τον κλωβό Faraday και τον πολλαπλασιαστή ηλεκτρονίων. Πλέον, η πλειονότητα των συστημάτων ICP-MS που χρησιμοποιούνται έχουν ανιχνευτές που βασίζονται στον πολλαπλασιαστή ηλεκτρονίων διακριτών δυνόδων.

Εικόνα 4.9: Φωτοπολλαπλασιαστής

Τα ιόντα που εξέρχονται από τον αναλυτή μαζών, προσκρούουν στην ενεργό επιφάνεια του ανιχνευτή και δημιουργούν ένα μετρήσιμο ηλεκτρονικό σήμα. Η δραστική επιφάνεια του ανιχνευτή, που είναι γνωστή ως **δύνοδος**, απελευθερώνει ένα ηλεκτρόνιο κάθε φορά που ένα ιόν χτυπά σε αυτή. Στο ακόλουθο σχήμα, το ιόν που εξέρχεται από τον τετραπολικό αναλυτή μαζών, προσκρούει στη πρώτη δύνοδο, με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται ηλεκτρόνια και να ξεκινάει η διαδικασία ενίσχυσης. Τα ηλεκτρόνια που απελευθερώνονται από τη πρώτη δύνοδο προσκρούουν σε μια δεύτερη και έτσι, παράγονται περισσότερα ηλεκτρόνια. Αυτή η υπερχειλίση των ηλεκτρονίων συνεχίζεται,

έως ότου δημιουργηθεί ένας μετρήσιμος παλμός. Η καταμέτρηση των παλμών σχετίζεται με τα ιόντα που έπληξαν την πρώτη δύνοδο και οδηγεί στην ακριβή ποσοτικοποίησή τους^[63].

4.4. Εφαρμογές της τεχνικής^[64,65]

Μία από τις μεγαλύτερες και σημαντικότερες εφαρμογές της τεχνικής ICP-MS σχετίζεται με τον τομέα της φαρμακευτικής και χημικής ανάλυσης. Προσφέρει πληθώρα πλεονεκτημάτων και αποτελεί την πρώτη επιλογή ανάλυσης δειγμάτων που περιέχουν αναλύτες στοιχειακής φύσης, όπως το στεατικό μαγνήσιο που περιέχεται στο πρωτότυπο φαρμακευτικό σκεύασμα της **Πρασουγρέλης**, ενώ αναπτύσσεται και βελτιώνεται διαρκώς.

Πέραν από τον τομέα αυτό, χρησιμοποιείται ευρέως τόσο στην εγκληματολογία, για την ταυτοποίηση υπόπτων μέσω της ανάλυσης των ιχνοστοιχείων που εντοπίζονται στα αποτυπώματά τους, όσο και στην τοξικολογία, σε περιπτώσεις υποψίας δηλητηρίασης από βαρέα μέταλλα, μεταβολικές ανησυχίες, ακόμη και ηπατολογικά προβλήματα. Στην τοξικολογία, ανάλογα με τις συγκεκριμένες παραμέτρους που είναι μοναδικές για το διαγνωστικό σχέδιο κάθε ασθενούς, τα δείγματα που συλλέγονται για ανάλυση μπορεί να περιλαμβάνουν ολικό αίμα, ούρα, πλάσμα, ορό και ερυθρά αιμοσφαίρια.

Μία άλλη εφαρμογή της τεχνικής αυτής, εντοπίζεται στον τομέα της γεωχημείας σε περιπτώσεις ραδιομετρικής χρονολόγησης και ανάλυσης της σχετικής αφθονίας δαφόρων ισοτόπων, όπως το ουράνιο και ο μόλυβδος. Τέλος, γίνονται προσπάθειες, ολοένα και περισσότερο, χρησιμοποίησης της φασματομετρίας μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος στο πεδίο της κυτταρομετρίας για την αντικατάσταση των παραδοσιακών φθορίζουσων ουσιών. Αντί της επίσημανσης των αντισωμάτων (ή άλλων βιολογικών ανιχνευτών) με φθορίζουσες ουσίες, κάθε αντίσωμα επισημαίνεται με διακριτούς συνδυασμούς λανθανιδών. Ως εκ τούτου, όταν το δείγμα ενδιαφέροντος αναλύεται με την τεχνική ICP-MS σε ένα εξειδικευμένο κυτταρόμετρο ροής, κάθε αντίσωμα μπορεί να ταυτοποιηθεί και να ποσοτικοποιηθεί με τη χρησιμοποίηση συγκεκριμένων ανιχνευτών, όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Εκατοντάδες βιολογικοί ανιχνευτές μπορούν συνεπώς, να αναλυθούν σε κάθε μεμονωμένο κύτταρο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο: ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ

5.1 Εισαγωγή^[66,67,68]

Η επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου είναι η επιβεβαίωση μέσω εξέτασης και παροχής αντικειμενικών αποδείξεων ότι ικανοποιούνται οι ιδιαίτερες απαιτήσεις για μια συγκεκριμένη, σκοπούμενη χρήση. Πιο συγκεκριμένα, είναι η διαδικασία κατά την οποία γίνεται αξιολόγηση των χαρακτηριστικών ποιότητας της μεθόδου (δηλαδή των παραμέτρων, ιδιοτήτων, κριτηρίων ή συμπεριφορών, που εμφανίζει μία αναλυτική μέθοδος κατά την εφαρμογή της στην ανάλυση ενός δείγματος, και που επιτρέπουν να αξιολογηθεί για την καταλληλότητα/ποιότητά της), μέσω πειραματικής τεκμηρίωσης για να αποδειχθεί ότι πράγματι, είναι κατάλληλη για τον σκοπό για τον οποίο προορίζεται (fitness for purpose).

Οι κυριότερες μέθοδοι που χρήζουν επιτακτικής επικύρωσης είναι: α) οι μη πρότυπες μέθοδοι, β) οι μέθοδοι που σχεδιάζονται από το εργαστήριο (in-house methods), γ) οι πρότυπες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται εκτός του αντικειμένου τους και δ) οι ενισχυμένες και τροποποιημένες πρότυπες μέθοδοι. Υπάρχουν διεθνείς οδηγίες (guidelines), οι οποίες παρέχουν κατευθυντήριες γραμμές για την πραγματοποίηση της επικύρωσης των μεθόδων, ανάλογα με τον σκοπό της συγκεντρώνει όλα τα πρέπει να εξετάζονται αναλυτικής διαδικασίας. όπως η εκλεκτικότητα, το η ανθεκτικότητα και η παρουσιάζονται στον ωστόσο κατά την μεθόδου.

Χαρακτηριστικά Επικύρωσης
Ειδικότητα
Όριο ανίχνευσης
Όριο ποσοτικοποίησης
Γραμμικότητα
Ακρίβεια
Πιστότητα
Σταθερότητα

ενώ η έκταση της ποικίλλει μεθόδου. Ο Πίνακας 5.1, χαρακτηριστικά που θα κατά την επικύρωση μιας Υπάρχουν χαρακτηριστικά εύρος γραμμικής περιοχής, αντοχή, που δεν πίνακα αυτό, εξετάζονται ανάπτυξη της αναλυτικής

Πίνακας 5.1: Χαρακτηριστικά ορθής επικύρωσης

5.2 Χαρακτηριστικά ορθής επικύρωσης

Το στάδιο της ορθής επικύρωσης μιας μεθόδου είναι απαραίτητο, μιας και αυτό συνεπάγεται ότι η εν λόγω μέθοδος δύναται να χρησιμοποιηθεί σε διαφορετικά εργαστήρια για το συγκεκριμένο σκοπό. Συνήθως, αξιολογούνται οι παρακάτω παράμετροι:

5.2.1 Ειδικότητα (Specificity)

Η ειδικότητα εκφράζει την παρεμπόδιση κατά τον προσδιορισμό ενός συστατικού σε ένα δείγμα από τα υπόλοιπα συστατικά του μίγματος. Μια αναλυτική μέθοδος είναι πλήρως **ειδική** για έναν αναλύτη, εάν η συγκέντρωσή του μπορεί να προσδιορισθεί με ακρίβεια χωρίς επίδραση από τα άλλα συστατικά του μητρικού υλικού. Ο έλεγχος της ειδικότητας συνίσταται στην αξιολόγηση της ικανότητας της αναλυτικής μεθόδου να διακρίνει τον αναλύτη από α) γνωστές προσμίξεις, β) υπολλείματα πρώτων υλών της σύνθεσης, γ) μεταβολίτες, δ) προϊόντα διάσπασης και αποικοδόμησης και ε) συστατικά του μητρικού υλικού του δείγματος.

5.2.2 Εκλεκτικότητα (Selectivity)

Ο όρος αυτός αναφέρεται στην ικανότητα της μεθόδου να προσδιορίζει με ακρίβεια μια ομάδα ουσιών σε ένα υπόστρωμα δείγματος. Μια μέθοδος είναι πλήρως **εκλεκτική**, εάν παρέχει ορθά αναλυτικά αποτελέσματα για τα διάφορα συστατικά του μίγματος, χωρίς αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Μια εκλεκτική μέθοδος συνίσταται από μια σειρά ειδικών μετρήσεων και πολλές φορές επικρατεί μια σύγχυση των όρων εκλεκτικότητας και ειδικότητας, και χρησιμοποιούνται ως ισοδύναμοι.

5.2.3 Όριο ανίχνευσης (Limit of Detection - LOD)

Το όριο ανίχνευσης μιας αναλυτικής μεθόδου, ορίζεται ως η ελάχιστη ποσότητα / συγκέντρωση του αναλύτη που πρόκειται να προσδιορισθεί σε ένα δείγμα, η οποία μπορεί να ανιχνευθεί, αλλά όχι αναγκαστικά να ποσοτικοποιηθεί ως μια ακριβής τιμή. Σε περιπτώσεις χρωματογραφικών μεθόδων που χαρακτηρίζονται από γραμμή βάσης, το όριο ανίχνευσης προσδιορίζεται ως η ποσότητα / συγκέντρωση για την οποία ο λόγος σήματος προς θόρυβο (Signal-to-noise) ισούται με 3.3.

5.2.4 Όριο ποσοτικοποίησης (Limit of Quantitation - LOQ)

Στις περιπτώσεις που απαιτείται, πέραν της ανίχνευσης του αναλύτη, η ακριβής ποσοτικοποίησή του, χρησιμοποιείται το όριο ποσοτικοποίησης. Ουσιαστικά, πρόκειται για την ελάχιστη συγκέντρωση του αναλύτη που μπορεί να προσδιορισθεί με ακρίβεια και επαναληψιμότητα και συνήθως ισούται με το τριπλάσιο του LOD.

5.2.5 Γραμμικότητα (Linearity)

Η γραμμικότητα μιας μεθόδου εξετάζεται σε όλο το εύρος της περιοχής συγκεντρώσεων της αναλυτικής μεθόδου και αποδεικνύεται με οπτική εξέταση του διαγράμματος του αναλυτικού σήματος ως προς την συγκέντρωση ή περιεκτικότητα του αναλύτη. Προσδιορίζεται με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων (μέσω της εξίσωσης παλινδρόμησης) και εκφράζεται με τον συντελεστή γραμμικής συσχέτισης.

5.2.6 Εύρος γραμμικής περιοχής (Range)

Ουσιαστικά, πρόκειται για το διάστημα μεταξύ της μικρότερης και της μεγαλύτερης συγκέντρωσης του αναλύτη, ο οποίος μπορεί να προσδιορισθεί με ικανοποιητική ακρίβεια, επαναληψιμότητα και γραμμικότητα.

5.2.7 Ακρίβεια (Accuracy)

Η ακρίβεια ορίζεται 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 που αναπτύχθηκε, σε συνάρτηση με την πραγματική τιμή. Αναφέρεται στη διαφορά (σφάλμα, error) μεταξύ του μέσου όρου μιας σειράς μετρήσεων και της τιμής μ , η οποία γίνεται αποδεκτή ως η αληθινή ή ορθή τιμή της μετρούμενης ποσότητας. Οι κύριοι περιορισμοί στην ακρίβεια προέρχονται συνήθως, από α) τα τυχαία σφάλματα (random errors) και β) τα συστηματικά σφάλματα (bias) της αναλυτικής μεθόδου (θετική ή αρνητική απόκλιση του μέσου αναλυτικού αποτελέσματος από τη γνωστή ή θεωρούμενη αληθινή τιμή). Η παράμετρος αυτή ελέγχεται πραγματοποιώντας τουλάχιστον τρεις προσδιορισμούς, σε τουλάχιστον τρία επίπεδα συγκεντρώσεων που καλύπτουν την καθοριζόμενη περιοχή συγκεντρώσεων.

5.2.8 Πιστότητα (Precision)

Η πιστότητα μιας μεθόδου είναι το πλέον χρησιμοποιούμενο χαρακτηριστικό ποιότητας και εκφράζει την προσέγγιση της συμφωνίας μεταξύ των επαναλαμβανόμενων αποτελεσμάτων της μεθόδου. Μπορεί να περιγραφεί ως η ποσότητα που μετρά τη διασπορά των αποτελεσμάτων όταν η αναλυτική μεθοδολογία επαναλαμβάνεται σε ένα δείγμα. Η διασπορά των αποτελεσμάτων προκαλείται από διάφορες τυχαίες πηγές και

βρίσκεται συνήθως κοντά στην αναμενόμενη τιμή του αποτελέσματος, εάν δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα. Υποσύνολα της πιστότητας είναι: α) **η επαναληψιμότητα**, β) **η ενδιάμεση πιστότητα** και γ) **η αναπαραγωγιμότητα**.

Η **επαναληψιμότητα** είναι το μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων διαδοχικών ελέγχων στο ίδιο δείγμα, που εκτελούνται κάτω από τις ίδιες συνθήκες, δηλαδή ίδια μέθοδος ελέγχου, ίδιος αναλυτής, ίδια συσκευή, ίδιο εργαστήριο και βραχύ χρονικό διάστημα. Η αναπαραγωγιμότητα, τώρα, είναι το μέτρο της διασποράς μεταξύ των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με την ίδια μέθοδο στο ίδιο δείγμα, κάτω από διαφορετικές συνθήκες, δηλαδή διαφορετικός αναλυτής, διαφορετικές συσκευές, διαφορετικές παρτίδες αντιδραστηρίων και σε διαφορετικούς χρόνους. Διακρίνεται στην α) **ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα ή ενδιάμεση πιστότητα** (στο ίδιο εργαστήριο) και β) **διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα** (σε διαφορετικά εργαστήρια).

5.2.9 Σταθερότητα (Stability)

Η μελέτη της σταθερότητας αποτελεί μια σημαντικότερη διαδικασία, καθώς τις περισσότερες φορές τα δείγματα δεν αναλύονται αμέσως, με αποτέλεσμα την αυξημένη πιθανότητα αλλοίωσής τους, είτε στο στάδιο της προκατεργασίας, είτε ακόμα και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους. Συνεπώς, επιβάλλεται να ελέγχεται η μέθοδος για τη σταθερότητα των προσδιοριζόμενων ενώσεων.

5.2.10 Ανθεκτικότητα (Robustness)

Η παράμετρος αυτή εξετάζεται στη φάση της ανάπτυξης της μεθόδου και περιγράφει την ανθεκτικότητα της σε προσχεδιασμένες σκοπούμενες μικρομεταβολές των πειραματικών παραμέτρων. Σχετίζεται με την ανθεκτικότητα της μεθόδου (robustness) σε τυχαίες μη σκοπούμενες μικρομεταβολές των πειραματικών παραμέτρων που αντιστοιχούν στον έλεγχο της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας.

Στην πράξη, οι δύο αυτοί όροι είναι άρρηκτα συνδεδεμένοι και πολλές φορές υπάρχει σύγχυση στη χρήση τους, καθώς και οι δύο εξετάζονται με τον ίδιο τρόπο, δηλαδή με μικρές μεταβολές, οι οποίες π.χ στη περίπτωση της HPLC μπορεί να σχετίζονται με:

- τη (%) περιεκτικότητα της κινητής φάσης σε οργανικό διαλύτη
- το pH της κινητής φάσης
- τη ταχύτητα ροής
- τη θερμοκρασία ή
- τον όγκο του δείγματος που ενίεται.

5.3. Μέθοδοι ποσοτικοποίησης^[69]

Οι κυριότερες μέθοδοι ποσοτικοποίησης που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση των φαρμακευτικών προϊόντων, περιλαμβάνουν:

5.3.1 Μέθοδος ενός εξωτερικού προτύπου

Χρησιμοποιείται κυρίως, στις περιπτώσεις όπου η μέθοδος παρουσιάζει γραμμική καμπύλη απόκρισης και διέρχεται από την αρχή των αξόνων, δηλαδή η τομή της είναι ίση με 0 ($\alpha=0$). Βασίζεται στην άμεση συσχέτιση της ένδειξης του ανιχνευτή για γνωστής συγκέντρωσης πρότυπο διάλυμα με τη συγκέντρωση του αγνώστου δείγματος. Η συγκέντρωση του προτύπου διαλύματος (C_s), επιλέγεται να είναι σχετικά κοντά στην αναμενόμενη συγκέντρωση του αγνώστου δείγματος (C_x), η οποία υπολογίζεται βάσει της σχέσης:

$$C_x = \frac{P_x \times C_s}{P_s}$$

Το μοναδικό μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η μειωμένη ακρίβεια ποσοτικοποίησης, λόγω της υπερτίμησης ή υποτίμησης που πιθανόν να συμβεί, ωστόσο προτιμάται σε μη χρονοβόρες αναλύσεις ρουτίνας.

5.3.2. Μέθοδος πολλαπλών εξωτερικών προτύπων /καμπύλης αναφοράς

Βασίζεται στη βαθμονόμηση της μετρητικής διατάξεως και γενικότερα της αναλυτικής μεθόδου με τη χρήση προτύπων διαλυμάτων εργασίας του αναλύτη. Τα πρότυπα διαλύματα μπορεί να είναι είτε καθαρά διαλύματα του αναλύτη στον χρησιμοποιούμενο διαλύτη, είτε παρασκευασμένα στο ίδιο μητρικό υλικό του δείγματος, στην περίπτωση που αυτό επηρεάζει την απόκριση της μεθόδου. Πρέπει να είναι ομοιόμορφα κατανεμημένα στη γραμμική περιοχή και οπωσδήποτε να περικλείουν τις αναμενόμενες συγκεντρώσεις των αγνώστων δειγμάτων. Από τα ζεύγη των τιμών, υπολογίζεται η εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης, που είναι προτιμότερο να διέρχεται από την αρχή των αξόνων και η κλίση της να παραμένει σταθερή, σύμφωνα με την οποία:

$$y = a (\pm S_a) + b (\pm S_b) * C$$

Όπου:

- a:** Η τομή της ευθείας παλινδρόμησης στον άξονα των y
- S_a :** Η τυπική απόκλιση της τομής
- b:** Η κλίση της ευθείας παλινδρόμησης
- S_b :** Η τυπική απόκλιση της κλίσης

Ο υπολογισμός του αγνώστου δείγματος γίνεται είτε γραφικά, είτε υπολογιστικά μέσω της εξίσωσης:

$$C_x = \frac{\text{Εμβαδόν αγνώστου - Τομή}}{\text{Κλίση}}$$

5.3.3. Μέθοδος παρεμβολής

Χρησιμοποιείται όταν η καμπύλη βαθμονόμησης δεν είναι γραμμική και απαιτείται μεγάλος σχετικά αριθμός προτύπων για τη χάραξη της μη γραμμικής καμπύλης βαθμονόμησης. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του αγνώστου δείγματος γίνεται γραφικά, χρησιμοποιώντας το τμήμα της καμπύλης μεταξύ δύο σημείων/προτύπων που περικλείουν το σήμα του αγνώστου και το οποίο τμήμα, χωρίς μεγάλο σφάλμα, θεωρείται γραμμικό. Η συγκέντρωση του αγνώστου δείγματος (C_x), υπολογίζεται μέσω επίλυσης της παρακάτω εξίσωσης:

$$\frac{P_2 - P_x}{C_2 - C_x} = \frac{P_x - P_1}{C_x - C_1}$$

Όπου:

C_1 : Η συγκέντρωση του πρώτου σημείου/ προτύπου διαλύματος

C_2 : Η συγκέντρωση του δεύτερου σημείου/ προτύπου διαλύματος

P_1 : Η απόκριση / σήμα του πρώτου προτύπου διαλύματος

P_2 : Η απόκριση / σήμα του δεύτερου προτύπου διαλύματος

5.3.4. Μέθοδος προσθήκης γνωστής ποσότητας

Εφαρμόζεται στις περιπτώσεις, όπου το μητρικό υλικό του δείγματος ασκεί έντονη επίδραση στη συνάρτηση βαθμονόμησης και δεν είναι δυνατή η παρασκευή προτύπων διαλυμάτων όμοιας σύστασης με τα άγνωστα ή η επίδραση είναι διαφορετική από δείγμα σε δείγμα. Κατά τη μέθοδο αυτή, η άγνωστη τιμή C_x 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, λοιπόν, προκύπτει η σχέση:

$$C_x = \frac{P_0 \times \Delta C}{P_1 - P_0}$$

Όπου:

P_0 : Το αρχικό σήμα του αγνώστου

P_1 : Το τελικό σήμα του αγνώστου

ΔC: Η μεταβολή της συγκέντρωσης

5.3.5. Μέθοδος πολλαπλών γνωστών προσθηκών

Το πρώτο βήμα αυτής της μεθόδου, είναι η μέτρηση του αγνώστου δείγματος, παρέχοντας ένα σήμα P_0 . Στην συνέχεια, σε N ίσα υποδείγματα προστίθενται διαφορετικές γνωστές ποσότητες προτύπου του αναλύτη, χωρίς σημαντική μεταβολή του όγκου, ώστε να προκύψουν γνωστές αυξήσεις ΔC_i που παρέχουν σήματα P_i . Από τα ζεύγη των τιμών (P_i, C_i) , εξάγεται η εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης, σύμφωνα με την οποία:

$$P_i = a + b \times \Delta C_i$$

ενώ η συγκέντρωση του αγνώστου δείγματος υπολογίζεται από την παρακάτω σχέση:

$$C_x = \frac{P_0}{\text{Κλίση}}$$

5.3.6. Μέθοδος μείωσης γνωστής ποσότητας

Αποτελεί μία παραλλαγή της μεθόδου προσθήκης γνωστής ποσότητας, κατά την οποία προστίθεται μια γνωστή ποσότητα ενός αντιδραστηρίου, το οποίο αντιδρώντας με τον αναλύτη - ενδιαφέροντος, οδηγεί σε γνωστή μείωση της συγκέντρωσης του αγνώστου, ΔC .

5.3.7. Μέθοδος εσωτερικού προτύπου

Η μέθοδος αυτή, εφαρμόζεται κυρίως στη περίπτωση που αναμένονται μεταβολές στην ευαισθησία της μετρητικής διατάξεως από μέτρηση σε μέτρηση και σε μη επαναλαμβανόμενη επίδραση του μητρικού υλικού του δείγματος. Η φιλοσοφία της, είναι ότι οι σχετικές αυξομειώσεις της ευαισθησίας της μεθόδου για ένα συστατικό A του δείγματος, θα είναι ίδιες και για το συστατικό B . Στα πρότυπα και στα άγνωστα διαλύματα προστίθεται αυστηρά ίδια συγκέντρωση μιας ουσίας (**εσωτερικό πρότυπο**), που δεν υπάρχει στο δείγμα, με την ίδια σχεδόν αναλυτική συμπεριφορά του αναλύτη. Με τον τρόπο αυτό, μετρούνται τα σήματα P_x και P_{IS} , και ο λόγος τους χρησιμοποιείται ως το “διορθωμένο σήμα” του αγνώστου δείγματος για τη κατασκευή της καμπύλης αναφοράς ή/και τον υπολογισμό του αγνώστου. Έτσι λοιπόν, έχουμε:

$$\frac{P_x}{P_{IS}} = a + b \times C_x$$

Όπου:

P_x: Η απόκριση / σήμα του αγνώστου διαλύματος

P_{is}: Η απόκριση / σήμα του εσωτερικού προτύπου

5.3.8. Μέθοδος κανονικοποίησης

Χρησιμοποιείται στις χρωματογραφικές τεχνικές για τον υπολογισμό της περιεκτικότητας των συστατικών μίγματος ουσιών και καθοριστικό ρόλο παίζουν τα εμβαδά των κορυφών των συστατικών του δείγματος (κλάσμα έκαστου εμβαδού ως προς το συνολικό άθροισμα των εμβαδών), όπου:

$$C_i (\%) = \frac{A_i}{\sum A_i} \times 100$$

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο: ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΕΚΔΟΧΩΝ ΤΗΣ ΠΡΑΣΟΥΓΡΕΛΗΣ

6.1 Εισαγωγή - Σκοπός

Ο σκοπός αυτής της μελέτης αντίστροφης μηχανικής (**Reverse Engineering Studies**), ήταν ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας (% w/w) των εκδόχων που περιέχονται στον πυρήνα του φαρμακευτικού σκευάσματος Effient™. Πιο συγκεκριμένα, τα έκδοχα της μαννιτόλης, της υπρομελλόζης, της μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης και του στεατικού μαγνησίου ποσοτικοποιήθηκαν στον πυρήνα του δισκίου, μετά από προηγούμενη αξιολόγηση της μεθοδολογίας που χρησιμοποιήθηκε, όσον αφορά τη καταλληλότητα και εφαρμοσιμότητά της. Η περιεκτικότητα της κροσκαρμελλόζης, ωστόσο, υπολογίστηκε εκ διαφοράς των υπολοίπων εκδόχων.

Οι αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των προαναφερθέντων εκδόχων επικυρώθηκαν όσον αφορά χαρακτηριστικά, όπως η ειδικότητα, το όριο ποσοτικοποίησης, η γραμμικότητα, το εύρος γραμμικής περιοχής, η ακρίβεια και η πιστότητα.

Η σύγκριση του φαρμακευτικού προϊόντος Effient™, προερχόμενο από δύο διαφορετικούς τρόπους παραγωγής, από την Ευρώπη και την Αυστραλία, πραγματοποιήθηκε με ανάλυση των δειγμάτων που περιγράφονται στον ακόλουθο πίνακα.

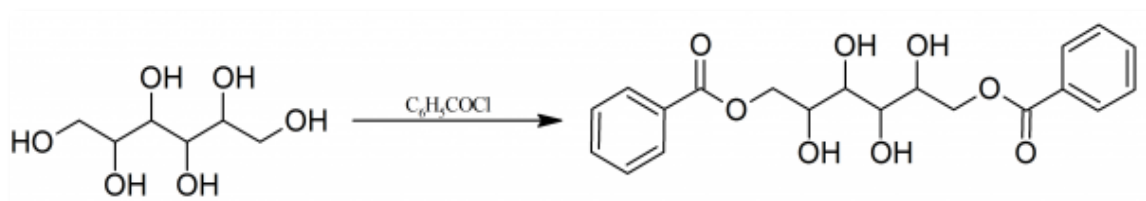
Πίνακας 6.1: Δείγματα προς ανάλυση, προερχόμενα από την Αυστραλία και την Ευρώπη

Όνομα προϊόντος	Χώρα προέλευσης / διανομής	Lot.
Effient™ 10 mg	Αυστραλία	C804457
		C745139
Effient™ 10 mg	Ευρώπη	C910328
		C889119

6.2 Οργανολογία, αντιδραστήρια και πειραματική πορεία

6.2.1 Προσδιορισμός της Μαννιτόλης

Ο προσδιορισμός της μαννιτόλης βασίζεται στην αντίδραση παραγωγοποίησής της με **βενζοϋλοχλωρίδιο**. Το προϊόν που σχηματίζεται από την αντίδραση αυτή, χαρακτηρίζεται από έντονο συζυγικό φαινόμενο, με αποτέλεσμα να προσφέρει έντονη απορρόφηση στο υπεριώδες φως, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 6.1: Αντίδραση παραγωγοποίησης της Μαννιτόλης με βενζοϋλοχλωρίδιο

Κατά τον προσδιορισμό, λοιπόν, της μαννιτόλης χρησιμοποιήθηκε ένα χρωματογραφικό σύστημα HPLC σειράς VP της εταιρείας Shimadzu, το οποίο απαρτιζόταν από μία αντλία δύο πιστονίων τύπου LC-20 AB, έναν αυτόματο δειγματολήπτη SIL-20AC, έναν φούρνο για τη ρύθμιση της θερμοκρασίας της στήλης τύπου CTO-20AC, έναν απαερωτή κινητής φάσης DGU-20A₃ και τέλος, έναν ανιχνευτή υπεριώδους και ορατού, τύπου SPD-20A, εξοπλισμένο με λυχνίες δευτερίου (D) και βολφραμίου (W), όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 6.2: Χρωματογραφικό σύστημα HPLC σειράς VP της εταιρείας Shimadzu

Το συγκεκριμένο χρωματογραφικό σύστημα ήταν συνδεδεμένο με ξεχωριστό υπολογιστή, στον οποίο ήταν εγκατεστημένο το λογισμικό Lab Solutions (v.1.11 SP1) της εταιρείας Shimadzu για τον έλεγχο της λειτουργίας του συστήματος, τη καταγραφή, την επεξεργασία και την αποθήκευση των χρωματογραφημάτων.

Αναλυτική στήλη	BDS Hypersil C18 , 250 x 4.6 mm, 5 μm, Thermo Scientific
Πρότυπη ουσία / Έκδοχο	Μαννιτόλη, καθαρότητας 99,6 %, Merck
Αντιδραστήρια	Ακετονιτρίλιο (Καθαρότητας HPLC, Fischer) Μυρμηκικό Αμμώνιο (Καθαρότητας HPLC, Fischer) Μυρμηκικό οξύ (99 %, Carlo Erba) Υδροξείδιο του νατρίου (Αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, Sigma) Εξάνιο (Αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, Fischer) Βενζοϋλοχλωρίδιο (99 %, Sigma) Υπερκάθαρο νερό (Καθαρότητας HPLC)
Αντιδραστήριο παραγ/ποίησης	Βενζοϋλοχλωρίδιο
Χρωματογραφικές Παράμετροι	Κινητή φάση A: Υδατικό διάλυμα Μυρμηκικού Αμμωνίου, 10 mM Κινητή φάση B: Ακετονιτρίλιο Όγκος ένεσης: 10 μL Ροή κινητών φάσεων: 1,3 mL/min Θερμοκρασία φούρνου: 40 °C Χρόνος ανάλυσης: 35 min Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης:

Χρόνος (min)	Κινητή φάση A (% v/v)	Κινητή φάση B (% v/v)
0.01	70	30
2.0	70	30
8.0	20	80
18.0	5	95
25.0	70	30
35.0	70	30

Παράμετροι απορρόφησης	Κυματαριθμός, λ: 274 nm
Διάλυμα Μυρμηκικού Αμμωνίου, 10 mM	<p>Η παρασκευή του υδατικού διαλύματος Μυρμηκικού Αμμωνίου, που χρησιμοποιήθηκε ως η κινητή φάση A, περιγράφεται ως εξής:</p> <p>Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 0,63 g Μυρμηκικού Αμμωνίου και μεταφέρθηκαν σε μία ογκομετρική φιάλη του 1 L. Διαλύθηκαν σε νερό και αραιώθηκαν μέχρι χαραγής με τον ίδιο διαλύτη. Η ρύθμιση του pH της κινητής φάσης σε τιμή ίση με 3,50, έγινε με την χρησιμοποίηση του μυρμηκικού οξέος, ενώ η κινητή φάση διηθήθηκε υπό κενό μέσω ενός φίλτρου 0.45 μm PVDF membrane της Millipore.</p>
Διάλυμα Υδροξειδίου του Νατρίου, 4 N	<p>Το συγκεκριμένο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε για την επίτευξη βασικών συνθηκών κατά την αντίδραση παραγωγοποίησης.</p> <p>Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 8,0 g Υδροξειδίου του Νατρίου και μεταφέρθηκαν σε μία ογκομετρική φιάλη των 50 mL. Πραγματοποιήθηκε διάλυση σε νερό και αραιώση μέχρι χαραγής με τον ίδιο διαλύτη.</p>
Διαλύτης	Μεταφέρθηκαν 30 mL από το διάλυμα του Μυρμηκικού Αμμωνίου σε μία ογκομετρική φιάλη των 100 mL και έγινε αραιώση μέχρι χαραγής με ακετονιτρίλιο.
Πειραματική πορεία	<p>Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε, για τον προσδιορισμό της μαννιτόλης, περιελάμβανε τα ακόλουθα στάδια:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Αφαιρέθηκε προσεκτικά η επικάλυψη από επτά (7) δισκία και τα δισκία αυτά αλέστηκαν για τον σχηματισμό μιας λεπτής μορφής σκόνης. 2. Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 100 mg της παραγόμενης σκόνης σε μια ογκομετρική φιάλη των 50 mL. 3. Διαλύθηκαν σε 20 mL νερό, πραγματοποιήθηκε ανάδευση για 15 min και αραιώθηκαν μέχρι χαραγής με νερό. 4. Μεταφέρθηκε μία ποσότητα του προηγούμενου διαλύματος σε έναν φυγοκεντρικό σωλήνα των 15 mL και φυγοκεντρήθηκε στις 6000 στροφές για 5 min. 5. Μεταφέρθηκαν 100,0 μL του υπερκείμενου υγρού σε φιαλίδιο

χωρητικότητας 20 mL, προστέθηκε 1,0 mL διαλύματος Υδροξειδίου του Νατρίου και ακολούθησε έντονη ανάδευση.

6. Προστέθηκαν 200,0 mL του **αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης**, βενζοϋλοχλωριδίου, και 3,0 mL εξανίου και αναμείχθηκαν καλά για 10 s. Το φιαλίδιο σφραγίστηκε και ακολούθησε έντονη ανάδευση.

7. Το φιαλίδιο μεταφέρθηκε σε φούρνο, ρυθμισμένο στους 55 °C, για 1 h.

8. Μετά το πέρας της 1 h, το φιαλίδιο αφαιρέθηκε από τον φούρνο και αφέθηκε να κρυώσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

9. Αφαιρέθηκε το καπάκι και τα περιεχόμενα μεταφέρθηκαν σε έναν φυγοκεντρικό σωλήνα των 15 mL. Τα υπολείμματα του φιαλιδίου εκπλύθηκαν με 1,0 mL καθαρού νερού, ενώ το έκπλυμα μεταφέρθηκε στον ίδιο φυγοκεντρικό σωλήνα. Προστέθηκαν 5,0 mL εξανίου, τοποθετήθηκε καπάκι στον φυγοκεντρικό σωλήνα, και σχηματίστηκε ένα διφασικό σύστημα. Ακολούθησε έντονη ανάδευση για 5 min.

10. Μεταφέρθηκαν 2,0 mL της πάνω στοιβάδας σε έναν γυάλινο σωλήνα και εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού στους 50 °C, μέσω αερίου αζώτου.

11. Προστέθηκε 1,5 mL διαλύτη και ακολούθησε έντονη ανάδευση για μερικά δευτερόλεπτα, για την επαναδιάλυση του υπολείμματος, δηλαδή την ανασύστασή του. Τέλος, το διάλυμα που προέκυψε, μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο δειγματοληψίας για ανάλυση.

Παρασκευάσθηκαν 3 ανεξάρτητα υποδείγματα για κάθε δείγμα.

Λευκό διάλυμα Ακολουθήθηκε η πορεία που περιγράφεται παραπάνω, αρχίζοντας ωστόσο, από το βήμα (5) και αντικαθιστώντας το υπερκείμενο υγρό με 100,0 mL καθαρού νερού.

Πρότυπο διάλυμα Μαννιτόλης (STD, 10,0 µg/mL) Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 30,0 mg Μαννιτόλης σε μια ογκομετρική φιάλη των 50 mL και ακολουθήθηκε η πορεία που περιγράφεται παραπάνω, αρχίζοντας ωστόσο, από το βήμα (3).

Έλεγχος καταλληλότητας συστήματος Για τον έλεγχο καταλληλότητας του συστήματος, πραγματοποιήθηκε ένεση του προτύπου της Μαννιτόλης (STD), έξι συνεχόμενες φορές. Ταυτοποιήθηκε η κορυφή που αποδίδεται

στην Μαννιτόλη (περίπου στα 16,5 min) και υπολογίσθηκε η % σχετική τυπική απόκλιση (Relative Standard Deviation - RSD) της απόκρισης που λαμβάνεται από τις έξι αυτές συνεχόμενες ενέσεις του προτύπου διαλύματος.

Αποδεκτά κριτήρια: Η τιμή της % RSD, δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 15.

Ποσοτικοποίηση

Η περιεκτικότητα της Μαννιτόλης (% w/w) στο τελικό φαρμακευτικό προϊόν προσδιορίστηκε με τη χρήση της τεχνικής του ενός εξωτερικού προτύπου, μέσω της παρακάτω σχέσης:

$$\text{Mannitol (\% w/w)} = 100 \times \frac{A_{\text{Test}} \times C_{\text{STD}} \times V_{\text{Test}}}{A_{\text{STD}} \times W_{\text{Test}}} \times 10^{-6} \text{ } \mu\text{g/g}$$

Όπου:

A_{Test}: Η απόκριση της Μαννιτόλης στο διάλυμα του δείγματος

A_{STD}: Η απόκριση της Μαννιτόλης στο πρότυπο διάλυμα

C_{STD}: Η συγκέντρωση του προτύπου διαλύματος, εκφρασμένη σε μg/mL

V_{Test}: Ο παράγοντας αραίωσης (Dilution Factor - DF), που υπολογίζεται ως εξής:

$$DF = \frac{V_{\text{Reconst}}}{V_{\text{Acquired}}} \times \frac{V_{\text{Extraction}}}{V_{\text{Acquired for Deriv.}}} \times V_{\text{1st Dilution}} = \frac{1.5}{2.0} \times \frac{8.0}{0.100} \times 50 = 3000$$

W_{Test}: Το βάρος (g) της σκόνης που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των διαλυμάτων του δείγματος.

6.2.1.1 Επικύρωση της μεθόδου

Ειδικότητα

Κατά την αξιολόγηση της ειδικότητας, πέραν της χρησιμοποίησης του διαλύτη και του προτύπου διαλύματος της μαννιτόλης, παρασκευάσθηκε και ένα διάλυμα ειδικότητας (Specificity solution), δηλαδή ένα μείγμα των εκδόχων που περιέχονται στο τελικό φαρμακευτικό προϊόν, η πειραματική πορεία του οποίου περιγράφεται ως εξής:

Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 1,25 g Γλυκερόλης, 0,5 g Μονοϋδρικής Λακτόζης και 0,25 g Υπρομελλόζης σε γουδί και ακολούθησε έντονη ανάδευση για την δημιουργία ομοιογενούς σκόνης. Μεταφέρθηκαν 100 mg του μείγματος σε μία ογκομετρική φιάλη των 50 mL και ακολουθήθηκε η πορεία που περιγράφεται παραπάνω, αρχίζοντας ωστόσο, από το βήμα (3).

Η σειρά και ο αριθμός των ενέσεων, περιγράφεται στον Πίνακα 6.2:

Πίνακας 6.2: Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν, κατά τον έλεγχο της ειδικότητας (Μαννιτόλη)

Διάλυμα	Αριθμός ενέσεων
Λευκό διάλυμα	1
Διάλυμα Ειδικότητας	1
Πρότυπο διάλυμα, STD	1

Αποδεκτά κριτήρια: Καμία κορυφή δεν πρέπει να καταγράφεται στο χρόνο έκλουσης της Μαννιτόλης, κατά την ανάλυση τόσο του λευκού, όσο και του διαλύματος ειδικότητας.

Γραμμικότητα / Εύρος γραμμικής περιοχής

Κατά την αξιολόγηση της γραμμικότητας και του εύρους της γραμμικής περιοχής, παρασκευάσθηκαν τα ακόλουθα πρότυπα διαλύματα:

Πρότυπο διάλυμα Α (STD-A, 2,5 µg/mL): Ζυγίστηκαν με ακρίβεια **7,5** mg Μαννιτόλης σε μία ογκομετρική φιάλη των 50 mL και ακολουθήθηκε η πορεία που περιγράφεται παραπάνω, αρχίζοντας ωστόσο, από το βήμα (3).

Πρότυπο διάλυμα Β (STD-B, 5,0 µg/mL): Ζυγίστηκαν με ακρίβεια **15,0** mg Μαννιτόλης σε μία ογκομετρική φιάλη των 50 mL και ακολουθήθηκε η πορεία που περιγράφεται παραπάνω, αρχίζοντας ωστόσο, από το βήμα (3).

Πρότυπο διάλυμα C (STD-C, 10,0 µg/mL): Ζυγίστηκαν με ακρίβεια **30,0** mg Μαννιτόλης σε μία ογκομετρική φιάλη των 50 mL και ακολουθήθηκε η πορεία που περιγράφεται παραπάνω, αρχίζοντας ωστόσο, από το βήμα (3).

Πρότυπο διάλυμα D (STD-D, 15,0 µg/mL): Ζυγίστηκαν με ακρίβεια **45,0** mg Μαννιτόλης σε μία ογκομετρική φιάλη των 50-mL και ακολουθήθηκε η πορεία που περιγράφεται παραπάνω, αρχίζοντας ωστόσο, από το βήμα (3).

Πρότυπο διάλυμα E (STD-E, 20,0 µg/mL): Ζυγίστηκαν με ακρίβεια **60,0** mg Μαννιτόλης σε μία ογκομετρική φιάλη των 50 mL και ακολουθήθηκε η πορεία που περιγράφεται παραπάνω, αρχίζοντας ωστόσο, από το βήμα (3).

Αναλύθηκαν τα πρότυπα διαλύματα που παρασκευάστηκαν και σχεδιάστηκε μία καμπύλη βαθμονόμησης της απόκρισης των προτύπων αυτών, σε συνάρτηση με την συγκέντρωσή τους στο τελικό διάλυμα. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των ελαχίστων τετραγώνων, από την οποία προέκυψε η εξίσωση παλινδρόμησης, μέσω της οποίας υπολογίστηκε ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2), η κλίση και η τομή.

Αποδεκτά κριτήρια: Η εξίσωση παλινδρόμησης πρέπει να είναι γραμμική, ενώ ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2) πρέπει να είναι $\geq 0,98$.

Το εύρος της γραμμικής περιοχής προέκυψε από τη μελέτη της γραμμικότητας.

Αποδεκτά κριτήρια: Η % Ανάκτηση (Recovery) της συγκέντρωσης της Μαννιτόλης στα πρότυπα διαλύματα της καμπύλης, πρέπει να κυμαίνεται από 80-120 %.

Όριο ποσοτικοποίησης

Όριο ποσοτικοποίησης ορίζεται ως το χαμηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης στο οποίο επιβεβαιώνεται ο ποσοτικός προσδιορισμός της αναλυόμενης ουσίας. Στην προκειμένη περίπτωση, η συγκέντρωση αυτή είναι 2,5 μg Μαννιτόλης/mL τελικού διαλύματος, που αντιστοιχεί περίπου σε περιεκτικότητα 7,5 % w/w.

Κατά τον αξιολόγησή λοιπόν, του ορίου ποσοτικοποίησης, παρασκευάστηκε το **Πρότυπο διάλυμα A** (STD-A, 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), όπως περιγράφεται παραπάνω, και ενίθηκε πέντε (5) φορές.

Αποδεκτά κριτήρια:

1. Ο λόγος σήματος προς θόρυβο (Signal-to-noise ratio, S/N) σε κάθε διαφορετική ένεση του STD-A, πρέπει να είναι πάνω από 10.
2. Η % RSD της απόκρισης της Μαννιτόλης από τις πέντε (5) συνεχόμενες επαναλήψεις του STD-A, πρέπει να είναι ≤ 20 .
3. Η % Recovery της υπολογισθείσας συγκέντρωσης, πρέπει να κυμαίνεται από 80-120 %.

Ακρίβεια

Κατά την αξιολόγησή της ακρίβειας, παρασκευάστηκαν τρία (3) ανεξάρτητα Spiked διαλύματα, η πειραματική πορεία των οποίων, περιγράφεται ως εξής:

Εμβολιασμένο - Spiked διάλυμα (SpS, Επίπεδο εμβολιασμού: 10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ισοδύναμο με 300,0 mg/g πυρήνα): Αφαιρέθηκε προσεκτικά η επικάλυψη από επτά (7) δισκία και τα δισκία αυτά αλέστηκαν για τον σχηματισμό μιας λεπτής μορφής σκόνης. Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 100 mg της παραγόμενης σκόνης σε μία ογκομετρική φιάλη των 50 mL και **προστέθηκαν 30,0 mg Μαννιτόλης**. Αναδεύτηκαν έντονα και ακολουθήθηκε η πορεία που περιγράφεται παραπάνω, αρχίζοντας ωστόσο, από το βήμα (3).

Υπολογίστηκε η % Ανάκτηση (Recovery) κάθε εμβολιασμένου διαλύματος και η % Σχετική τυπική απόκλιση (RSD) των ανακτήσεων αυτών, μέσω της παρακάτω σχέσης:

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\% \text{ Content Spiked} - \% \text{ Content Background}}{\text{Fortification Level}} \times 100$$

Όπου:

% Content_{Spiked}: Η εκτιμώμενη % περιεκτικότητα (w/w) της Μαννιτόλης, στο εμβολιασμένο διάλυμα.

% Content_{Background}: Η υπολογισθείσα % περιεκτικότητα (w/w) της Μαννιτόλης, στο τελικό διάλυμα του δείγματος (Unspiked).

Fortification Level: Το επίπεδο εμβολιασμού με βάση τη ποσότητα της Μαννιτόλης που προστέθηκε στα αντίστοιχα εμβολιασμένα διαλύματα. Μπορεί να υπολογισθεί σε κάθε εμβολιασμένο διάλυμα, μέσω της παρακάτω εξίσωσης και χρησιμοποιώντας το βάρος του εκδόχου, εκφρασμένο σε mg, ως εξής:

$$\text{Mannitol added (\% Content, w/w)} = \frac{W_{\text{Mannitol - added (mg)}}}{W_{\text{powder (mg)}}} \times 100$$

Όπου:

$W_{\text{Mannitol-added}}$: Η ποσότητα της Μαννιτόλης που προστέθηκε, σε mg.

W_{powder} : Η ποσότητα της σκόνης του σκευάσματος, σε mg

Αποδεκτά κριτήρια:

1. Η % Ανάκτηση των Spiked διαλυμάτων, πρέπει να κυμαίνεται από 80-120 %.
2. Η % RSD των ανακτήσεων, πρέπει να είναι ≤ 15 .

Πιστότητα

Επαναληψιμότητα

Κατά την αξιολόγηση της επαναληψιμότητας, παρασκευάστηκαν έξι (6) ανεξάρτητα εμβολιασμένα διαλύματα, η πειραματική πορεία των οποίων, περιγράφεται παραπάνω, και υπολογίστηκε τόσο η % ανάκτησή τους, όσο και η % σχετική τυπική απόκλιση των ανακτήσεων αυτών.

Ενδιάμεση πιστότητα

Τέλος, κατά την αξιολόγηση της ενδιάμεσης πιστότητας, παρασκευάσθηκαν τρία (3) ακόμη, ανεξάρτητα εμβολιασμένα διαλύματα, σε διαφορετική ωστόσο, εργαστηριακή μέρα.

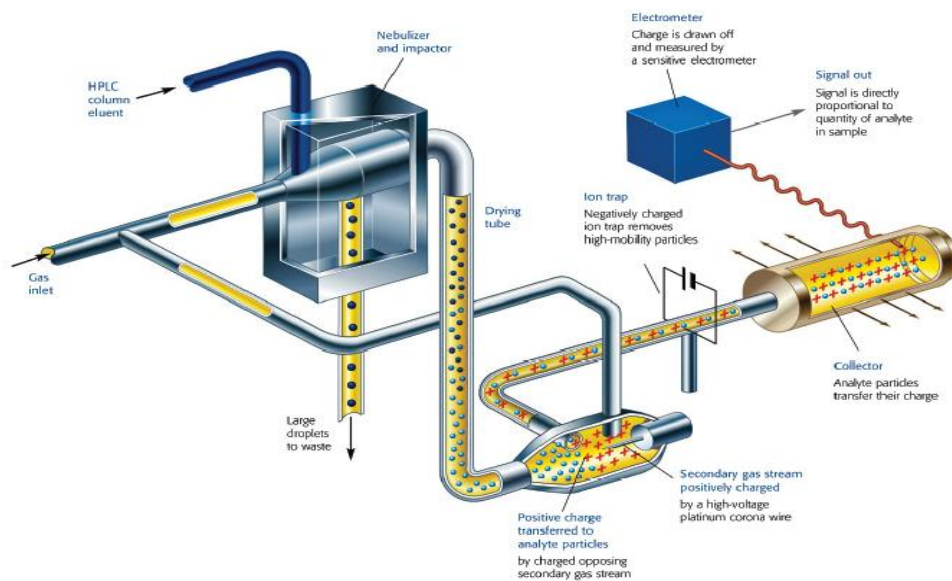
Αποδεκτά κριτήρια:

1. Η % RSD των ανακτήσεων, κατά τον έλεγχο της επαναληψιμότητας, πρέπει να είναι ≤ 15 .
2. Η % RSD των ανακτήσεων, κατά τον έλεγχο της ενδιάμεσης πιστότητας, πρέπει να είναι ≤ 15 .
3. Η συνολική % RSD των ανακτήσεων (9 ενέσεις), πρέπει να είναι ≤ 20 .

6.2.2 Προσδιορισμός της Υπρομελλόζης

Ο προσδιορισμός της υπρομελλόζης, λόγω έλλειψης χρωμοφόρου τμήματος, βασίζεται στην ανίχνευση των φορτισμένων σωματιδίων του αερολύματός της, μέσω ενός ηλεκτρομετρητή. Ο συνηθέστερος ανιχνευτής για την λειτουργία αυτή, είναι ο ανιχνευτής φορτισμένων αερολυμάτων (**Charged Aerosol Detector - CAD**), που χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και μπορεί να ποσοτικοποιήσει όλους του μη πτητικούς και τους περισσότερους ημι-πτητικούς αναλύτες.

Η λειτουργία του συγκεκριμένου ανιχνευτή, περιλαμβάνει τη νεφελοποίηση του εκλούσματος της αναλυτικής στήλης για τον σχηματισμό του αερολύματος, τον κλιματισμό του αερολύματος για την απομάκρυνση των μεγάλων σταγονιδίων, την εξάτμιση του διαλύτη για τον σχηματισμό ξηρών σωματιδίων, τη φόρτισή τους χρησιμοποιώντας ρεύμα ιόντων, μέσω εκφόρτισης κορώνας, την επιλογή των φορτισμένων σωματιδίων υψηλής κινητικότητας και τέλος, την μέτρηση του συνολικού φορτίου που φέρουν, μέσω ενός ηλεκτρομετρητή, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα^[70,71,72]:



Εικόνα 6.3: Αρχή λειτουργίας του ανιχνευτή φορτισμένων αερολυμάτων (CAD)

Κατά τον προσδιορισμό, λοιπόν, της υπρομελλόζης χρησιμοποιήθηκε ένα χρωματογραφικό σύστημα HPLC σειράς VP της εταιρείας Shimadzu, το οποίο απαρτιζόταν από μία αντλία δύο πιστονίων τύπου LC-10 AB, έναν αυτόματο δειγματολήπτη SIL-20AC, έναν φούρνο για τη ρύθμιση της θερμοκρασίας της στήλης τύπου CTO-6A, έναν απασερωτή Ηλίου και τέλος, τόσο έναν ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (Refractive Index Detector - RID), όσο και τον ανιχνευτή φορτισμένων αερολυμάτων (Charged Aerosol Detector - CAD), που αναφέρθηκε προηγουμένως.

Το συγκεκριμένο χρωματογραφικό σύστημα ήταν συνδεδεμένο με ξεχωριστό υπολογιστή, στον οποίο ήταν εγκατεστημένο το λογισμικό Lab Solutions (v.1.11 SP1) της εταιρείας Shimadzu για τον έλεγχο της λειτουργίας του συστήματος, τη καταγραφή, την επεξεργασία και την αποθήκευση των χρωματογραφημάτων.

Αναλυτική στήλη	Ultra-hydrogel linear C18 , 300 x 7.8 mm, 10 μm, Waters
Πρότυπη ουσία / Έκδοχο	Υπρομελλόζη, καθαρότητας 99,3 %, Sigma Aldrich
Αντιδραστήρια	Μεθανόλη (Καθαρότητας HPLC, Fischer) Οξικό οξύ (Αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, Fischer) Οξικό αμμώνιο (Αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, Fischer) Υπερκάθαρο νερό (Καθαρότητας HPLC)

Χρωματογραφικές Παράμετροι Κινητή φάση A: Υδατικό διάλυμα Οξικού αμμωνίου, 100 mM
Κινητή φάση B: Μεθανόλη
Διάλυμα αυτόματου δειγματολήπτη: Υπερκάθαρο νερό
Όγκος ένεσης: 20 μ L
Ροή κινητών φάσεων: 1,3 mL/min
Θερμοκρασία φούρνου: 70 °C
Θερμοκρασία αυτόματου δειγματολήπτη: 25 °C
Χρόνος ανάλυσης: 30 min
Πρόγραμμα ισοκρατικής έκλουσης:

Χρόνος (min)	Κινητή φάση A (%v/v)	Κινητή φάση B (%v/v)
0.01	60	40
30.0	60	40

Διαλύτης Υπερκάθαρο νερό

Διάλυμα Οξικού Αμμωνίου, 100 mM Η παρασκευή του υδατικού διαλύματος Οξικού Αμμωνίου, που χρησιμοποιήθηκε ως η κινητή φάση A, περιγράφεται ως εξής:

Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 7,7 g Οξικού Αμμωνίου και μεταφέρθηκαν σε μία ογκομετρική φιάλη του 1 L. Διαλύθηκαν σε νερό και αραιώθηκαν μέχρι χαραγής με τον ίδιο διαλύτη. Η ρύθμιση του pH της κινητής φάσης σε τιμή ίση με 6,00, έγινε με τη χρησιμοποίηση του οξικού οξέος, ενώ η κινητή φάση διηθήθηκε υπό κενό μέσω ενός φίλτρου 0.45 μ m PVDF membrane της Millipore.

Πειραματική πορεία Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε, για τον προσδιορισμό της υπρομελλόζης, περιελάμβανε τα ακόλουθα στάδια:

1. Αφαιρέθηκε προσεκτικά η επικάλυψη από επτά (7) δισκία και τα δισκία αυτά αλέστηκαν για τον σχηματισμό μιας λεπτής μορφής σκόνης.
2. Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 100 mg της παραγόμενης σκόνης σε μια ογκομετρική φιάλη των 50 mL.
3. Διαλύθηκαν σε 20 mL νερό, πραγματοποιήθηκε ανάδευση για 2 min και αραιώθηκαν μέχρι χαραγής με νερό.
4. Μεταφέρθηκε ολόκληρη η ποσότητα του προηγούμενου διαλύματος σε έναν φυγοκεντρικό σωλήνα των 50 mL και φυγοκεντρήθηκε στις 6000 στροφές για 5 min. Τέλος, ένα μέρος του υπερκείμενου υγρού που προέκυψε, μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο δειγματοληψίας για ανάλυση.

Παρασκευάστηκαν 3 ανεξάρτητα υποδείγματα για κάθε δείγμα.

Λευκό διάλυμα Υπερκάθαρο νερό

Stock διάλυμα Υπρομελλόζης (SS, 1,0 mg/mL) Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 25,0 mg Υπρομελλόζης σε μια ογκομετρική φιάλη των 25 mL. Διαλύθηκαν σε νερό και αραιώθηκαν μέχρι χαραγής με τον ίδιο διαλύτη.

Πρότυπο διάλυμα Υπρομελλόζης (STD, 100 µg/mL) Μεταφέρθηκε 1,0 mL από το Stock διάλυμα της Υπρομελλόζης σε μια ογκομετρική φιάλη των 10 mL και αραιώθηκε μέχρι χαραγής με νερό. Ακολούθησε έντονη ανάδευση για 30 s και ένα μέρος του διαλύματος αυτού μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο δειγματοληψίας για ανάλυση.

Έλεγχος καταλληλότητας συστήματος Για τον έλεγχο καταλληλότητας του συστήματος, πραγματοποιήθηκε ένεση του προτύπου διαλύματος της Υπρομελλόζης (STD), έξι συνεχόμενες φορές. Ταυτοποιήθηκε η κορυφή που αποδίδεται στην Υπρομελλόζη (περίπου στα 10,0 min) και υπολογίστηκε η % σχετική τυπική απόκλιση (Relative Standard Deviation - RSD) της απόκρισης που λαμβάνεται από τις έξι αυτές συνεχόμενες ενέσεις του προτύπου διαλύματος.

Αποδεκτά κριτήρια: Η τιμή της % RSD, δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 15.

Ποσοτικοποίηση

Η περιεκτικότητα της Υπρομελλόζης (% w/w) στο τελικό φαρμακευτικό προϊόν προσδιορίστηκε με τη χρήση της τεχνικής του ενός εξωτερικού προτύπου, μέσω της παρακάτω σχέσης:

$$\text{Hypromellose (\% w/w)} = 100 \times \frac{A_{\text{Test}} \times C_{\text{STD}} \times V_{\text{Test}}}{A_{\text{STD}} \times W_{\text{Test}}} \times 10^{-6} \text{ } \mu\text{g/g}$$

Όπου:

- A_{Test}:** Η απόκριση της Υπρομελλόζης στο διάλυμα του δείγματος
- A_{STD}:** Η απόκριση της Υπρομελλόζης στο πρότυπο διάλυμα
- C_{STD}:** Η συγκέντρωση του προτύπου διαλύματος, εκφρασμένη σε μg/mL
- V_{Test}:** Ο παράγοντας αραίωσης (Dilution Factor - DF), που ισούται με 50 mL
- W_{Test}:** Το βάρος (g) της σκόνης που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των διαλυμάτων του δείγματος.

6.2.2.1 Επικύρωση της μεθόδου

Ειδικότητα

Κατά την αξιολόγηση της ειδικότητας, πέραν της χρησιμοποίησης του διαλύτη και του προτύπου διαλύματος της υπρομελλόζης, παρασκευάστηκε και ένα διάλυμα ειδικότητας (Specificity solution), δηλαδή ένα μείγμα των εκδόχων που περιέχονται στο τελικό φαρμακευτικό προϊόν, η πειραματική πορεία του οποίου, περιγράφεται ως εξής:

Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 10,0 mg Μαννιτόλης, 10,0 mg Μονοϋδρικής Λακτόζης και 25,0 mg Γλυκερόλης και μεταφέρθηκαν σε μια ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Διαλύθηκαν σε νερό, αραιώθηκαν μέχρι χαραγής με τον ίδιο διαλύτη και ακολούθησε έντονη ανάδευση για 2 min. Ένα μέρος του διαλύματος αυτού μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο δειγματοληψίας για ανάλυση.

Η σειρά και ο αριθμός των ενέσεων, περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 6.3: Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον έλεγχο της ειδικότητας (Υπρομελλόζη)

Διάλυμα	Αριθμός ενέσεων
Λευκό διάλυμα	1
Διάλυμα Ειδικότητας	1
Πρότυπο διάλυμα, STD	1

Αποδεκτά κριτήρια: Καμία κορυφή δεν πρέπει να καταγράφεται στο χρόνο έκλουσης της Υπρομελλόζης, κατά την ανάλυση τόσο του λευκού, όσο και του διαλύματος ειδικότητας.

Γραμμικότητα / Εύρος γραμμικής περιοχής

Κατά την αξιολόγηση της γραμμικότητας και του εύρους της γραμμικής περιοχής, παρασκευάστηκαν τα ακόλουθα πρότυπα διαλύματα:

Πρότυπο διάλυμα A (STD-A, 25 µg/mL): Μεταφέρθηκαν **0,250 mL** από το Stock διάλυμα της Υπρομελλόζης σε μια ογκομετρική φιάλη των 10 mL και αραιώθηκαν μέχρι χαραγής με νερό. Ακολούθησε έντονη ανάδευση για 30 s και ένα μέρος του διαλύματος αυτού μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο δειγματοληψίας για ανάλυση.

Πρότυπο διάλυμα B (STD-B, 50 µg/mL): Μεταφέρθηκαν **0,500 mL** από το Stock διάλυμα της Υπρομελλόζης σε μια ογκομετρική φιάλη των 10 mL και αραιώθηκαν μέχρι χαραγής με νερό. Ακολούθησε έντονη ανάδευση για 30 s και ένα μέρος του διαλύματος αυτού μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο δειγματοληψίας για ανάλυση.

Πρότυπο διάλυμα C (STD-C, 100 µg/mL): Μεταφέρθηκαν **1,0 mL** από το Stock διάλυμα της Υπρομελλόζης σε μια ογκομετρική φιάλη των 10 mL και αραιώθηκαν μέχρι χαραγής με νερό. Ακολούθησε έντονη ανάδευση για 30 s και ένα μέρος του διαλύματος αυτού μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο δειγματοληψίας για ανάλυση.

Πρότυπο διάλυμα D (STD-D, 150 µg/mL): Μεταφέρθηκαν **1,5 mL** από το Stock διάλυμα της Υπρομελλόζης σε μια ογκομετρική φιάλη των 10 mL και αραιώθηκαν μέχρι χαραγής με νερό. Ακολούθησε έντονη ανάδευση για 30 s και ένα μέρος του διαλύματος αυτού μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο δειγματοληψίας για ανάλυση.

Πρότυπο διάλυμα E (STD-E, 200 µg/mL): Μεταφέρθηκαν **2,0 mL** από το Stock διάλυμα της Υπρομελλόζης σε μια ογκομετρική φιάλη των 10 mL και αραιώθηκαν μέχρι χαραγής με νερό. Ακολούθησε έντονη ανάδευση για 30 s και ένα μέρος του διαλύματος αυτού μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο δειγματοληψίας για ανάλυση.

Αναλύθηκαν τα πρότυπα διαλύματα που παρασκευάστηκαν και σχεδιάστηκε μία καμπύλη βαθμονόμησης της απόκρισης των προτύπων αυτών, σε συνάρτηση με την συγκέντρωσή τους στο τελικό διάλυμα. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των ελαχίστων τετραγώνων, από την οποία προέκυψε η εξίσωση παλινδρόμησης, μέσω της οποίας υπολογίστηκε ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2), η κλίση και η τομή.

Αποδεκτά κριτήρια: Η εξίσωση παλινδρόμησης πρέπει να είναι γραμμική, ενώ ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2) πρέπει να είναι $\geq 0,98$.

Το εύρος της γραμμικής περιοχής προέκυψε από τη μελέτη της γραμμικότητας.

Αποδεκτά κριτήρια: Η % Ανάκτηση (Recovery) της συγκέντρωσης της Μαννιτόλης στα πρότυπα διαλύματα της καμπύλης, πρέπει να κυμαίνεται από 80-120 %.

Όριο ποσοτικοποίησης

Όριο ποσοτικοποίησης ορίζεται ως το χαμηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης στο οποίο επιβεβαιώνεται ο ποσοτικός προσδιορισμός της αναλυόμενης ουσίας. Στην προκειμένη περίπτωση, η συγκέντρωση αυτή είναι 25 μg Υπρομελλόζης/mL τελικού διαλύματος, που αντιστοιχεί περίπου σε περιεκτικότητα 1,25 % w/w.

Κατά τον αξιολόγηση λοιπόν, του ορίου ποσοτικοποίησης, παρασκευάσθηκε το **Πρότυπο διάλυμα Α** (STD-A, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), όπως περιγράφεται παραπάνω, και ενίθηκε πέντε (5) φορές.

Αποδεκτά κριτήρια:

1. Ο λόγος σήματος προς θόρυβο (Signal-to-noise ratio, S/N) σε κάθε διαφορετική ένεση του STD-A, πρέπει να είναι πάνω από 10.
2. Η % RSD της απόκρισης της Υπρομελλόζης από τις πέντε (5) συνεχόμενες επαναλήψεις του STD-A, πρέπει να είναι ≤ 20 .
3. Η % Ανάκτηση της υπολογισθείσας συγκέντρωσης, πρέπει να είναι κυμαίνεται από 80-120 %.

Ακρίβεια

Κατά την αξιολόγηση της ακρίβειας, παρασκευάσθηκαν τρία (3) ανεξάρτητα Spiked διαλύματα, η πειραματική πορεία των οποίων, περιγράφεται ως εξής:

Εμβολιασμένο - Spiked διάλυμα (SpS, Επίπεδο εμβολιασμού: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ισοδύναμο με περιεκτικότητα ίση με 5 % w/w): Αφαιρέθηκε προσεκτικά η επικάλυψη από επτά (7) δισκία και τα δισκία αυτά αλέστηκαν για τον σχηματισμό μιας λεπτής μορφής σκόνης. Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 100 mg της παραγόμενης σκόνης σε μία ογκομετρική φιάλη των 50 mL και **προστέθηκαν 5,0 mg Υπρομελλόζης**. Αναδεύτηκαν έντονα και ακολουθήθηκε η πορεία που περιγράφεται παραπάνω, αρχίζοντας ωστόσο, από το βήμα (3).

Υπολογίστηκε η % Ανάκτηση (Recovery) κάθε εμβολιασμένου διαλύματος και η % Σχετική τυπική απόκλιση (RSD) των ανακτήσεων αυτών, μέσω της παρακάτω σχέσης:

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\% \text{ Content Spiked} - \% \text{ Content Background}}{\text{Fortification Level}} \times 100$$

Όπου:

% Content_{Spiked}: Η εκτιμώμενη % περιεκτικότητα (w/w) της Υπρομελλόζης, στο εμβολιασμένο διάλυμα.

% Content_{Background}: Η υπολογισθείσα % περιεκτικότητα (w/w) της Υπρομελλόζης, στο τελικό διάλυμα του δείγματος (Unspiked).

Fortification Level: Το επίπεδο εμβολιασμού με βάση τη ποσότητα της Υπρομελλόζης που προστέθηκε στα αντίστοιχα Spiked διαλύματα. Μπορεί να υπολογισθεί σε κάθε εμβολιασμένο διάλυμα, μέσω της παρακάτω εξίσωσης και χρησιμοποιώντας το βάρος του εκδόχου, εκφρασμένο σε mg, ως εξής:

$$\text{Hypromellose added (\% Content, w/w)} = \frac{W_{\text{Hypromellose added (mg)}}}{W_{\text{powder (mg)}}} \times 100$$

Όπου:

$W_{\text{Hyp/se-added}}$: Η ποσότητα της Υπρομελλόζης που προστέθηκε, σε mg.

W_{powder} : Η ποσότητα της σκόνης του σκευάσματος, σε mg

Αποδεκτά κριτήρια:

1. Η % Ανάκτηση των Spiked διαλυμάτων, πρέπει να κυμαίνεται από 80-120 %.
2. Η % RSD των ανακτήσεων, πρέπει να είναι ≤ 15 .

Πιστότητα

Επαναληψιμότητα

Κατά την αξιολόγηση της επαναληψιμότητας, παρασκευάστηκαν έξι (6) ανεξάρτητα εμβολιασμένα διαλύματα, η πειραματική πορεία των οποίων, περιγράφεται παραπάνω, και υπολογίσθηκε τόσο η % ανάκτησή τους, όσο και η % σχετική τυπική απόκλιση των ανακτήσεων αυτών.

Ενδιάμεση πιστότητα

Τέλος, κατά την αξιολόγηση της ενδιάμεσης πιστότητας, παρασκευάστηκαν τρία (3) ακόμη, ανεξάρτητα εμβολιασμένα διαλύματα, σε διαφορετική ωστόσο, εργαστηριακή μέρα.

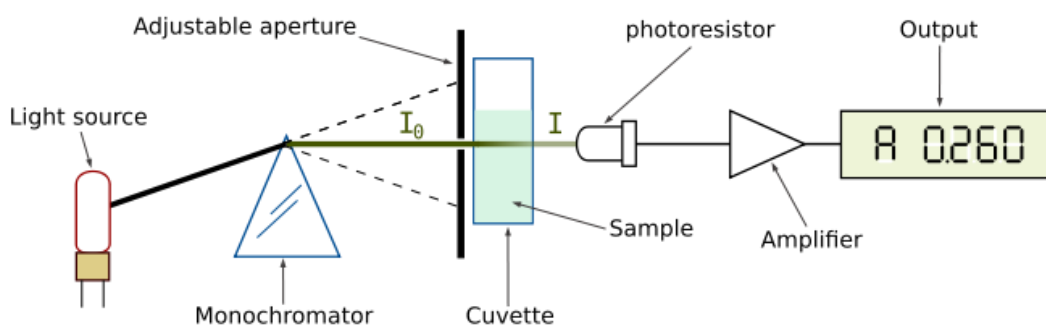
Αποδεκτά κριτήρια:

1. Η % RSD των ανακτήσεων, κατά τον έλεγχο της επαναληψιμότητας, πρέπει να είναι ≤ 15 .
2. Η % RSD των ανακτήσεων, κατά τον έλεγχο της ενδιάμεσης πιστότητας, πρέπει να είναι ≤ 15 .
3. Η συνολική % RSD των ανακτήσεων (9 ενέσεις), πρέπει να είναι ≤ 20 .

6.2.3 Προσδιορισμός της Μικροκρυσταλλικής Κυτταρίνης

Ο προσδιορισμός της μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης (Microcrystalline Cellulose - MCC) βασίζεται στην έντονη απορρόφηση που τη χαρακτηρίζει στο υπεριώδες φως. Το συνηθέστερο όργανο που χρησιμοποιείται για την μέτρηση της απορρόφησης αυτής, είναι το φασματοφωτόμετρο (**Spectrophotometer**), το οποίο μετρά την ένταση μιας ακτινοβολίας σε επιλεγμένο μήκος κύματος.

Το συγκεκριμένο όργανο περιλαμβάνει μια πηγή παραγωγής ακτινοβολίας, ένα πρίσμα για την απομόνωση της επιθυμητής μονοχρωματικής ακτινοβολίας, μια κυψελίδα που περιέχει το προς εξέταση δείγμα και τέλος, ένα φωτόμετρο για την μέτρηση της ακτινοβολίας που δεν απορροφάται από το δείγμα, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα^[72,73]:



Εικόνα 6.4: Αρχή λειτουργίας του φασματοφωτόμετρου

Κατά τον προσδιορισμό, λοιπόν, της μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης χρησιμοποιήθηκε ένα φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους τύπου UV-1700 της εταιρείας PharmaSpec, συνδεδεμένο με ξεχωριστό υπολογιστή, στον οποίο ήταν εγκατεστημένο το λογισμικό UV Probe (v.2.43) της εταιρείας Shimadzu για τον έλεγχο λειτουργίας του συστήματος, την καταγραφή και την επεξεργασία των δεδομένων.

Πρότυπη ουσία / Μικροκρυσταλλική κυτταρίνη, καθαρότητας 99,1 %, JRS Pharma

Έκδοχο

Αντιδραστήρια	Μεθανόλη (Καθαρότητας HPLC, Fischer) Υδροξείδιο του νατρίου (Αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, Sigma) Υπερκάθαρο νερό (Καθαρότητας HPLC)
Φασματ/τρικές Παράμετροι	Απορρόφηση: 223 nm Σχισμή: 4 nm Μήκος κυψελίδας: 1 cm Λειτουργία πολλαπλής δειγματοληψίας: Ο ανιχνευτής πραγματοποιεί τρεις διαδοχικές / επαναληπτικές μετρήσεις για κάθε δείγμα που εισάγεται στη κυψελίδα, σε διάστημα 1 s και εμφανίζονται όλες οι μετρήσεις με τον υπολογισμένο μέσο όρο τους.
Διαλύτης	Υπερκάθαρο νερό
Λευκό διάλυμα	Η παρασκευή του λευκού διαλύματος, περιγράφεται ως εξής: Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 2,5 g Υδροξειδίου του νατρίου και μεταφέρθηκαν σε έναν φυγοκεντρικό σωλήνα των 50 mL. Διαλύθηκαν σε νερό, αραιώθηκαν μέχρι χαραγής με τον ίδιο διαλύτη και ακολούθησε έντονη ανάδευση για 3 min.
Πειραματική πορεία	Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε, για τον προσδιορισμό της μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης, περιελάμβανε τα ακόλουθα στάδια: 1. Αφαιρέθηκε προσεκτικά η επικάλυψη από επτά (7) δισκία και τα δισκία αυτά αλέστηκαν για τον σχηματισμό μιας λεπτής μορφής σκόνης. 2. Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 200 mg της παραγόμενης σκόνης σε έναν φυγοκεντρικό σωλήνα των 50 mL. 3. Προστέθηκαν 20,0 mL μεθανόλης, ακολούθησε έντονη ανάδευση για 1 min και φυγοκέντρηση στις 6000 στροφές για 5 min, για την καθίζηση των σωματιδίων. Το υπερκείμενο υγρό που σχηματίστηκε, απορρίφθηκε προσεκτικά στα απόβλητα. 4. Επαναλήφθηκε το βήμα (3), ακόμα μια φορά. 5. Προστέθηκαν 20,0 mL υπερκάθαρου νερού, ακολούθησε έντονη

ανάδευση για 1 min και φυγοκέντρηση στις 6000 στροφές για 5 min, για την καθίζηση των σωματιδίων. Το υπερκείμενο υγρό που σχηματίστηκε, απορρίφθηκε προσεκτικά στα απόβλητα.

6. Επαναλήφθηκε το βήμα (5), ακόμα μια φορά.

7. Ο φυγοκεντρικός σωλήνας με το στερεό υπόλειμμα, μεταφέρθηκε σε φούρνο, ρυθμισμένο σε θερμοκρασία όχι μεγαλύτερη από 80 °C, έως την πλήρη ξήρανση του υπολείμματος.

8. Μετά την πλήρη ξήρανση, ο φυγοκεντρικός σωλήνας αφαιρέθηκε από τον φούρνο και αφέθηκε να κρυώσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

9. Προστέθηκαν 19,0 mL υπερκάθαρου **κρύου** νερού στον φυγοκεντρικό σωλήνα, ο οποίος τοποθετήθηκε υπό συνεχή ανάδευση μέσω μιας μικρής μαγνητικής ράβδου ανάδευσης. Η έντονη και συνεχής ανάδευση αποσκοπούσε στη διαρκή εναιώρηση της παραγόμενης σκόνης - υπολείμματος στο νερό.

10. Προστέθηκαν 2,5 g Υδροξειδίου του νατρίου, όσο το υπόλειμμα εξακολουθούσε να αιωρείται στο νερό και ακολούθησε έντονη ανάδευση για 10 min. Η ανάδευση μέσω περιδίνησης, χρησιμοποιήθηκε επιπροσθέτως, μετά τη πλήρη διάλυση του υδροξειδίου του νατρίου στο νερό.

11. Ο φυγοκεντρικός σωλήνας μεταφέρθηκε σε κατάψυξη, ρυθμισμένη σε θερμοκρασία -20 °C, μέχρι τον σχηματισμό μιας στερεής κρυσταλλικής μορφής.

12. Μετά τον σχηματισμό της κρυσταλλικής μορφής, ο φυγοκεντρικός σωλήνας αφαιρέθηκε από τη κατάψυξη και αφέθηκε να ξεπαγώσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

13. Προστέθηκαν 28,0 mL υπερκάθαρου νερού και ακολούθησε ήπια ανάδευση.

14. Η ήπια ανάδευση του διαλύματος συνεχίστηκε μέχρι την εξαφάνιση των “κυματισμών”, που αποτελούσαν ένδειξη μικρής τοπικής περίσσειας υδροξειδίου του νατρίου.

15. Τέλος, ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 6000 στροφές για 5 min, και το υπερκείμενο υγρό που προέκυψε, μεταφέρθηκε σε κυψελίδα για τη μέτρηση της απορρόφησής του.

Παρασκευάσθηκαν 3 ανεξάρτητα υποδείγματα για κάθε δείγμα.

Πρότυπο διάλυμα MCC (STD, 2,02 mg/mL) Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 100,0 mg MCC σε έναν φυγοκεντρικό σωλήνα των 50 mL και ακολουθήθηκε η πορεία που περιγράφεται παραπάνω, αρχίζοντας ωστόσο, από το βήμα (3).

Έλεγχος καταλληλότητας συστήματος Για τον έλεγχο καταλληλότητας του συστήματος, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης του προτύπου διαλύματος της Μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης (STD), έξι συνεχόμενες φορές, και υπολογίστηκε η % σχετική τυπική απόκλιση (Relative Standard Deviation - RSD) της απορρόφησης που λαμβάνεται από τις έξι αυτές συνεχόμενες μετρήσεις.

Αποδεκτά κριτήρια: Η τιμή της % RSD, δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 5.

Ποσοτικοποίηση

Η περιεκτικότητα της Μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης (% w/w) στο τελικό φαρμακευτικό προϊόν προσδιορίστηκε με τη χρήση της τεχνικής του ενός εξωτερικού πρότυπου, μέσω της παρακάτω σχέσης:

$$\text{MCC (\% w/w)} = 100 \times \frac{\text{Abs}_{\text{Test}} \times \text{C}_{\text{STD}} \times \text{V}_{\text{Test}}}{\text{Abs}_{\text{STD}} \times \text{W}_{\text{Test}}} \times 10^{-6} \text{ } \mu\text{g/g}$$

Όπου:

Abs_{Test}: Η απορρόφηση της MCC στο διάλυμα του δείγματος, στα 223 nm

Abs_{STD}: Η μέση απορρόφηση της MCC στο πρότυπο διάλυμα, στα 223 nm

C_{STD}: Η συγκέντρωση του προτύπου διαλύματος, εκφρασμένη σε mg/mL

V_{test}: Ο παράγοντας αραίωσης (Dilution Factor - DF), που ισούται με 49,5 mL

W_{test}: Το βάρος (g) της σκόνης που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των διαλυμάτων του δείγματος.

6.2.3.1 Επικύρωση της μεθόδου

Ειδικότητα

Κατά την αξιολόγηση της ειδικότητας, πέραν της χρησιμοποίησης του λευκού και του προτύπου διαλύματος της μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης, παρασκευάσθηκε και ένα διάλυμα ειδικότητας (Specificity solution), δηλαδή ένα μείγμα των εκδόχων που περιέχονται στο τελικό φαρμακευτικό προϊόν, η πειραματική πορεία του οποίου, περιγράφεται ως εξής:

Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 600,0 mg Μαννιτόλης, 30,0 mg Κροσκαρμελλόζης, 60,0 mg Υπρομελλόζης και 10,0 mg Στεατικού μαγνησίου σε έναν φυγοκεντρικό σωλήνα των 50 mL και ακολουθήθηκε η πορεία που περιγράφεται παραπάνω, αρχίζοντας ωστόσο, από το βήμα (3).

Η σειρά και ο αριθμός των μετρήσεων, περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 6.4: Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον έλεγχο της ειδικότητας (Μικροκρυσταλλική Κυτταρίνη)

Διάλυμα	Αριθμός μετρήσεων
Λευκό διάλυμα	1
Διάλυμα Ειδικότητας	1
Πρότυπο διάλυμα, STD	1

Αποδεκτά κριτήρια: Καμία απορρόφηση δεν πρέπει να καταγράφεται, κατά την ανάλυση τόσο του λευκού, όσο και του διαλύματος ειδικότητας.

Γραμμικότητα / Εύρος γραμμικής περιοχής

Κατά την αξιολόγηση της γραμμικότητας και του εύρους της γραμμικής περιοχής, παρασκευάσθηκαν τα ακόλουθα πρότυπα διαλύματα:

Πρότυπο διάλυμα A (STD-A, 0,505 mg/mL): Ζυγίστηκαν με ακρίβεια **25,0** mg MCC σε έναν φυγοκεντρικό σωλήνα των 50 mL και ακολουθήθηκε η πορεία που περιγράφεται παραπάνω, αρχίζοντας ωστόσο, από το βήμα (3).

Πρότυπο διάλυμα B (STD-B, 1,01 mg/mL): Ζυγίστηκαν με ακρίβεια **50,0** mg MCC σε έναν φυγοκεντρικό σωλήνα των 50 mL και ακολουθήθηκε η πορεία που περιγράφεται παραπάνω, αρχίζοντας ωστόσο, από το βήμα (3).

Πρότυπο διάλυμα C (STD-C, 2,02 mg/mL): Ζυγίστηκαν με ακρίβεια **100,0** mg MCC σε έναν φυγοκεντρικό σωλήνα των 50 mL και ακολουθήθηκε η πορεία που περιγράφεται παραπάνω, αρχίζοντας ωστόσο, από το βήμα (3).

Πρότυπο διάλυμα D (STD-D, 3,03 mg/mL): Ζυγίστηκαν με ακρίβεια **150,0** mg MCC σε έναν φυγοκεντρικό σωλήνα των 50 mL και ακολουθήθηκε η πορεία που περιγράφεται παραπάνω, αρχίζοντας ωστόσο, από το βήμα (3).

Πρότυπο διάλυμα E (STD-E, 4,04 mg/mL): Ζυγίστηκαν με ακρίβεια **200,0** mg MCC σε έναν φυγοκεντρικό σωλήνα των 50 mL και ακολουθήθηκε η πορεία που περιγράφεται παραπάνω, αρχίζοντας ωστόσο, από το βήμα (3).

Αναλύθηκαν τα πρότυπα διαλύματα που παρασκευάστηκαν και σχεδιάστηκε μία καμπύλη βαθμονόμησης της απορρόφησης των προτύπων αυτών, σε συνάρτηση με την συγκέντρωσή τους στο τελικό διάλυμα. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των ελαχίστων τετραγώνων, από την οποία προέκυψε η εξίσωση παλινδρόμησης, μέσω της οποίας υπολογίστηκε ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2), η κλίση και η τομή.

Αποδεκτά κριτήρια: Η εξίσωση παλινδρόμησης πρέπει να είναι γραμμική, ενώ ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2) πρέπει να είναι $\geq 0,98$.

Το εύρος της γραμμικής περιοχής προέκυψε από τη μελέτη της γραμμικότητας.

Αποδεκτά κριτήρια: Η % Ανάκτηση (Recovery) της συγκέντρωσης της MCC στα πρότυπα διαλύματα της καμπύλης, πρέπει να κυμαίνεται από 80-120 %.

Όριο ποσοτικοποίησης

Όριο ποσοτικοποίησης ορίζεται ως το χαμηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης στο οποίο επιβεβαιώνεται ο ποσοτικός προσδιορισμός της αναλυόμενης ουσίας. Στην προκειμένη περίπτωση, η συγκέντρωση αυτή είναι 0,505 mg MCC/mL τελικού διαλύματος, που αντιστοιχεί περίπου σε περιεκτικότητα 12,5 % w/w.

Κατά τον αξιολόγηση λοιπόν, του ορίου ποσοτικοποίησης, παρασκευάστηκε το **Πρότυπο διάλυμα A** (STD-A, 0,505 mg/mL), όπως περιγράφεται παραπάνω, και μετρήθηκε πέντε (5) φορές.

Αποδεκτά κριτήρια:

1. Η % RSD της απορρόφησης της MCC από τις πέντε (5) συνεχόμενες επαναλήψεις του STD-A, πρέπει να είναι ≤ 20 . Η αξιολόγηση της μεθόδου πραγματοποιείται μέσω του λόγου απόκρισης του προτύπου διαλύματος, ως προς την απόκριση του διαλύματος ειδικότητας, σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$\text{Response Ratio} = \frac{\text{Average Response}_{\text{LOQ}}}{\text{Response}_{\text{Specificity}}} < 10$$

Όπου:

Average Response _{LOQ}: Η απόκριση του χαμηλότερου προτύπου διαλύματος, STD-A

Response _{specificity}: Η απόκριση του διαλύματος ειδικότητας

Εάν η μετρηθείσα απόκριση - απορρόφηση του διαλύματος ειδικότητας είναι μηδενική, τότε ο λόγος δεν μπορεί να οριστεί και θεωρείται ότι το κριτήριο πληρείται.

2. Η % Ανάκτηση της υπολογισθείσας συγκέντρωσης, πρέπει να κυμαίνεται από 80-120 %.

Ακρίβεια

Κατά την αξιολόγηση της ακρίβειας, παρασκευάσθηκαν τρία (3) ανεξάρτητα Spiked διαλύματα, η πειραματική πορεία των οποίων, περιγράφεται ως εξής:

Εμβολιασμένο - Spiked διάλυμα (SpS, Επίπεδο εμβολιασμού: 2,02 mg/mL, ισοδύναμο με 500,0 mg/g πυρήνα): Αφαιρέθηκε προσεκτικά η επικάλυψη από επτά (7) δισκία και τα δισκία αυτά αλέστηκαν για τον σχηματισμό μιας λεπτής μορφής σκόνης. Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 200 mg της παραγόμενης σκόνης σε έναν φυγοκεντρικό σωλήνα των 50 mL και **προστέθηκαν 100 mg MCC**. Αναδεύτηκαν έντονα και ακολουθήθηκε η πορεία που περιγράφεται παραπάνω, αρχίζοντας ωστόσο, από το βήμα (3).

Υπολογίστηκε η % Ανάκτηση (Recovery) κάθε Spiked διαλύματος και η % Σχετική τυπική απόκλιση (RSD) των ανακτήσεων αυτών, μέσω της παρακάτω σχέσης:

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\% \text{ Content Spiked} - \% \text{ Content Background}}{\text{Fortification Level}} \times 100$$

Όπου:

% Content_{Spiked}: Η εκτιμώμενη % περιεκτικότητα (w/w) της MCC, στο εμβολιασμένο διάλυμα.

% Content_{Background}: Η υπολογισθείσα % περιεκτικότητα (w/w) της MCC, στο τελικό διάλυμα του δείγματος (Unspiked).

Fortification Level: Το επίπεδο εμβολιασμού με βάση τη ποσότητα της MCC που προστέθηκε στα αντίστοιχα Spiked διαλύματα. Μπορεί να υπολογισθεί σε κάθε εμβολιασμένο διάλυμα, μέσω της παρακάτω εξίσωσης και χρησιμοποιώντας το βάρος του εκδόχου, εκφρασμένο σε mg, ως εξής:

$$\text{MCC added (\% Content, w/w)} = \frac{W_{\text{MCC - added (mg)}}}{W_{\text{powder (mg)}}} \times 100$$

Όπου:

W_{MCC-added}: Η ποσότητα της MCC που προστέθηκε, σε mg.

W_{powder}: Η ποσότητα της σκόνης του σκευάσματος, σε mg.

Αποδεκτά κριτήρια:

1. Η % Ανάκτηση των Spiked διαλυμάτων, πρέπει να κυμαίνεται από 80-120 %.
2. Η % RSD των ανακτήσεων, πρέπει να είναι ≤ 15 .

Πιστότητα

Επαναληψιμότητα

Κατά την αξιολόγηση της επαναληψιμότητας, παρασκευάσθηκαν έξι (6) ανεξάρτητα εμβολιασμένα διαλύματα, η πειραματική πορεία των οποίων, περιγράφεται παραπάνω, και υπολογίσθηκε τόσο η % ανάκτησή τους, όσο και η % σχετική τυπική απόκλιση των ανακτήσεων αυτών.

Ενδιάμεση πιστότητα

Τέλος, κατά την αξιολόγηση της ενδιάμεσης πιστότητας, παρασκευάσθηκαν τρία (3) ακόμη, ανεξάρτητα εμβολιασμένα διαλύματα, σε διαφορετική ωστόσο, εργαστηριακή μέρα.

Αποδεκτά κριτήρια:

1. Η % RSD των ανακτήσεων, κατά τον έλεγχο της επαναληψιμότητας, πρέπει να είναι ≤ 15 .
2. Η % RSD των ανακτήσεων, κατά τον έλεγχο της ενδιάμεσης πιστότητας, πρέπει να είναι ≤ 15 .
3. Η συνολική % RSD των ανακτήσεων (9 μετρήσεις), πρέπει να είναι ≤ 20 .

6.2.4 Προσδιορισμός του Στεατικού Μαγνησίου

Ο προσδιορισμός του στεατικού μαγνησίου βασίζεται στην ανίχνευση των θετικά φορτισμένων σωματιδίων του, μέσω της φασματομετρίας μαζών επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (**Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry**), που αποτελεί σήμερα, την πιο διαδεδομένη πολυστοιχειακή αναλυτική τεχνική για τη ποσοτικοποίηση αναλυτών στοιχειακής φύσης.

Κατά τον προσδιορισμό, λοιπόν, του στεατικού μαγνησίου χρησιμοποιήθηκε ένα φασματόμετρο μαζών ICP τύπου NexION 350X, της εταιρείας Perkin Elmer, συνδεδεμένο με ξεχωριστό υπολογιστή, στον οποίο ήταν εγκατεστημένο το λογισμικό NexION της εταιρείας Perkin Elmer για τον έλεγχο λειτουργίας του συστήματος, τη καταγραφή και την επεξεργασία των δεδομένων, όπως φαίνεται και στη παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 6.5: Φασματομέτρο μαζών ICP τύπου NexION 350X, της εταιρείας Perkin Elmer

Πρότυπη ουσία / Έκδοχο	Στεατικό μαγνήσιο, καθαρότητας 98,9 %, Sigma Aldrich
Αντιδραστήρια	Νιτρικό οξύ 67-69 % (Καθαρότητας ιχνοστοιχείων) Υπεροξείδιο του υδρογόνου 30 % (Καθαρότητας ιχνοστοιχείων) Υπερκάθαρο νερό (Καθαρότητας HPLC)
Οργανολογικές Παράμετροι	Τρόπος λειτουργίας: Διάκριση κινητικής ενέργειας (Kinetic Energy Discrimination - KED mode) Επαναλήψεις / ανάλυση: 3 Καθαρισμοί / καταγραφή: 10 Βοηθητική ροή αερίου: 1,2 L/min Ροή αερίου πλάσματος: 18,0 L/min Τάση εκτροπής: -12,0 kV Ισχύς Γεννήτριας Ραδιοσυχνοτήτων: 1600 Watt Τάση παλμικής φάσης: 800 V Αξονική τάση πεδίου: 250,0 V Δειγματοληψία (Περισταλτική Αντλία):

	Χρόνος (sec)	Ταχύτητα (rpm)
Έκπλυση δείγματος	20	24
Καθυστέρηση καταγραφής	15	20
Ανάλυση	69.36	20
Έκπλυση	45	24

Παράμετροι χώνευσης

Χρόνος (min)	Θερμοκρασία (°C)	Ισχύς (watt)
0	0	0
15	200	1800
30	200	1800

Διαλύτης	Υπερκάθαρο νερό
Λευκό διάλυμα	<p>Η παρασκευή του λευκού διαλύματος, περιγράφεται ως εξής:</p> <p>Προστέθηκαν 8,0 mL Νιτρικού οξέος και 2,0 mL Υπεροξειδίου του υδρογόνου σε ένα δοχείο χώνευσης μικροκυμάτων και χωνεύτηκαν στη συσκευή χώνευσης μικροκυμάτων. Μετά το πέρας 1 h, το υπόλειμμα του δοχείου μεταφέρθηκε σε μια πλαστική ογκομετρική φιάλη των 50 mL και αραιώθηκε μέχρι χαραγής με νερό. Τέλος, 1,0 mL του παραπάνω διαλύματος, μεταφέρθηκε σε μια νέα πλαστική ογκομετρική φιάλη των 50 mL και αραιώθηκε μέχρι χαραγής με νερό.</p>
Πειραματική πορεία	<p>Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε, για τον προσδιορισμό του στεατικού μαγνησίου, περιελάμβανε τα ακόλουθα στάδια:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Αφαιρέθηκε προσεκτικά η επικάλυψη από επτά (7) δισκία και τα δισκία αυτά αλέστηκαν για τον σχηματισμό μιας λεπτής μορφής σκόνης. 2. Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 0,100 g της παραγόμενης σκόνης και μεταφέρθηκαν σε ένα δοχείο χώνευσης μικροκυμάτων, όπου χωνεύτηκαν με 8,0 mL Νιτρικού οξέος και 2,0 mL Υπεροξειδίου του υδρογόνου στη συσκευή χώνευσης μικροκυμάτων. 3. Μετά το πέρας 1 h, το υπόλειμμα του δοχείου μεταφέρθηκε σε μια πλαστική ογκομετρική φιάλη των 50 mL και αραιώθηκε μέχρι χαραγής με νερό. 4. Τέλος, 1.0 mL του παραπάνω διαλύματος, μεταφέρθηκε σε μια νέα πλαστική ογκομετρική φιάλη των 50 mL και αραιώθηκε μέχρι χαραγής με νερό.
Placebo	<p>Το placebo που παρασκευάστηκε, αποτελούσε ένα μείγμα των εκδόχων που περιέχονται στο τελικό φαρμακευτικό προϊόν, του οποίου η πειραματική πορεία παρασκευής του, περιγράφεται ως εξής:</p> <p>Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 30,0 mg Υπρομελλόζης, 100,0 mg Κροσκαρμελλόζης, 300,0 mg Μαννιτόλης και 500,0 mg Μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης και μεταφέρθηκαν σε έναν φυγοκεντρικό σωλήνα των 15 mL. Πραγματοποιήθηκε έντονη ανάδευση για τον σχηματισμό ομοιογενούς σκόνης και</p>

ακολουθήθηκε η πορεία που περιγράφεται παραπάνω, αρχίζοντας ωστόσο, από το βήμα (2).

**Stock διάλυμα
Στεατικού
Μαγνησίου (STD-
INT, 20 µg/mL)**

Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 0,100 g Στεατικού Μαγνησίου και μεταφέρθηκαν σε ένα δοχείο χώνευσης μικροκυμάτων, όπου χωνεύτηκαν με 8,0 mL Νιτρικού οξέος και 2,0 mL Υπεροξειδίου του υδρογόνου στη συσκευή χώνευσης μικροκυμάτων. Μετά το πέρας 1 h, το υπόλειμμα του δοχείου μεταφέρθηκε σε μια **πλαστική** ογκομετρική φιάλη των 50 mL και αραιώθηκε μέχρι χαραγής με νερό. Τέλος, 0,500 mL του παραπάνω διαλύματος, μεταφέρθηκαν σε μια νέα **πλαστική** ογκομετρική φιάλη των 50 mL και αραιώθηκαν μέχρι χαραγής με νερό.

**Πρότυπο διάλυμα A
(STD-A, 80 ng/mL)**

Μεταφέρθηκαν **0,080 mL** από το **STD-INT** του Στεατικού Μαγνησίου σε μια ογκομετρική φιάλη των 20 mL και αραιώθηκαν μέχρι χαραγής με νερό.

**Πρότυπο διάλυμα B
(STD-B, 200 ng/mL)**

Μεταφέρθηκαν **0,200 mL** από το **STD-INT** του Στεατικού Μαγνησίου σε μια ογκομετρική φιάλη των 20 mL και αραιώθηκαν μέχρι χαραγής με νερό.

**Πρότυπο διάλυμα C
(STD-C, 400 ng/mL)**

Μεταφέρθηκαν **0,400 mL** από το **STD-INT** του Στεατικού Μαγνησίου σε μια ογκομετρική φιάλη των 20 mL και αραιώθηκαν μέχρι χαραγής με νερό.

**Πρότυπο διάλυμα D
(STD-D, 600 ng/mL)**

Μεταφέρθηκαν **0,600 mL** από το **STD-INT** του Στεατικού Μαγνησίου σε μια ογκομετρική φιάλη των 20 mL και αραιώθηκαν μέχρι χαραγής με νερό.

**Πρότυπο διάλυμα E
(STD-E, 800 ng/mL)**

Μεταφέρθηκαν **0,800 mL** από το **STD-INT** του Στεατικού Μαγνησίου σε μια ογκομετρική φιάλη των 20 mL και αραιώθηκαν μέχρι χαραγής με νερό.

**Έλεγχος
καταλληλότητας
συστήματος**

Για τον έλεγχο καταλληλότητας του συστήματος, αναλύθηκαν τα πρότυπα διαλύματα που παρασκευάστηκαν και σχεδιάστηκε μία καμπύλη βαθμονόμησης της μέτρησης των προτύπων αυτών, σε συνάρτηση με την συγκέντρωσή τους στο τελικό διάλυμα. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των ελαχίστων τετραγώνων, από την οποία προέκυψε η εξίσωση παλινδρόμησης, μέσω της οποίας υπολογίστηκε ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2), η κλίση και η τομή.

Αποδεκτά κριτήρια: Η εξίσωση παλινδρόμησης πρέπει να είναι γραμμική, ενώ ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2) πρέπει να είναι

≥ 0,99.

Ποσοτικοποίηση

Δεδομένου ότι, η περιεκτικότητα του Στεατικού Μαγνησίου στο δείγμα είναι ισοδύναμη (σε μοριακή βάση, mol) με την περιεκτικότητα του στοιχειακού Μαγνησίου (Mg), η ποσοτικοποίηση του συγκεκριμένου εκδόχου πραγματοποιήθηκε από τη περιεκτικότητα του στοιχειακού Μαγνησίου (Mg) που προσδιορίστηκε μέσω της τεχνικής ICP-MS.

Η περιεκτικότητα λοιπόν, του Στεατικού Μαγνησίου (% w/w) στο τελικό φαρμακευτικό προϊόν προσδιορίστηκε με τη χρήση της τεχνικής των πολλαπλών εξωτερικών προτύπων / καμπύλης αναφοράς, μέσω της παρακάτω σχέσης:

$$\text{Magnesium Stearate (\% w/w)} = 100 \times \frac{(R_{\text{Test}} - R_{\text{Proc-Intercept}}) \times V_{\text{Final}} \times \text{DF}}{\text{Slope} \times W_{\text{Test}}} \times 10^{-9} \text{ ng/g}$$

Όπου:

- R_{Test}:** Η απόκριση του στοιχειακού Μαγνησίου στο δείγμα (counts per second)
- R_{Proc}:** Η απόκριση του στοιχειακού Μαγνησίου στο λευκό διάλυμα (counts per second)
- Intercept** Η τομή της εξίσωσης παλινδρόμησης που προκύπτει από τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων
- Slope** Η κλίση της εξίσωσης παλινδρόμησης που προκύπτει από τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων
- V_{Final}:** Ο τελικός όγκος του διαλύματος, που ισούται με 50 mL
- DF:** Ο παράγοντας αραίωσης (Dilution Factor), που ισούται με 50 mL
- W_{Test}:** Το βάρος (g) της σκόνης που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των διαλυμάτων του δείγματος.

6.2.4.1 Επικύρωση της μεθόδου

Ειδικότητα

Ο βασικότερος στόχος κατά την αξιολόγηση της ειδικότητας της συγκεκριμένης

αναλυτικής μεθοδολογίας, ήταν η ποσοτικοποίηση του Στεατικού Μαγνησίου χωρίς καμία αλληλεπίδραση από την παρουσία άλλων εκδόχων ή συστατικών του μητρικού υλικού του δείγματος.

Εάν η απόκριση του λευκού διαλύματος υπερέβαινε το 20 % της απόκρισης του χαμηλότερου προτύπου της καμπύλης βαθμονόμησης, η ειδικότητα θα έπρεπε να αποδειχθεί με τη χρήση δευτερογενών ισότοπων του Μαγνησίου, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ασήμαντη αλληλεπίδραση των υπολοίπων συστατικών που περιέχονται στο τελικό φαρμακευτικό προϊόν. Για τον λόγο αυτό, τα ισότοπα που αναλύθηκαν ήταν: ^{24}Mg , ^{25}Mg και ^{26}Mg .

Αποδεκτά κριτήρια: Καμία αλληλεπίδραση δεν πρέπει να εμφανίζεται από τα υπόλοιπα συστατικά του δείγματος.

Γραμμικότητα

Κατά την αξιολόγηση της γραμμικότητας παρασκευάσθηκαν τα πρότυπα διαλύματα του Στεατικού Μαγνησίου, που περιγράφησαν παραπάνω.

Αναλύθηκαν τα πρότυπα διαλύματα και σχεδιάστηκε μία καμπύλη βαθμονόμησης της μέτρησής τους, σε συνάρτηση με την συγκέντρωσή τους στο τελικό διάλυμα. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των ελαχίστων τετραγώνων, από την οποία προέκυψε η εξίσωση παλινδρόμησης, μέσω της οποίας υπολογίστηκε ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2), η κλίση και η τομή.

Αποδεκτά κριτήρια: Η εξίσωση παλινδρόμησης πρέπει να είναι γραμμική, ενώ ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2) πρέπει να είναι $\geq 0,99$.

Όριο ποσοτικοποίησης

Όριο ποσοτικοποίησης ορίζεται ως το χαμηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης στο οποίο επιβεβαιώνεται ο ποσοτικός προσδιορισμός της αναλυόμενης ουσίας. Στην προκειμένη περίπτωση, το όριο ποσοτικοποίησης ορίστηκε σε συγκέντρωση 20 %, που αποτελούσε τη χαμηλότερη συγκέντρωση της καμπύλης βαθμονόμησης.

Κατά την αξιολόγηση λοιπόν, του ορίου ποσοτικοποίησης, παρασκευάσθηκαν έξι (6) ανεξάρτητα Spiked διαλύματα στο 20 %, η πειραματική πορεία των οποίων, περιγράφεται ως εξής:

Εμβολιασμένο - Spiked διάλυμα, 20 %: Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 500 mg του placebo που παρασκευάστηκε προηγουμένως σε έναν φυγοκεντρικό σωλήνα των 50 mL και προστέθηκε **1 mg Στεατικού Μαγνησίου**. Αναδεύτηκαν έντονα για το σχηματισμό ομοιογενούς σκόνης και ακολουθήθηκε η πορεία που περιγράφεται παραπάνω, αρχίζοντας ωστόσο, από το βήμα (2).

Υπολογίστηκε η % Ανάκτηση (Recovery) κάθε Spiked διαλύματος και η % Σχετική τυπική απόκλιση (RSD) των ανακτήσεων αυτών.

Αποδεκτά κριτήρια:

1. Η % Ανάκτηση των Spiked διαλυμάτων, πρέπει να κυμαίνεται από 70-150 %, σύμφωνα με την Αμερικανική Φαρμακοποιία (United States Pharmacopeia - USP).
2. Η % RSD των ανακτήσεων, πρέπει να είναι ≤ 20 .

Ακρίβεια

Κατά την αξιολόγηση της ακρίβειας, παρασκευάστηκαν τρία (3) ανεξάρτητα Spiked διαλύματα στο 100 %, η πειραματική πορεία των οποίων, περιγράφεται ως εξής:

Εμβολιασμένο - Spiked διάλυμα, 100 %: Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 100 mg του placebo που παρασκευάστηκε προηγουμένως και **1 mg Στεατικού Μαγνησίου**, μεταφέρθηκαν σε ένα δοχείο χώνευσης μικροκυμάτων ακολουθήθηκε η πορεία που περιγράφεται παραπάνω, αρχίζοντας ωστόσο, από το βήμα (2).

Υπολογίστηκε η % Ανάκτηση (Recovery) κάθε Spiked διαλύματος, μέσω της παρακάτω σχέσης:

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{Conc Spiked Sample} - \text{Conc Unspiked Sample}}{\text{Fortification Level}} \times 100$$

Όπου:

- Conc Spiked Sample:** Η εκτιμώμενη συγκέντρωση (ng/mL) του Στεατικού Μαγνησίου, στο Spiked διάλυμα.
- Conc Unspiked Sample:** Η υπολογισθείσα συγκέντρωση (ng/mL) του Στεατικού Μαγνησίου, στο τελικό διάλυμα του δείγματος (Unspiked).
- Fortification Level:** Το επίπεδο εμβολιασμού με βάση τη ποσότητα του Στεατικού Μαγνησίου που προστέθηκε στα αντίστοιχα Spiked διαλύματα.

Αποδεκτά κριτήρια:

1. Η μέση % Ανάκτηση των τριών επαναλήψεων των Spiked διαλυμάτων, πρέπει να κυμαίνεται από 70-150 %.

Πιστότητα

Επαναληψιμότητα

Κατά την αξιολόγηση της επαναληψιμότητας, παρασκευάσθηκαν έξι (6) ανεξάρτητα εμβολιασμένα διαλύματα, η πειραματική πορεία των οποίων, περιγράφεται παραπάνω, και υπολογίσθηκε τόσο η % ανάκτησή τους, όσο και η % σχετική τυπική απόκλιση των ανακτήσεων αυτών.

Ενδιάμεση πιστότητα

Τέλος, κατά την αξιολόγηση της ενδιάμεσης πιστότητας, παρασκευάσθηκαν τρία (3) ακόμη, ανεξάρτητα εμβολιασμένα διαλύματα, σε διαφορετική ωστόσο, εργαστηριακή μέρα.

Αποδεκτά κριτήρια:

1. Η % RSD των ανακτήσεων, κατά τον έλεγχο της επαναληψιμότητας, πρέπει να είναι ≤ 20 .
2. Η συνολική % RSD των ανακτήσεων (9 μετρήσεις), πρέπει να είναι ≤ 25 .

6.2.5 Προσδιορισμός της Κροσκαρμελλόζης

Η κροσκαρμελλόζη αποτελεί ένα έκδοχο, δομικά συγγενές με τη κυτταρίνη αλλά πρακτικά αδιάλυτο στους περισσότερο χρησιμοποιούμενους διαλύτες. Η περιεκτικότητά της στο τελικό φαρμακευτικό προϊόν, προσδιορίστηκε εκ διαφοράς, με αφαίρεση της περιεκτικότητας όλων των υπολοίπων εκδόχων που περιέχονται στον πυρήνα αυτού. Χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη σχέση:

$$\begin{aligned} \text{Croscarmellose (\% w/w)} &= 100 - (\text{Mannitol (\% w/w)} + \text{Hypromellose (\% w/w)} + \text{MCC (\% w/w)} \\ &+ \text{Magnesium Stearate (\% w/w)} + 5.49 \text{ Prasugrel Hydrochloride (\% w/w)}) \end{aligned}$$

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

7.1 Αποτελέσματα επικύρωσης της μεθόδου προσδιορισμού της Μαννιτόλης

Έλεγχος καταλληλότητας συστήματος

Ο έλεγχος καταλληλότητας του συστήματος πραγματοποιήθηκε πριν από την επικύρωση της μεθόδου, χρησιμοποιώντας το πρότυπο διάλυμα της Μαννιτόλης (STD, 10,0 µg/mL) που παρασκευάστηκε και αναλύοντάς το, έξι (6) συνεχόμενες φορές. Οι τιμές της απόκρισης που ελήφθησαν από τις έξι συνεχόμενες ενέσεις, παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

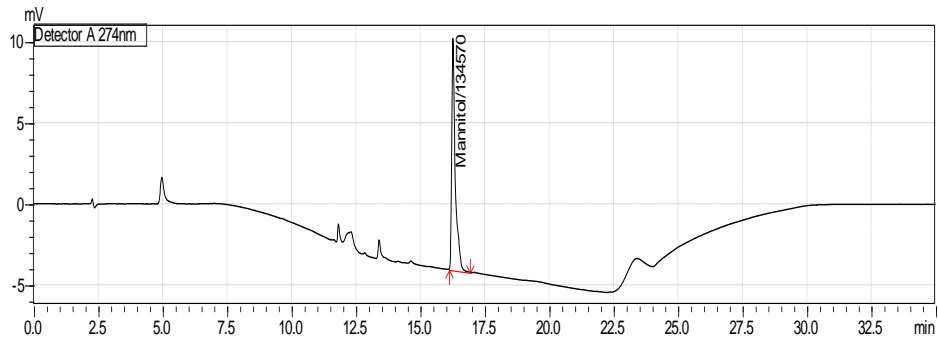
Πίνακας 7.1: Αποτελέσματα ελέγχου καταλληλότητας του συστήματος (Μαννιτόλη)

STDs	Εμβαδό
STD_1_1	134998
STD_1_2	134628
STD_1_3	134912
STD_1_4	134823
STD_1_5	134799
STD_1_6	134881
Μέση τιμή	134840
% RSD	0,093

Ειδικότητα

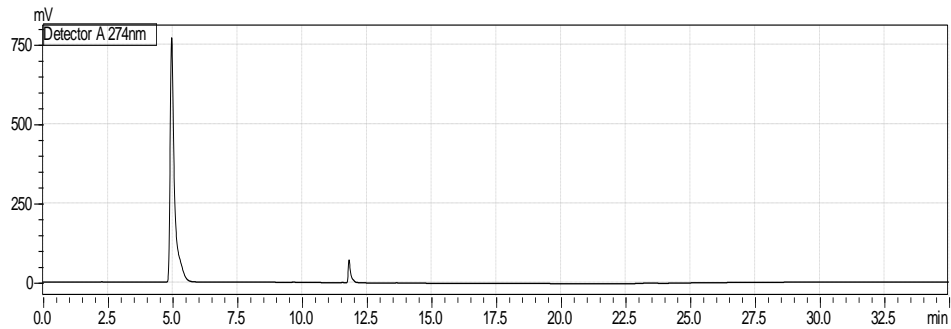
Τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν κατά την ανάλυση, τόσο του λευκού, όσο και του διαλύματος ειδικότητας, επιβεβαίωσαν ότι πράγματι, καμία κορυφή δεν εμφανίζεται στο χρόνο έκλυσης της Μαννιτόλης.

Datafile Name:STD_1_7.lcd
Sample Name:STD_1_7
Sample ID:Specificity



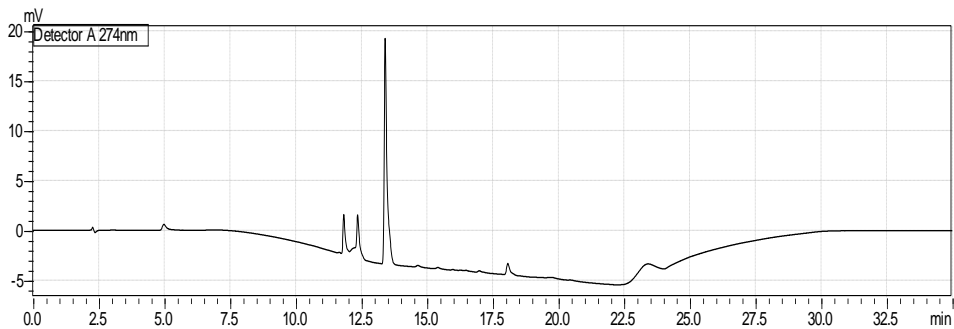
Εικόνα 7.1: Ενδεικτικό χρωματογράφημα του προτύπου διαλύματος της Μαννιτόλης

Datafile Name:Blank_1_3.lcd
Sample Name:Blank_1_3
Sample ID:Specificity



Εικόνα 7.2: Ενδεικτικό χρωματογράφημα του λευκού διαλύματος (Μαννιτόλη)

Datafile Name:Placebo_1_1.lcd
Sample Name:Placebo_1_1
Sample ID:Specificity

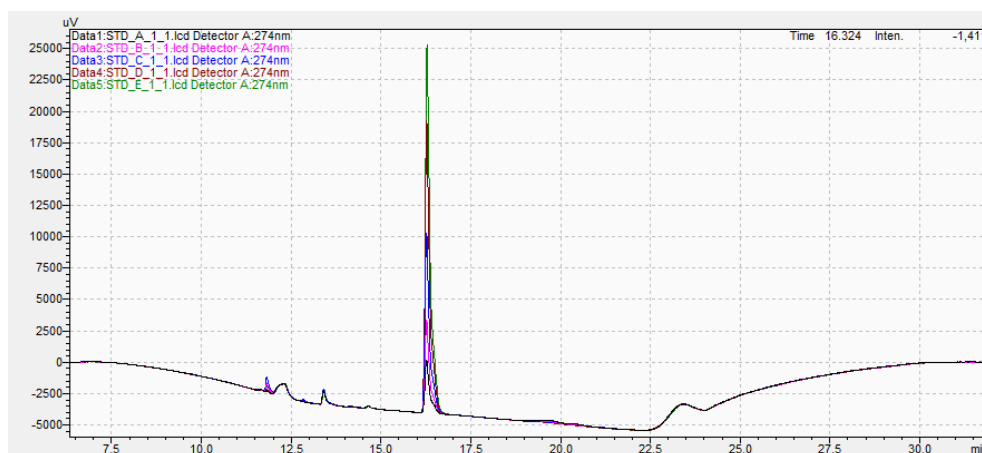


Εικόνα 7.3: Ενδεικτικό χρωματογράφημα του διαλύματος ειδικότητας (Specificity / Placebo) της Μαννιτόλης

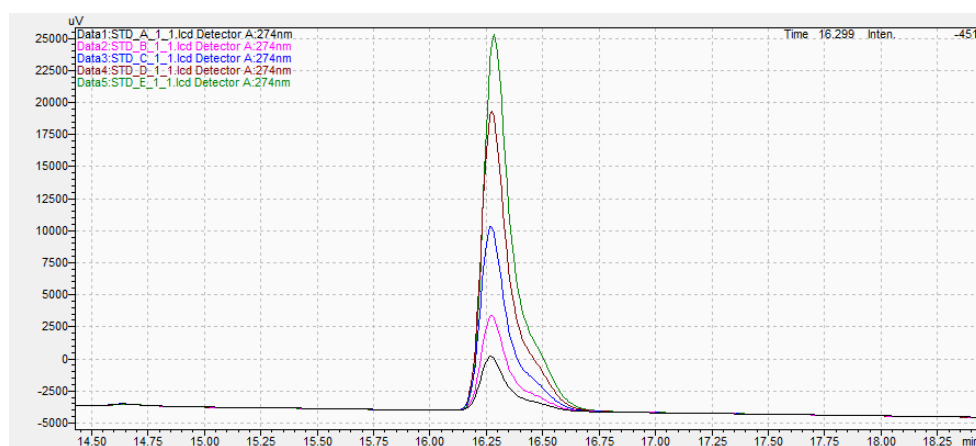
Τα κριτήρια αποδοχής, κατά την αξιολόγηση της ειδικότητας, ικανοποιήθηκαν.

Γραμμικότητα / Εύρος γραμμικής περιοχής

Η αξιολόγηση της γραμμικότητας της αναλυτικής μεθοδολογίας, που χρησιμοποιήθηκε για την ακριβή ποσοτικοποίηση της Μαννιτόλης, πραγματοποιήθηκε με ανάλυση των προτύπων διαλυμάτων της στα ακόλουθα επίπεδα συγκεντρώσεων: 2,5 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL και 20 µg/mL. Τα χρωματογράφημα που ελήφθησαν, επιβεβαίωσαν τη γραμμική σχέση μεταξύ των προτύπων διαλυμάτων και της απόκρισής τους, ενώ τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα, παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.



Εικόνα 7.4: Ενδεικτικό χρωματογράφημα των προτύπων διαλυμάτων της Μαννιτόλης

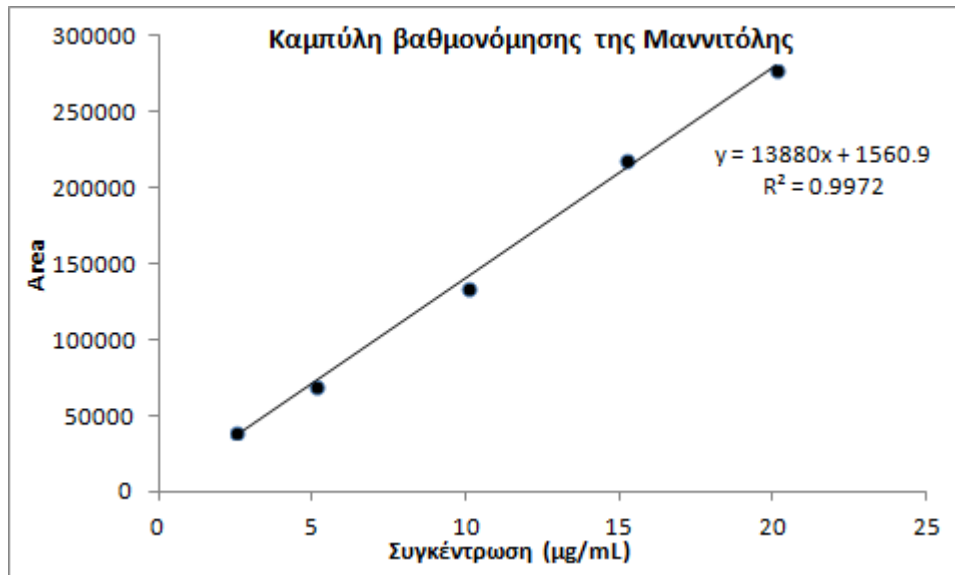


Εικόνα 7.5: Ενδεικτικό χρωματογράφημα των προτύπων διαλυμάτων της Μαννιτόλης (Μεγέθυνση)

Πίνακας 7.2: Αποτελέσματα ελέγχου γραμμικότητας (Μαννιτόλη)

Συγκέντρωση (μg/mL)	Εμβαδό	% Ανάκτηση
2,5	40045	118
5,1	69609	103
10,0	134998	101
15,2	219544	108
20,1	277600	104
Κλίση	13880	
Τομή	1561	
R²	0,997	

Η καμπύλη βαθμονόμησης της απόκρισης των προτύπων αυτών, σε συνάρτηση με την συγκέντρωσή τους στο τελικό διάλυμα, που σχεδιάστηκε μέσω της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων, αποδείχθηκε ότι είναι γραμμική, ενώ ο συντελεστής προσδιορισμού (R²) ισούταν με 0,997, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 7.6: Καμπύλη βαθμονόμησης της Μαννιτόλης

Τα κριτήρια αποδοχής, κατά την αξιολόγηση της γραμμικότητας, ικανοποιήθηκαν.

Όσον αφορά το εύρος της γραμμικής περιοχής, η ανάλυση των προτύπων διαλυμάτων της Μαννιτόλης, επέτρεψε τον καθορισμό ενός γραμμικού εύρους από 2,5 μg/mL έως 20 μg/mL, που αντιστοιχεί σε περιεκτικότητα Μαννιτόλης ίση με 7,5 - 60 % w/w. Η %

Ανάκτηση των διαλυμάτων αυτών κυμαινόταν μεταξύ 101 - 118 %, γεγονός που πιστοποιεί τη κατάλληλη ποσοτικοποίηση του αναλύτη σε αυτό το εύρος.

Όριο ποσοτικοποίησης

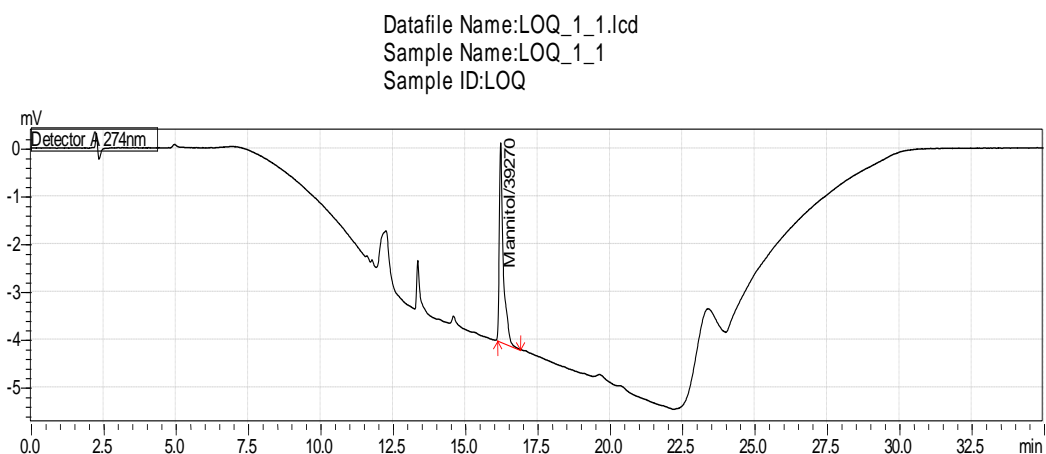
Το όριο ποσοτικοποίησης της συγκεκριμένης αναλυτικής μεθοδολογίας αξιολογήθηκε, παρασκευάζοντας ένα **Πρότυπο διάλυμα Α** (STD-A, 2,5 µg/mL) και αναλύοντάς το, πέντε (5) συνεχόμενες φορές. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 7.3: Αποτελέσματα ελέγχου ορίου ποσοτικοποίησης (Μαννιτόλη)

Ενέσεις	S/N Ratio	Εμβαδό	%RSD
1	62	39270	0,37
2	64	39415	
3	65	39623	
4	65	39498	
5	66	39616	

Τα κριτήρια αποδοχής, κατά την αξιολόγηση του ορίου ποσοτικοποίησης, ικανοποιήθηκαν.

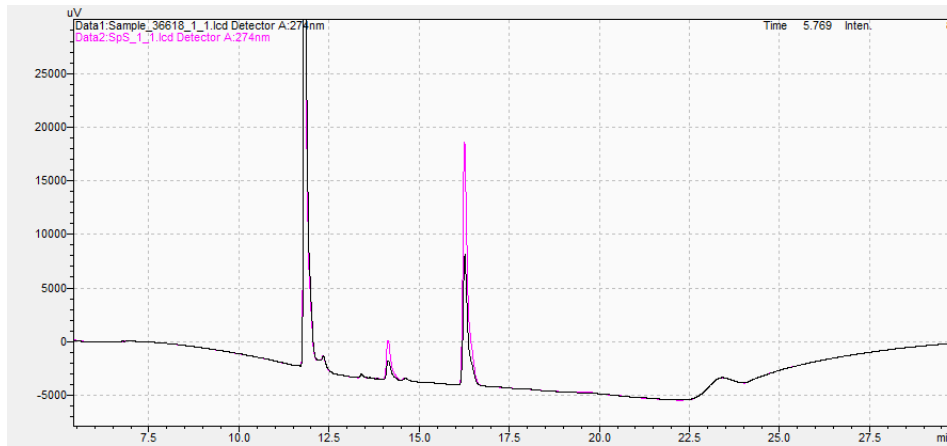
Από τα αποτελέσματα αυτά, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της αξιολόγησης του εύρους γραμμικής περιοχής, αποδεικνύεται ότι το όριο ποσοτικοποίησης είναι δυνατόν να καθοριστεί σε 2,5 µg Μαννιτόλης/mL τελικού διαλύματος που αντιστοιχεί σε περιεκτικότητα ίση με 7,5 % w/w. Ένα ενδεικτικό χρωματογράφημα του προτύπου διαλύματος Α της Μαννιτόλης, φαίνεται στη παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 7.7: Ενδεικτικό χρωματογράφημα του προτύπου διαλύματος Α της Μαννιτόλης

Ακρίβεια

Η ακρίβεια της συγκεκριμένης αναλυτικής μεθοδολογίας, αξιολογήθηκε παρασκευάζοντας τρία (3) ανεξάρτητα Spiked διαλύματα, σε επίπεδο εμβολιασμού ισοδύναμο με 10 µg/mL και υπολογίζοντας την % ανάκτησή τους. Ένα ενδεικτικό χρωματογράφημα που ελήφθη, αλλά και τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα, παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.



Εικόνα 7.8: Ενδεικτικό χρωματογράφημα του δείγματος και του Spiked διαλύματος της Μαννιτόλης

Πίνακας 7.4: Αποτελέσματα ελέγχου ακρίβειας (Μαννιτόλη)

Πρότυπο διάλυμα, STD	Ονομαστική: 10 µg/mL Μέση τιμή των STDs: 134881 %RSD: 0,13				
Δείγμα (Background Content)	Μέση τιμή: 114849 % Περιεκτικότητα: 26,2				
Ονομαστική Περιεκτικότητα (% w/w)	Εμβασμό _{Spiked}	Υπολογισθείσα Περιεκτικότητα (% w/w)	% Ανάκτηση	% Μέση Ανάκτηση	%RSD
29,2	242754	27,0	92,3	92,0	0,84
28,5	244203	26,0	91,2		
29,4	244090	27,3	92,6		

Τα κριτήρια αποδοχής, κατά την αξιολόγηση της ακρίβειας, ικανοποιήθηκαν.

Πιστότητα

Επαναληψιμότητα / Ενδιάμεση Πιστότητα

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου αξιολογήθηκε, παρασκευάζοντας έξι (6) ανεξάρτητα Spiked διαλύματα, σε επίπεδο εμβολιασμού ισοδύναμο με 10 µg/mL και υπολογίζοντας την % ανάκτησή τους και την % σχετική τυπική απόκλιση μεταξύ τους. Όσον αφορά την ενδιάμεση πιστότητα της μεθόδου, αυτή αξιολογήθηκε παρασκευάζοντας τρία (3) ακόμα ανεξάρτητα Spiked διαλύματα, στο ίδιο επίπεδο εμβολιασμού, αλλά σε διαφορετική εργαστηριακή ημέρα. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 7.5: Αποτελέσματα ελέγχου πιστότητας (επαναληψιμότητας / ενδιάμεσης πιστότητας, Μαννιτόλη)

Ονομαστική Περιεκτικότητα (% w/w)	Εμβασμό _{Spiked}	Μέση τιμή / Περιεκτικότητα (% w/w)	Υπολογισθείσα Περιεκτικότητα (% w/w)	% Μέση Ανάκτηση	% RSD
1st Ημέρα					
29,2	242754	114849/ 26,2	27,0	91,7	1,0
28,5	244203		26,0		
29,4	244090		27,3		
29,4	245111		27,2		
29,1	244553		26,5		
28,2	244491		25,4		
2nd Ημέρα					
30,6	240158	114849/ 26,2	27,8	93,0	2,3
29,3	240422		27,3		
29,6	244081		28,2		
Overall %RSD: % RSD_R: 1,6					

Τα κριτήρια αποδοχής, κατά την αξιολόγηση της πιστότητας, ικανοποιήθηκαν.

7.2 Αποτελέσματα επικύρωσης της μεθόδου προσδιορισμού της Υπρομελλόζης

Έλεγχος καταλληλότητας συστήματος

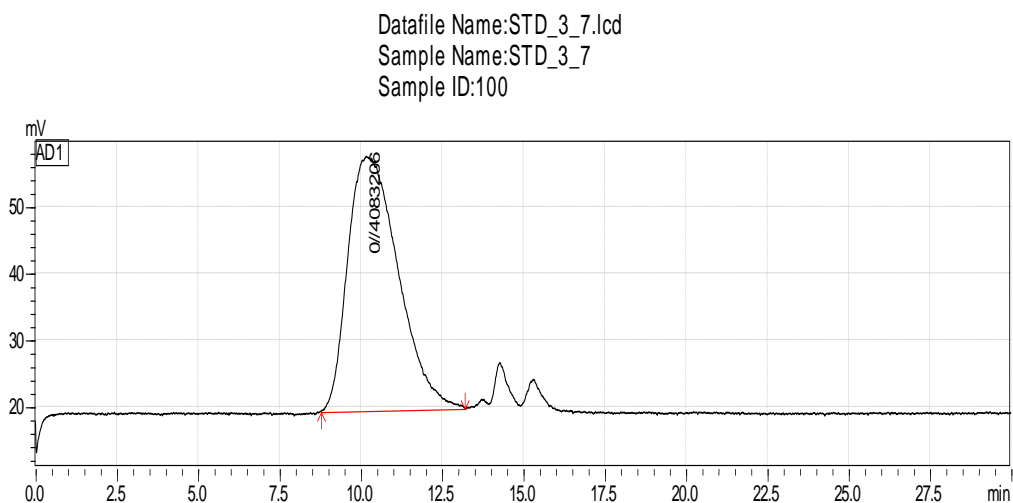
Ο έλεγχος καταλληλότητας του συστήματος πραγματοποιήθηκε πριν από την επικύρωση της μεθόδου, χρησιμοποιώντας το πρότυπο διάλυμα της Υπρομελλόζης (STD, 100 µg/mL) που παρασκευάστηκε και αναλύοντάς το, έξι (6) συνεχόμενες φορές. Οι τιμές της απόκρισης που ελήφθησαν από τις έξι συνεχόμενες ενέσεις, παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 7.6: Αποτελέσματα ελέγχου καταλληλότητας του συστήματος (Υπρομελλόζη)

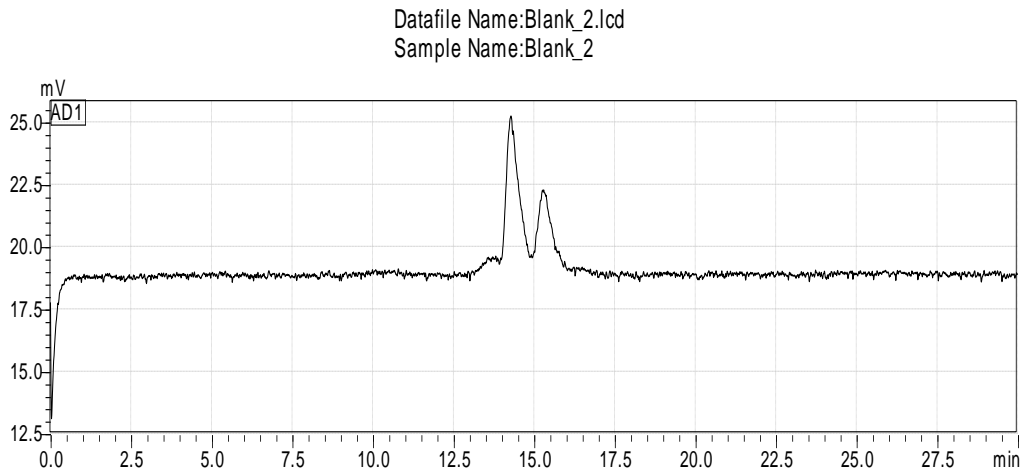
STDs	Εμβαδό
STD_1_1	4028501
STD_1_2	4119003
STD_1_3	4328715
STD_1_4	4085677
STD_1_5	4484534
STD_1_6	4139545
Μέση τιμή	4197663
% RSD	4,1

Ειδικότητα

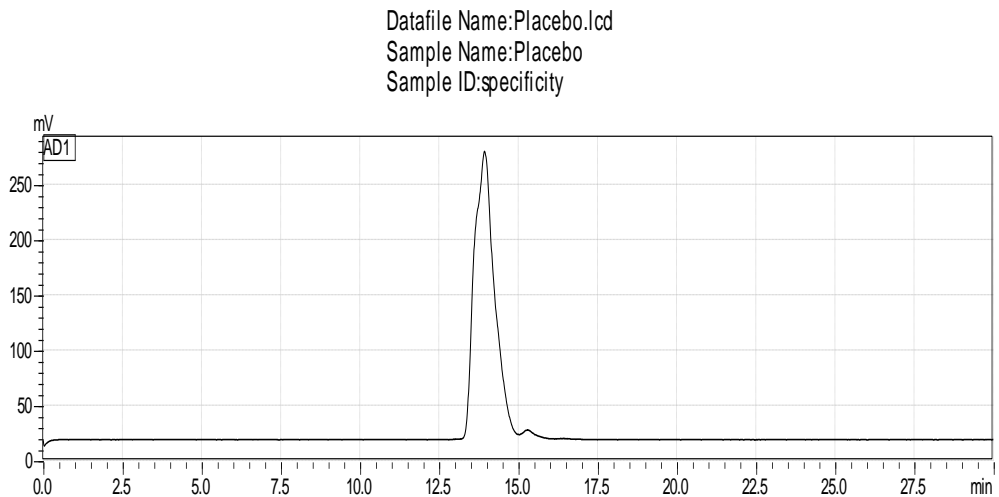
Τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν κατά την ανάλυση, τόσο του λευκού, όσο και του διαλύματος ειδικότητας, επιβεβαίωσαν ότι πράγματι, καμία κορυφή δεν εμφανίζεται στο χρόνο έκλουσης της Υπρομελλόζης.



Εικόνα 7.9: Ενδεικτικό χρωματογράφημα του προτύπου διαλύματος της Υπρομελλόζης



Εικόνα 7.10: Ενδεικτικό χρωματογράφημα του λευκού διαλύματος (Υπρομελλόζη)

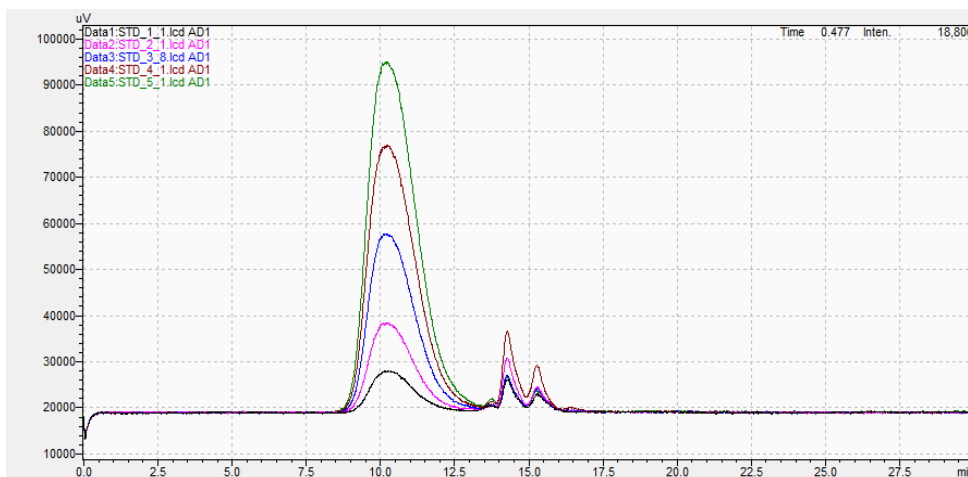


Εικόνα 7.11: Ενδεικτικό χρωματογράφημα του διαλύματος ειδικότητας (Specificity / Placebo) της Υπρομελλόζης

Τα κριτήρια αποδοχής, κατά την αξιολόγηση της ειδικότητας, ικανοποιήθηκαν.

Γραμμικότητα / Εύρος γραμμικής περιοχής

Η αξιολόγηση της γραμμικότητας της αναλυτικής μεθοδολογίας, που χρησιμοποιήθηκε για την ακριβή ποσοτικοποίηση της Υπρομελλόζης, πραγματοποιήθηκε με ανάλυση των προτύπων διαλυμάτων της στα ακόλουθα επίπεδα συγκεντρώσεων: 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL και 200 µg/mL. Το χρωματογράφημα που ελήφθη, επιβεβαίωσε τη γραμμική σχέση μεταξύ των προτύπων διαλυμάτων και της απόκρισής τους, ενώ τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα, παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

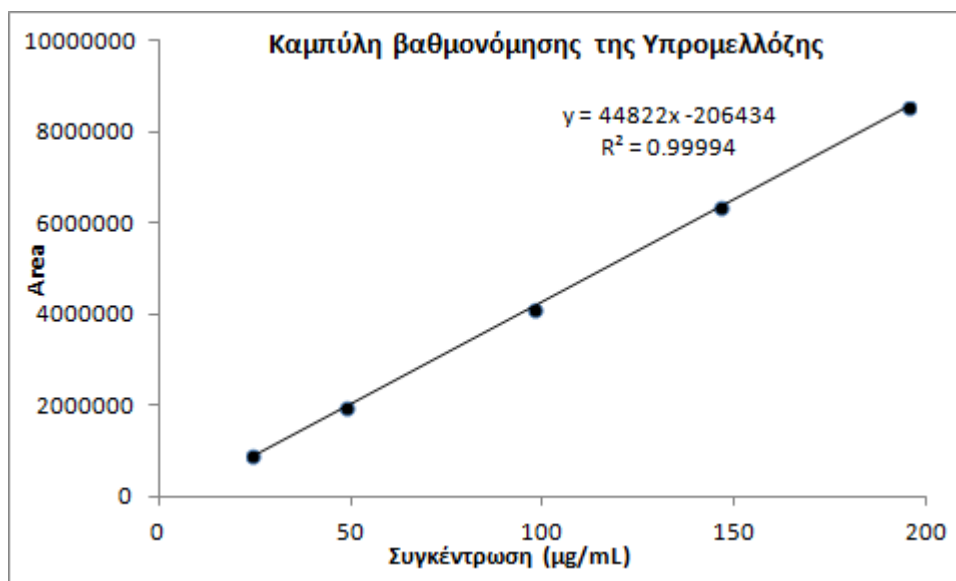


Εικόνα 7.12: Ενδεικτικό χρωματογράφημα των προτύπων διαλυμάτων της Υπρομελλόζης

Πίνακας 7.7: Αποτελέσματα ελέγχου γραμμικότητας (Υπρομελλόζη)

Συγκέντρωση (µg/mL)	Εμβαδό	% Ανάκτηση
24,4	907916	91
48,8	1978164	99
97,6	4128368	103
146,4	6370646	106
195,2	8549321	107
Κλίση	44822	
Τομή	-206434	
R²	0,99994	

Η καμπύλη βαθμονόμησης της απόκρισης των προτύπων αυτών, σε συνάρτηση με την συγκέντρωσή τους στο τελικό διάλυμα, που σχεδιάστηκε μέσω της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων, αποδείχθηκε ότι είναι γραμμική, ενώ ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2) ισούταν με 0,99994, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 7.13: Καμπύλη βαθμονόμησης της Υπρομελλόζης

Τα κριτήρια αποδοχής, κατά την αξιολόγηση της γραμμικότητας, ικανοποιήθηκαν.

Όσον αφορά το εύρος της γραμμικής περιοχής, η ανάλυση των προτύπων διαλυμάτων της Υπρομελλόζης, επέτρεψε τον καθορισμό ενός γραμμικού εύρους από 24,4 µg/mL έως 195,2 µg/mL, που αντιστοιχεί σε περιεκτικότητα Υπρομελλόζης ίση με 1,22 - 9,76 % w/w. Η % Ανάκτηση των διαλυμάτων αυτών κυμαινόταν μεταξύ 91 - 107 %, γεγονός που πιστοποιεί τη κατάλληλη ποσοτικοποίηση του αναλύτη σε αυτό το εύρος.

Όριο ποσοτικοποίησης

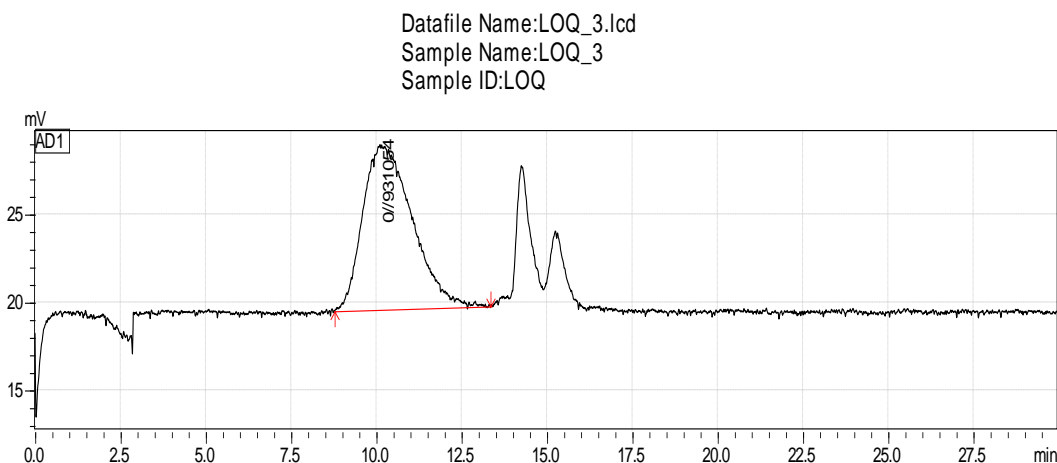
Το όριο ποσοτικοποίησης της συγκεκριμένης αναλυτικής μεθοδολογίας αξιολογήθηκε, παρασκευάζοντας ένα **Πρότυπο διάλυμα Α** (STD-A, 25 µg/mL) και αναλύοντάς το, πέντε (5) συνεχόμενες φορές. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 7.8: Αποτελέσματα ελέγχου ορίου ποσοτικοποίησης (Υπρομελλόζη)

Ενέσεις	S/N Ratio	Εμβαδό	%RSD
1	13	958474	2,1
2	10	907401	
3	16	931054	
4	16	921908	
5	16	946036	

Τα κριτήρια αποδοχής, κατά την αξιολόγηση του ορίου ποσοτικοποίησης, ικανοποιήθηκαν.

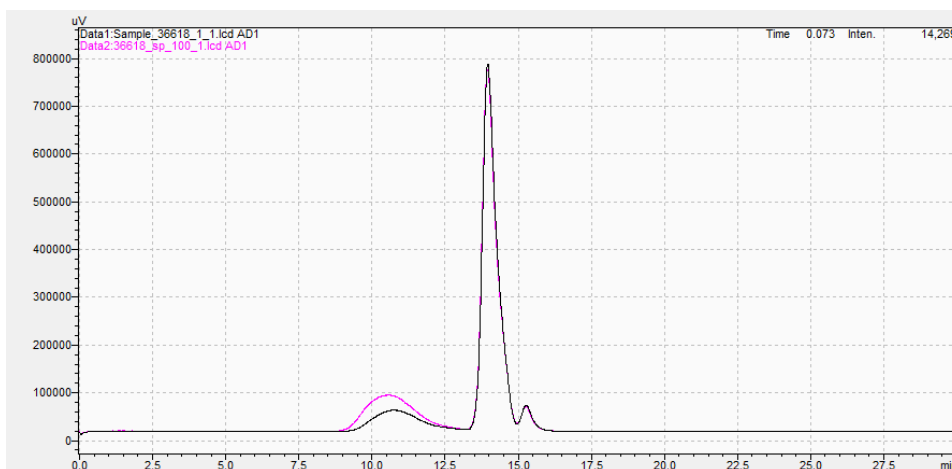
Από τα αποτελέσματα αυτά, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της αξιολόγησης του εύρους γραμμικής περιοχής, αποδεικνύεται ότι το όριο ποσοτικοποίησης είναι δυνατόν να καθοριστεί σε 24,4 μg Υπρομελλόζης/mL τελικού διαλύματος που αντιστοιχεί σε περιεκτικότητα ίση με 1,22 % w/w. Ένα ενδεικτικό χρωματογράφημα του προτύπου διαλύματος Α της Υπρομελλόζης, φαίνεται στη παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 7.14: Ενδεικτικό χρωματογράφημα του προτύπου διαλύματος Α της Υπρομελλόζης

Ακρίβεια

Η ακρίβεια της συγκεκριμένης αναλυτικής μεθοδολογίας, αξιολογήθηκε παρασκευάζοντας τρία (3) ανεξάρτητα Spiked διαλύματα, σε επίπεδο εμβολιασμού ισοδύναμο με 100 μg/mL και υπολογίζοντας την % ανάκτησή τους. Ένα ενδεικτικό χρωματογράφημα που ελήφθη, αλλά και τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα, παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.



Εικόνα 7.15: Ενδεικτικό χρωματογράφημα του δείγματος και του Spiked διαλύματος της Υπρομελλόζης

Πίνακας 7.9: Αποτελέσματα ελέγχου ακρίβειας (Υπρομελλόζη)

Πρότυπο διάλυμα, STD	C _{Ονομαστική} : 97,6 µg/mL Μέση τιμή των STDs: 3998351 %RSD: 4,1				
Δείγμα (Background Content)	Μέση τιμή: 4631196 % Περιεκτικότητα: 5,6				
Ονομαστική Περιεκτικότητα (% w/w)	Εμβασδο_{Spiked}	Υπολογισθείσα Περιεκτικότητα (% w/w)	% Ανάκτηση	% Μέση Ανάκτηση	%RSD
4,9	8760818	5,0	101,5	102,2	3,0
4,9	8644350	4,8	99,5		
4,8	8883123	5,1	105,6		

Τα κριτήρια αποδοχής, κατά την αξιολόγηση της ακρίβειας, ικανοποιήθηκαν.

Πιστότητα

Επαναληψιμότητα / Ενδιάμεση Πιστότητα

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου αξιολογήθηκε, παρασκευάζοντας έξι (6) ανεξάρτητα Spiked διαλύματα, σε επίπεδο εμβολιασμού ισοδύναμο με 100 µg/mL και υπολογίζοντας την % ανάκτησή τους και την % σχετική τυπική απόκλιση μεταξύ τους. Όσον αφορά την ενδιάμεση πιστότητα της μεθόδου, αυτή αξιολογήθηκε παρασκευάζοντας τρία (3) ακόμα ανεξάρτητα Spiked διαλύματα, στο ίδιο επίπεδο εμβολιασμού, αλλά σε διαφορετική εργαστηριακή ημέρα. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 7.10: Αποτελέσματα ελέγχου πιστότητας (επαναληψιμότητας / ενδιάμεσης πιστότητας, Υπρομελλόζη)

Ονομαστική Περιεκτικότητα (% w/w)	Εμβασδο_{Spiked}	Μέση τιμή / Περιεκτικότητα (% w/w)	Υπολογισθείσα Περιεκτικότητα (% w/w)	% Μέση Ανάκτηση	% RSD
1st Ημέρα					
4,9	8760818	4631196 / 5,6	5,0	101,9	2,1
4,9	8644350		4,8		
4,8	8883123		5,1		

4,9	8795932		5,0		
4,9	8802899		5,0		
4,9	8724062		4,9		
2nd Ημέρα					
5,1	8927181	4631196 / 5,6	5,3	102,9	1,3
5,1	8842588		5,2		
5,1	8920332		5,2		
Overall %RSD: % RSD_R: 1,8					

Τα κριτήρια αποδοχής, κατά την αξιολόγηση της πιστότητας, ικανοποιήθηκαν.

7.3 Αποτελέσματα επικύρωσης της μεθόδου προσδιορισμού της Μικροκρυσταλλικής Κυτταρίνης

Έλεγχος καταλληλότητας συστήματος

Ο έλεγχος καταλληλότητας του συστήματος πραγματοποιήθηκε πριν από την επικύρωση της μεθόδου, χρησιμοποιώντας το πρότυπο διάλυμα της Μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης (STD, 2,02 mg/mL) που παρασκευάστηκε και μετρώντας την απορρόφησή του, έξι (6) συνεχόμενες φορές. Οι τιμές της απορρόφησης που ελήφθησαν από τις έξι συνεχόμενες μετρήσεις, παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 7.11: Αποτελέσματα ελέγχου καταλληλότητας του συστήματος (MCC)

STDs	Απορρόφηση
STD_1_1	0,326
STD_1_2	0,308
STD_1_3	0,324
STD_1_4	0,320
STD_1_5	0,315
STD_1_6	0,305
Μέση τιμή	0,316

% RSD	2,7
--------------	------------

Ειδικότητα

Οι απορροφήσεις που ελήφθησαν κατά την μέτρηση, τόσο του λευκού, όσο και του διαλύματος ειδικότητας ($Abs = 0,000$), επιβεβαίωσαν ότι πράγματι, κανένα από τα υπόλοιπα έκδοχα που περιέχονται στο τελικό φαρμακευτικό προϊόν δεν απορροφά στα 223 nm.

Τα κριτήρια αποδοχής, κατά την αξιολόγηση της ειδικότητας, ικανοποιήθηκαν.

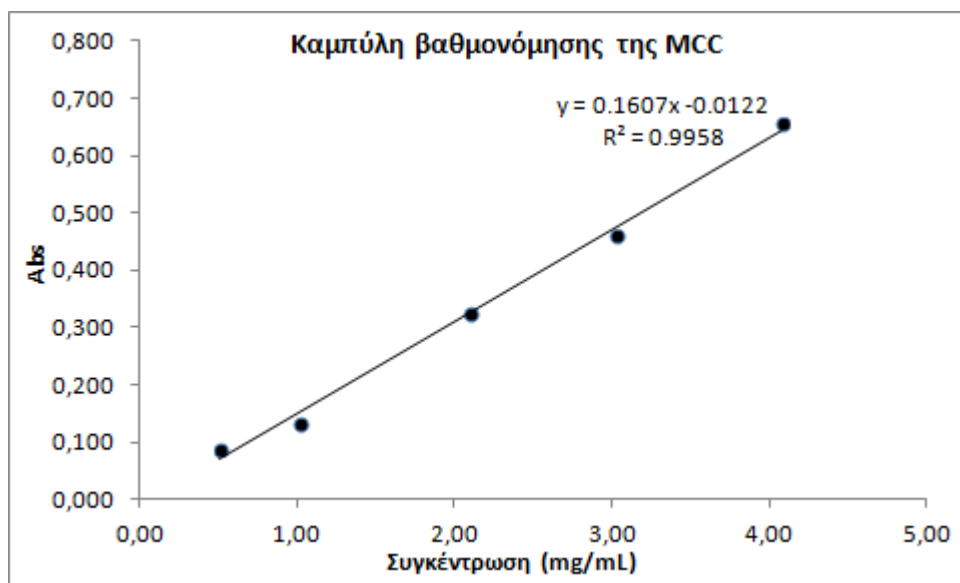
Γραμμικότητα / Εύρος γραμμικής περιοχής

Η αξιολόγηση της γραμμικότητας της αναλυτικής μεθοδολογίας, που χρησιμοποιήθηκε για την ακριβή ποσοτικοποίηση της Μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης, πραγματοποιήθηκε με ανάλυση - μέτρηση των προτύπων διαλυμάτων της στα ακόλουθα επίπεδα συγκεντρώσεων: 0,50 mg/mL, 1,01 mg/mL, 2,02 mg/mL, 3,03 mg/mL και 4,04 mg/mL. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 7.12: Αποτελέσματα ελέγχου γραμμικότητας (MCC)

Συγκέντρωση (mg/mL)	Απορρόφηση	% Ανάκτηση
0,51	0,088	111
1,01	0,135	86
2,10	0,324	100
3,03	0,461	98
4,08	0,656	104
Κλίση	0,161	
Τομή	-0,012	
R²	0,996	

Η καμπύλη βαθμονόμησης της απορρόφησης των προτύπων αυτών, σε συνάρτηση με την συγκέντρωσή τους στο τελικό διάλυμα, που σχεδιάστηκε μέσω της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων, αποδείχθηκε ότι είναι γραμμική, ενώ ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2) ισούταν με 0,996, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 7.16: Καμπύλη βαθμονόμησης της Μικροκρυσταλλικής Κυτταρίνης

Τα κριτήρια αποδοχής, κατά την αξιολόγηση της γραμμικότητας, ικανοποιήθηκαν.

Όσον αφορά το εύρος της γραμμικής περιοχής, η ανάλυση των προτύπων διαλυμάτων της Μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης, επέτρεψε τον καθορισμό ενός γραμμικού εύρους από 0,51 mg/mL έως 4,08 mg/mL, που αντιστοιχεί σε περιεκτικότητα MCC ίση με 12,6 - 101 % w/w. Η % Ανάκτηση των διαλυμάτων αυτών κυμαινόταν μεταξύ 86 - 111 %, γεγονός που πιστοποιεί τη κατάλληλη ποσοτικοποίηση του αναλύτη σε αυτό το εύρος.

Όριο ποσοτικοποίησης

Το όριο ποσοτικοποίησης της συγκεκριμένης αναλυτικής μεθοδολογίας αξιολογήθηκε, παρασκευάζοντας ένα **Πρότυπο διάλυμα Α** (STD-A, 0,50 mg/mL) και αναλύοντάς το, πέντε (5) συνεχόμενες φορές. Τα αποτελέσματα της απορρόφησης που ελήφθησαν, παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 7.13: Αποτελέσματα ελέγχου ορίου ποσοτικοποίησης (MCC)

Μετρήσεις	Απορρόφηση	%RSD
1	0,0580	8,8
2	0,0520	
3	0,0590	
4	0,0480	
5	0,0510	

Ο λόγος απόκρισης του προτύπου διαλύματος, ως προς την απόκριση του διαλύματος ειδικότητας, δεν μπορούσε να οριστεί, λόγω μηδενικής απορρόφησης του διαλύματος ειδικότητας, συνεπώς θεωρήθηκε ότι το κριτήριο πληρούνταν. Τα κριτήρια αποδοχής λοιπόν, κατά την αξιολόγηση του ορίου ποσοτικοποίησης, ικανοποιήθηκαν.

Από τα αποτελέσματα αυτά, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της αξιολόγησης του εύρους γραμμικής περιοχής, αποδεικνύεται ότι το όριο ποσοτικοποίησης είναι δυνατόν να καθοριστεί σε 0,51 mg MCC/mL τελικού διαλύματος που αντιστοιχεί σε περιεκτικότητα ίση με 12,6 % w/w.

Ακρίβεια

Η ακρίβεια της συγκεκριμένης αναλυτικής μεθοδολογίας, αξιολογήθηκε παρασκευάζοντας τρία (3) ανεξάρτητα Spiked διαλύματα, σε επίπεδο εμβολιασμού ισοδύναμο με 2,02 mg/mL και υπολογίζοντας την % ανάκτησή τους. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 7.14: Αποτελέσματα ελέγχου ακρίβειας (MCC)

Πρότυπο διάλυμα, STD	Ονομαστική: 2,1 mg/mL Μέση τιμή των STDs: 0,324 %RSD: 2,7				
Δείγμα (Background Content)	Μέση τιμή: 0,351 % Περιεκτικότητα: 54,8				
Ονομαστική Περιεκτικότητα (% w/w)	Απορ/ση ^{Spiked}	Υπολογισθείσα Περιεκτικότητα (% w/w)	% Ανάκτηση	% Μέση Ανάκτηση	%RSD
52,4	0,640	47,3	90,3	88,7	2,8
49,2	0,637	44,2	90,0		
49,5	0,638	42,5	85,9		

Τα κριτήρια αποδοχής, κατά την αξιολόγηση της ακρίβειας, ικανοποιήθηκαν.

Πιστότητα

Επαναληψιμότητα / Ενδιάμεση Πιστότητα

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου αξιολογήθηκε, παρασκευάζοντας έξι (6) ανεξάρτητα Spiked διαλύματα, σε επίπεδο εμβολιασμού ισοδύναμο με 2,02 mg/mL και υπολογίζοντας την % ανάκτησή τους και την % σχετική τυπική απόκλιση μεταξύ τους.

Όσον αφορά την ενδιάμεση πιστότητα της μεθόδου, αυτή αξιολογήθηκε παρασκευάζοντας τρία (3) ακόμα ανεξάρτητα Spiked διαλύματα, στο ίδιο επίπεδο εμβολιασμού, αλλά σε διαφορετική εργαστηριακή ημέρα. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 7.15: Αποτελέσματα ελέγχου πιστότητας (επαναληψιμότητας / ενδιάμεσης πιστότητας, MCC)

Ονομαστική Περιεκτικότητα (% w/w)	Απορ/ση ^{Spiked}	Μέση τιμή / Περιεκτικότητα (% w/w)	Υπολογισθείσα Περιεκτικότητα (% w/w)	% Μέση Ανάκτηση	% RSD
1st Ημέρα					
52,4	0,640	0,351/ 54,8	47,3	88,0	2,6
49,2	0,637		44,2		
49,5	0,638		42,5		
51,1	0,633		45,7		
50,8	0,630		44,4		
50,3	0,630		42,6		
2nd Ημέρα					
51,2	0,631	0,351/ 54,8	45,5	86,5	1,1
50,9	0,630		43,4		
51,2	0,625		43,7		
Overall %RSD: % RSD_R: 6,4					

Τα κριτήρια αποδοχής, κατά την αξιολόγηση της πιστότητας, ικανοποιήθηκαν.

7.4 Αποτελέσματα επικύρωσης της μεθόδου προσδιορισμού του Στεατικού Μαγνησίου

Έλεγχος καταλληλότητας συστήματος

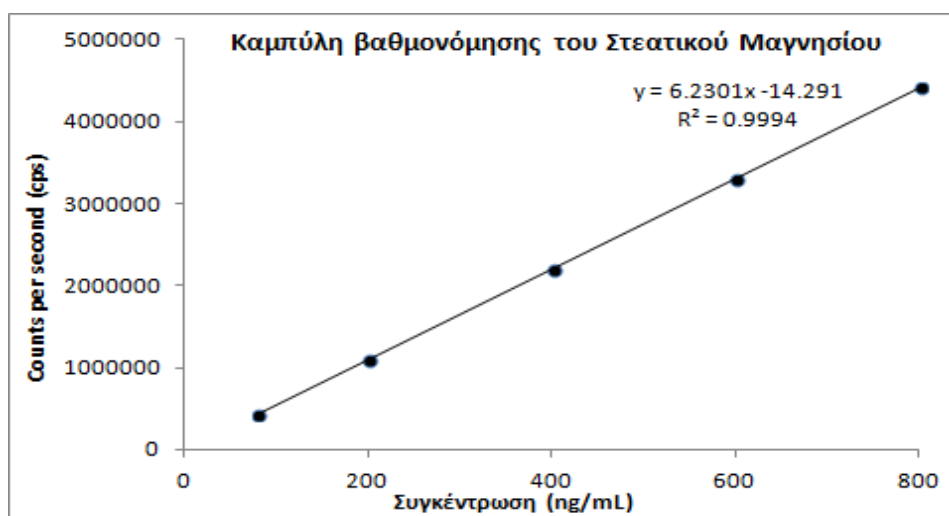
Ο έλεγχος καταλληλότητας του συστήματος πραγματοποιήθηκε πριν από την επικύρωση της μεθόδου, χρησιμοποιώντας τα πρότυπα διαλύματα του Στεατικού Μαγνησίου που παρασκευάστηκαν. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση των προτύπων αυτών διαλυμάτων στα ακόλουθα επίπεδα συγκεντρώσεων: 80 ng/mL, 200 ng/mL, 400 ng/mL, 600 ng/mL και 800 ng/mL και σχεδιάστηκε η καμπύλη βαθμονόμησης της μέτρησής τους, σε συνάρτηση

με την συγκέντρωσή τους στο τελικό διάλυμα. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των ελαχίστων τετραγώνων, από την οποία προέκυψε η εξίσωση παλινδρόμησης, μέσω της οποίας υπολογίστηκε ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2), η κλίση και η τομή. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 7.16: Αποτελέσματα ελέγχου καταλληλότητας του συστήματος (Στεατικό Μαγνήσιο)

Στοιχείο: ^{24}Mg	
Συγκέντρωση (ng/mL)	Counts per second (cps)
80	432587
200	1098896
400	2210794
600	3296691
800	4415589
Κλίση	6,23
Τομή	-14,29
R^2	0,9994

Η καμπύλη βαθμονόμησης της ανάλυσης των προτύπων αυτών, σε συνάρτηση με την συγκέντρωσή τους στο τελικό διάλυμα, που σχεδιάστηκε μέσω της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων, αποδείχθηκε ότι είναι γραμμική, ενώ ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2) ισούταν με 0,9994, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 7.17: Καμπύλη βαθμονόμησης του Στεατικού Μαγνησίου

Το κριτήριο αποδοχής, κατά τον έλεγχο καταλληλότητας του συστήματος, ικανοποιήθηκε.

Ειδικότητα

Η ειδικότητα της συγκεκριμένης αναλυτικής μεθοδολογίας αξιολογήθηκε, συγκρίνοντας την απόκριση του στοιχειακού Μαγνησίου (Mg) τόσο στο λευκό διάλυμα, όσο και στο χαμηλότερο πρότυπο της καμπύλης βαθμονόμησης.

Εάν η απόκριση του λευκού διαλύματος υπερέβαινε το 20 % της απόκρισης του χαμηλότερου προτύπου της καμπύλης βαθμονόμησης, η ειδικότητα θα έπρεπε να αποδειχθεί με τη χρήση δευτερογενών ισότοπων του Μαγνησίου, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ασήμαντη αλληλεπίδραση των υπολοίπων συστατικών που περιέχονται στο τελικό φαρμακευτικό προϊόν. Για τον λόγο αυτό, τα ισότοπα που αναλύθηκαν ήταν: ^{24}Mg , ^{25}Mg και ^{26}Mg . Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 7.17: Αποτελέσματα ελέγχου ειδικότητας (Στεατικό Μαγνήσιο)

Ισότοπα	Counts per second (cps)		
	^{24}Mg	^{25}Mg	^{26}Mg
Λευκό διάλυμα	69471	16698	10625
Πρότυπο A, STD-A	428744	102438	71779
% Απόκριση του Λευκού	16,2	16,3	14,8

Από τα αποτελέσματα αυτά, παρατηρήθηκε ότι το ισότοπο ^{24}Mg απαντάται σε μεγαλύτερη αφθονία, συνεπώς χρησιμοποιήθηκε ως αναλύτης - στόχος σε όλα τα επόμενα χαρακτηριστικά επικύρωσης, που αξιολογήθηκαν.

Το κριτήριο αποδοχής, κατά την αξιολόγηση της ειδικότητας, ικανοποιήθηκε.

Γραμμικότητα

Η αξιολόγηση της γραμμικότητας της αναλυτικής μεθοδολογίας, που χρησιμοποιήθηκε για την ακριβή ποσοτικοποίηση του Στεατικού Μαγνησίου, πραγματοποιήθηκε με ανάλυση των προτύπων διαλυμάτων του στα ακόλουθα επίπεδα συγκεντρώσεων: 80 ng/mL, 200 ng/mL, 400 ng/mL, 600 ng/mL και 800 ng/mL. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, είναι κοινά με τα αποτελέσματα ελέγχου καταλληλότητας του συστήματος, συνεπώς παρουσιάζονται παραπάνω.

Τα κριτήρια αποδοχής, κατά την αξιολόγηση της γραμμικότητας, ικανοποιήθηκαν.

Όριο ποσοτικοποίησης

Το όριο ποσοτικοποίησης της συγκεκριμένης αναλυτικής μεθοδολογίας, αξιολογήθηκε παρασκευάζοντας έξι (6) ανεξάρτητα Spiked διαλύματα, σε επίπεδο εμβολιασμού ισοδύναμο με 80 ng/mL (20 %), και υπολογίζοντας τόσο την % ανάκτησή τους, όσο και τη % σχετική τυπική απόκλιση μεταξύ τους. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 7.18: Αποτελέσματα ελέγχου ορίου ποσοτικοποίησης (Στεατικό Μαγνήσιο)

Πρότυπο διάλυμα, STD	C _{Ονομαστική} : 80,0 ng/mL Counts per second (cps) του STD: 432587				
Δείγμα (Background Content)	Counts per second (cps): 2440587 % Περιεκτικότητα: 1,6				
Ονομαστική Περιεκτικότητα (% w/w)	Cps _{Spiked}	Υπολογισθείσα Περιεκτικότητα (% w/w)	% Ανάκτηση	% Μέση Ανάκτηση	%RSD
1,3	2642299	1,1	92,2	91	6,0
1,2	2637176	1,1	94,8		
1,0	2591833	0,9	97,5		
1,1	2612190	0,9	83,8		
1,0	2599942	0,9	89,1		
1,2	2601871	1,0	90,9		

Τα κριτήρια αποδοχής, κατά την αξιολόγηση του ορίου ποσοτικοποίησης, ικανοποιήθηκαν.

Ακρίβεια

Η ακρίβεια της συγκεκριμένης αναλυτικής μεθοδολογίας, αξιολογήθηκε παρασκευάζοντας τρία (3) ανεξάρτητα Spiked διαλύματα, σε επίπεδο εμβολιασμού ισοδύναμο με 400 ng/mL (100 %) και υπολογίζοντας την % ανάκτησή τους. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 7.19: Αποτελέσματα ελέγχου ακρίβειας (Στεατικό Μαγνήσιο)

Πρότυπο διάλυμα, STD	C _{Ονομαστική} : 400,0 ng/mL Counts per second (cps) of the STD: 2210794				
Δείγμα (Background Content)	Counts per second (cps): 2440587 % Περιεκτικότητα: 1,6				
Ονομαστική Περιεκτικότητα (% w/w)	CpS_{Spiked}	Υπολογισθείσα Περιεκτικότητα (% w/w)	% Ανάκτηση	% Μέση Ανάκτηση	%RSD
1,3	4411587	1,4	101,2	103,2	2,0
1,4	4538896	1,5	103,1		
1,4	4584345	1,6	105,4		

Τα κριτήρια αποδοχής, κατά την αξιολόγηση της ακρίβειας, ικανοποιήθηκαν.

Πιστότητα

Επαναληψιμότητα / Ενδιάμεση Πιστότητα

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου αξιολογήθηκε, παρασκευάζοντας έξι (6) ανεξάρτητα Spiked διαλύματα, σε επίπεδο εμβολιασμού ισοδύναμο με 400 ng/mL (100 %) και υπολογίζοντας την % ανάκτησή τους και την % σχετική τυπική απόκλιση μεταξύ τους. Όσον αφορά την ενδιάμεση πιστότητα της μεθόδου, αυτή αξιολογήθηκε παρασκευάζοντας τρία (3) ακόμα ανεξάρτητα Spiked διαλύματα, στο ίδιο επίπεδο εμβολιασμού, αλλά σε διαφορετική εργαστηριακή ημέρα. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 7.20: Αποτελέσματα ελέγχου πιστότητας (επαναληψιμότητας / ενδιάμεσης πιστότητας, Στατικό Μαγνήσιο)

Ονομαστική Περιεκτικότητα (% w/w)	CpS_{Spiked}	Μέση τιμή / Περιεκτικότητα (% w/w)	Υπολογισθείσα Περιεκτικότητα (% w/w)	% Μέση Ανάκτηση	% RSD
1st Ημέρα					
1,2	4611587	2440587/ 1,6	1,1	99,0	2,1
1,2	4639986		1,1		
1,0	4442365		1,3		
1,1	4568903		1,2		
1,1	4590534		1,1		

1,0	4448890		1,0		
2nd Ημέρα					
1,1	4490275	2440587/ 1,6	1,0	99,0	1,3
1,2	4589032		1,2		
1,2	4598021		1,0		
Overall %RSD: % RSD_R: 1,6					

Τα κριτήρια αποδοχής, κατά την αξιολόγηση της πιστότητας, ικανοποιήθηκαν.

7.5 Σύνοψη των αποτελεσμάτων επικύρωσης - Συμπεράσματα

Στην υποπαράγραφο αυτή, αναφέρονται συνοπτικά όλα τα αποτελέσματα επικύρωσης των μεθόδων που αναπτύχθηκαν λεπτομερώς, προηγουμένως, για την ακριβή ποσοτικοποίηση των εκδόχων του φαρμακευτικού σκευάσματος Effient™.

Μαννιτόλη

Έλεγχος καταλληλότητας συστήματος: % RSD: 0,093

Ειδικότητα: Καμία κορυφή δεν εμφανίζεται στο χρόνο έκλουσης της Μαννιτόλης, κατά την ανάλυση τόσο του λευκού, όσο και του διαλύματος ειδικότητας.

Γραμμικότητα: Γραμμική καμπύλη βαθμονόμησης, R²: 0,997

Εύρος γραμμικής περιοχής: 2,5 - 20 µg/mL, που αντιστοιχεί σε περιεκτικότητα Μαννιτόλης ίση με 7,5 - 60 % w/w

Όριο ποσοτικοποίησης: 2,5 µg Μαννιτόλης/mL τελικού διαλύματος που αντιστοιχεί σε περιεκτικότητα ίση με 7,5 % w/w.

Ακρίβεια: % Mean Recovery: 92,0 / % RSD: 0,84

Πιστότητα:

Επαναληψιμότητα: % RSD (n=6): 1,0

Ενδιάμεση πιστότητα: % RSD (n=3): 2,3, % RSD_R (n=9): 1,6

Υπρομελλόζη

Έλεγχος καταλληλότητας συστήματος: % RSD: 4,1

Ειδικότητα: Καμία κορυφή δεν εμφανίζεται στο χρόνο έκλουσης της Υπρομελλόζης, κατά την ανάλυση τόσο του λευκού, όσο και του διαλύματος ειδικότητας.

Γραμμικότητα: Γραμμική καμπύλη βαθμονόμησης, R^2 : 0,99994

Εύρος γραμμικής περιοχής: 24,4 - 195,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, που αντιστοιχεί σε περιεκτικότητα Υπρομελλόζης ίση με 1,22 - 9,76 % w/w

Όριο ποσοτικοποίησης: 24,4 μg Υπρομελλόζης/ mL τελικού διαλύματος που αντιστοιχεί σε περιεκτικότητα ίση με 1,22 % w/w.

Ακρίβεια: % Mean Recovery: 102,2 / % RSD: 3,0

Πιστότητα:

Επαναληψιμότητα: % RSD (n=6): 2,1

Ενδιάμεση πιστότητα: % RSD (n=3): 1,3, % RSD_R (n=9): 1,8

Μικροκρυσταλλική Κυτταρίνη

Έλεγχος καταλληλότητας συστήματος: % RSD: 2,7

Ειδικότητα: Κανένα από τα υπόλοιπα έκδοχα δεν απορροφούν στα 223 nm, όπως παρατηρήθηκε κατά τη μέτρηση τόσο του λευκού, όσο και του διαλύματος ειδικότητας.

Γραμμικότητα: Γραμμική καμπύλη βαθμονόμησης, R^2 : 0,996

Εύρος γραμμικής περιοχής: 0,51 - 4,08 mg/mL , που αντιστοιχεί σε περιεκτικότητα MCC ίση με 12,6 - 101 % w/w

Όριο ποσοτικοποίησης: 0,51 mg MCC/ mL τελικού διαλύματος που αντιστοιχεί σε περιεκτικότητα ίση με 12,6 % w/w.

Ακρίβεια: % Mean Recovery: 88,7 / % RSD: 2,8

Πιστότητα:

Επαναληψιμότητα: % RSD (n=6): 2,6

Ενδιάμεση πιστότητα: % RSD (n=3): 1,1, % RSD_R (n=9): 6,4

Στεατικό Μαγνήσιο

Έλεγχος καταλληλότητας συστήματος: Γραμμική καμπύλη βαθμονόμησης, R^2 : 0,9994

Ειδικότητα: Η απόκριση του λευκού διαλύματος δεν υπερέβαινε

το 20 % της απόκρισης του χαμηλότερου προτύπου της καμπύλης βαθμονόμησης, συνεπώς δεν υπάρχει αλληλεπίδραση των υπολοίπων συστατικών του μητρικού υλικού στον αναλύτη - στόχο.

Γραμμικότητα: Γραμμική καμπύλη βαθμονόμησης, R^2 : 0,9994

Εύρος γραμμικής περιοχής: 80 - 800 ng/mL, που αντιστοιχεί σε περιεκτικότητα Στεατικού Μαγνησίου ίση με 0,2 - 2,0 % w/w

Όριο ποσοτικοποίησης: 80 ng Στεατικού Μαγνησίου/mL τελικού διαλύματος που αντιστοιχεί σε περιεκτικότητα ίση με 0,2 % w/w.

Ακρίβεια: % Mean Recovery: 103,2 / % RSD: 2,0

Πιστότητα:

Επαναληψιμότητα: % RSD (n=6): 2,1

Ενδιάμεση πιστότητα: % RSD (n=3): 1,3, % RSD_R (n=9): 1,6

Βάσει λοιπόν, των ανωτέρω αποτελεσμάτων, οι αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν, θεωρήθηκαν κατάλληλες για τον σκοπό για τον οποίο προορίστηκαν.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

8.1 Ποσοτικά αποτελέσματα

Οι επικυρωμένες, πλέον, αναλυτικές μεθοδολογίες χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια, για τον ποσοτικό προσδιορισμό όλων των περιεχόμενων εκδόχων του τελικού φαρμακευτικού προϊόντος **Effient™**, προερχόμενο από δύο διαφορετικούς τόπους παραγωγής, την Αυστραλία (Lot. C804457, Lot. C745139) και την Ευρώπη (Lot. C910328, Lot. C889119). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης, περιγράφονται στους ακόλουθους πίνακες:

Πίνακας 8.1: Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού των εκδόχων δειγμάτων Effient™ (AUS)

Έκδοχο	Αποτελέσματα: % w/w Περιεκτικότητα στον πυρήνα	
	Lot: C804457	Lot: C745139
Μαννιτόλη	30,0 (%RSD: 0,55, n=3)	29,7 (%RSD: 3,1, n=3)
Υπρομελλόζη	3,3 (%RSD: 2,4, n=3)	3,2 (%RSD: 6,5, n=3)
Μικροκρυσταλλική Κυτταρίνη	49,0 (%RSD: 8,5, n=3)	51,6 (%RSD: 10,7, n=3)
Στεατικό Μαγνήσιο	1,00 (%RSD: 1,9, n=3)	1,03 (%RSD: 1,7, n=3)
Κροσκαρμελλόζη	11,2%	9,0%

Πίνακας 8.2: Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού των εκδόχων δειγμάτων Effient™ (EU)

Έκδοχο	Αποτελέσματα: % w/w Περιεκτικότητα στον πυρήνα	
	Lot: C910328	Lot: C889119
Μαννιτόλη	30,9 (%RSD:5,3, n=3)	29,9 (%RSD: 4,8, n=3)

Έκδοχο	Αποτελέσματα: % w/w Περιεκτικότητα στον πυρήνα	
	Lot: C910328	Lot: C889119
Υπρομελλόζη	3,3 (%RSD: 2,9, n=3)	3,4 (%RSD: 2,4, n=3)
Μικροκρυσταλλική Κυτταρίνη	50,3 (%RSD: 1,9, n=3)	51,5 (%RSD: 2,4, n=3)
Στεατικό Μαγνήσιο	1,00 (%RSD: 5,0, n=3)	1,00 (% RSD: 2,8, n=3)
Κροσκαρμελλόζη	9,0	8,7

Προκειμένου να αποδειχθεί ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων, που προέρχονταν από την Αυστραλία και την Ευρώπη, πραγματοποιήθηκε στατιστική αξιολόγηση και επεξεργασία των αναλυτικών αποτελεσμάτων. Η αξιολόγηση αυτή βασίστηκε στη μονοπαραγοντική ανάλυση της διακύμανσης (Analysis of Variation - ANOVA), σε επίπεδο εμπιστοσύνης που καθορίστηκε στο 95 % ($\alpha = 0,05$). Γενικότερος σκοπός της ANOVA είναι η ανεύρεση και η στατιστική σύγκριση των επιμέρους πηγών διακύμανσης (ή αβεβαιότητας), που συνεισφέρουν στην ολική διακύμανση (ή αβεβαιότητα) αποτελέσματος το οποίο προκύπτει από συνδυασμό ομάδων μετρήσεων.

Ένα επίπεδο εμπιστοσύνης ισοδύναμο με 95 % (δηλαδή, πιθανότητα σφάλματος 1ου είδους ισοδύναμη με 5 %) σχετίζεται με μία κρίσιμη τιμή P ίση με 0,05, που σημαίνει ότι για κάθε τιμή P ίση ή μικρότερη του 0,05, η πιθανότητα των δύο συγκρινόμενων ομάδων να είναι σημαντικά διαφορετικές, δε μπορεί να αγνοηθεί. Η ίδια εκτίμηση μπορεί να βασιστεί και στη στατιστική τιμή F , για την οποία η ισοδύναμη κρίσιμη τιμή δηλώνεται στο πίνακα που ακολουθεί ως F -crit. Μια τιμή F ίση ή μεγαλύτερη από την F -crit, σχετίζεται με τη πιθανότητα των δύο ομάδων να είναι πράγματι, διαφορετικές. Στον πίνακα που ακολουθεί, παρουσιάζονται τα δεδομένα της στατιστικής αξιολόγησης.

Πίνακας 8.3: Δεδομένα στατιστικής αξιολόγησης

Έκδοχο	p -value	F -value	F -crit
Μαννιτόλη	0,46	0,588	5,117
Υπρομελλόζη	0,21	1,757	4,965
Μικροκρυσταλλική Κυτταρίνη	0,76	0,0975	4,965

Στεατικό Μαγνήσιο	0,14	2,752	5,318
Κροσκαρμελλόζη	0,38	1,268	18,512

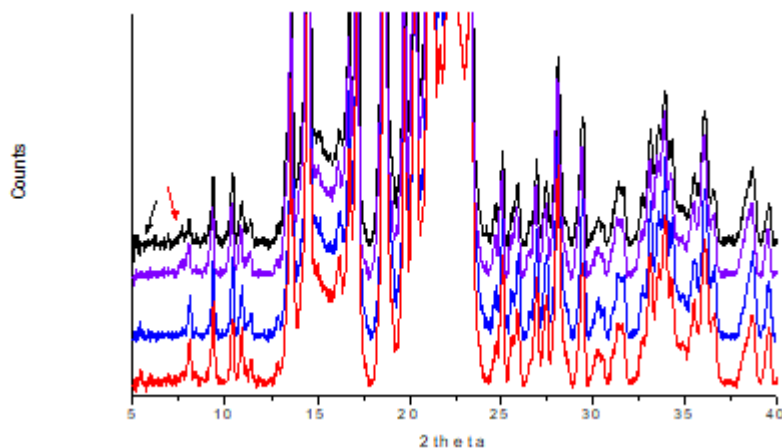
Από τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα, παρατηρείται ότι σε όλα τα έκδοχα η σχετιζόμενη τιμή P είναι πολύ μεγαλύτερη από την κρίσιμη τιμή, P_{crit} (0,05), ενώ η τιμή F είναι πολύ μικρότερη της F_{crit} , γεγονός που σημαίνει ότι τα δείγματα προερχόμενα από την Αυστραλία και την Ευρώπη δεν είναι σημαντικά διαφορετικά, σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95 %.

8.2 Ποιοτικά αποτελέσματα

Για την εξαγωγή ποιοτικών αποτελεσμάτων, τα δείγματα του τελικού φαρμακευτικού προϊόντος αναλύθηκαν τόσο μέσω περίθλασης ακτίνων Χ (X - Ray Diffraction, XRD), όσο και μέσω υπέρυθρης (Infrared - IR) ακτινοβολίας.

Περίθλαση ακτίνων Χ (XRD)

Τα δείγματα που προήλθαν από την Αυστραλία (Lot. C804457, Lot. C745139) και την Ευρώπη (Lot. C910328, Lot. C889119) αναλύθηκαν και συγκρίθηκαν μεταξύ τους, όπως φαίνεται στη παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 8.1: Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων του Prasugrel με XRD (AUS: Lot. C804457 - Μπλε γραμμή, Lot. C745139 - Κόκκινη γραμμή, EU: Lot. C910328 - Μαύρη γραμμή, Lot. C889119 - Μωβ γραμμή)

Παρατηρείται λοιπόν, ότι το προφίλ των τεσσάρων δειγμάτων είναι ταυτόσημο μεταξύ τους. Ωστόσο, εμφανίζονται και μικρές ασήμαντες διαφορές, όπως η κορυφή που λείπει (μαύρο βέλος) και εκείνη με τη μικρότερη σχετική ένταση (κόκκινο βέλος) στα δείγματα της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Οι λεπτομερείς λίστες των κορυφών αυτών, εμφανίζονται στους ακόλουθους πίνακες:

Πίνακας 8.4: Εμφάνιση όλων των κορυφών για τα αντίστοιχα προφίλ XRD που αποκτήθηκαν για το Lot. C804457 (αριστερά) και το Lot. C745139 (δεξιά)

Angle 2-Theta °	D value Angstrom	Intensity Count	Intensity %	Angle 2-Theta °	D value Angstrom	Intensity Count	Intensity %
5.5	16.04428	78.8	0.3	5.4	16.36071	60.3	0.3
7.8	11.26113	103.4	0.4	7.7	11.53400	93.2	0.4
8.2	10.82237	979.2	3.9	8.0	10.97886	1254.3	5.4
8.6	10.33144	137.6	0.5	8.3	10.60564	205.0	0.9
9.4	9.35990	2287.2	9.0	9.3	9.46586	2204.8	9.4
10.5	8.42551	2225.8	8.8	10.4	8.50889	1988.2	8.5
11.0	8.03781	1543.8	6.1	10.9	8.11759	1650.0	7.1
11.4	7.74309	466.5	1.8	11.3	7.80145	504.2	2.2
13.0	6.80876	445.9	1.8	12.9	6.85947	594.1	2.5
13.7	6.45869	9822.0	38.8	13.6	6.51404	9814.9	42.0
14.6	6.04263	16491.5	65.2	14.5	6.09239	15360.0	65.8
15.0	5.90433	3475.7	13.7	14.9	5.93258	3611.3	15.5
16.3	5.42307	3846.8	15.2	16.2	5.47266	3869.2	16.6
16.9	5.23678	6970.9	27.6	16.8	5.27622	7007.1	30.0
17.3	5.12567	16013.2	63.3	17.2	5.15722	16940.5	72.5
18.8	4.72111	25282.7	100.0	18.7	4.75096	23350.3	100.0
19.9	4.46115	11516.4	45.6	19.8	4.48781	11516.5	49.3
20.5	4.33877	19727.3	78.0	20.3	4.36430	19072.0	81.7
21.3	4.17218	17534.9	69.4	21.2	4.19447	17481.3	74.9
21.8	4.07914	11268.0	44.6	21.7	4.09135	10474.2	44.9
22.5	3.95698	13050.9	51.6	22.2	3.99796	12416.7	53.2
23.4	3.80052	16435.9	65.0	22.4	3.96324	12965.2	55.5

24.4	3.58534	1446.0	5.7	23.3	3.81909	14825.7	63.5
25.2	3.53686	3623.8	14.3	24.7	3.59753	993.4	4.3
25.9	3.44358	1121.8	4.4	25.0	3.55334	3752.3	16.1
26.0	3.42968	2304.8	9.1	25.6	3.47223	1153.7	4.9
27.0	3.29882	3134.7	12.4	25.8	3.44574	2153.9	9.2
27.3	3.26348	452.6	1.8	26.9	3.31151	3281.2	14.1
27.5	3.23741	2490.0	9.8	27.4	3.25085	2570.0	11.0
28.2	3.16314	7220.9	28.6	28.1	3.17653	6973.5	29.9
29.5	3.02672	4161.3	16.5	29.4	3.03852	3628.1	15.5
30.4	2.94027	1026.3	4.1	30.3	2.94985	869.1	3.7
31.6	2.83101	1693.3	6.7	31.4	2.84279	1683.0	7.2
32.9	2.72419	1245.8	4.9	31.8	2.80768	211.2	0.9
33.2	2.69518	4219.6	16.7	32.8	2.73163	1207.2	5.2
33.8	2.65296	3472.9	13.7	33.1	2.70496	3805.1	16.3
34.0	2.63751	5207.6	20.6	33.7	2.661047	3208.2	13.7
34.3	2.61281	3140.8	12.4	33.9	2.64514	5124.0	21.9
34.9	2.57176	1008.3	4.0	34.2	2.62141	2843.7	12.2
35.6	2.52067	2216.2	8.8	34.8	2.57826	1013.9	4.3
36.1	2.48313	4574.0	18.1	35.5	2.52879	2409.7	10.3
36.6	2.45463	1937.1	7.7	36.0	2.48991	4528.2	19.4
				36.5	2.46202	2038.7	8.7
				38.6	2.32945	2101.0	9.0
				39.5	2.28007	1693.8	7.3

Πίνακας 8.5: Εμφάνιση όλων των κορυφών για τα αντίστοιχα προφίλ XRD που αποκτήθηκαν για το Lot. C910328 (αριστερά) και το Lot. C889119 (δεξιά)

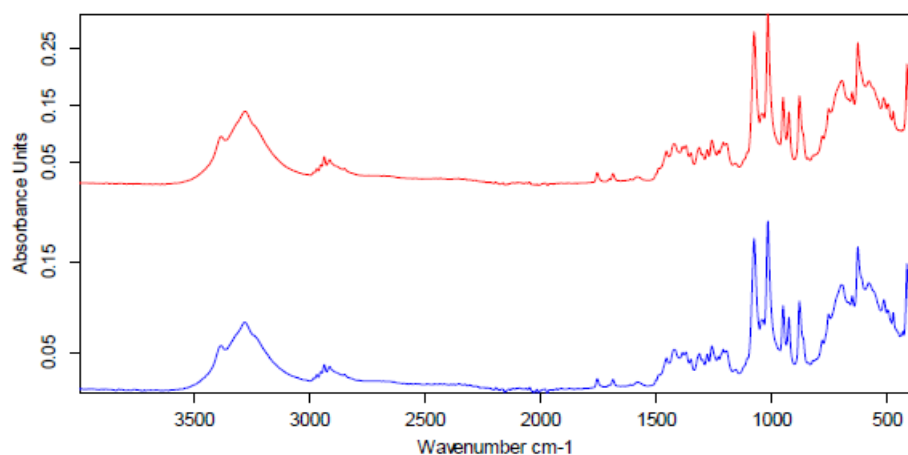
Angle 2-Theta °	D value Angstrom	Intensity Count	Intensity %
7.6	11.6224	139.7	0.6
8.0	11.0593	443.6	1.9
9.3	9.51969	1633.0	7.1
10.3	8.55575	1915.0	8.4
10.8	8.1582	1126.9	4.9
11.3	7.84086	483.8	2.1
12.9	6.86402	597.8	2.6
13.5	6.54107	7738.0	33.9
14.5	6.11465	14918.9	65.3
15.0	5.90838	3429.2	15.0
16.2	5.47425	3421.7	15.0
16.7	5.30625	7629.9	33.4
17.1	5.17043	13660.8	59.8
18.6	4.76217	22845.5	100.0
19.7	4.49814	9570.6	41.9
20.3	4.37337	17253.0	75.5
21.1	4.21525	18554.8	81.2
21.2	4.19606	15211.3	66.6
21.6	4.1132	11207.4	49.1
22.2	4.0034	12419.7	54.4
22.3	3.97873	12180.9	53.3
23.3	3.82237	16811.7	73.6
24.1	3.69158	149.6	0.7
24.6	3.61007	1204.1	5.3

Angle 2-Theta °	D value Angstrom	Intensity Count	Intensity %
8.0	11.0431	688.5	3.0
9.3	9.50942	1834.5	8.1
10.3	8.5463	1998.4	8.8
10.8	8.15794	1320.0	5.8
11.3	7.82696	500.6	2.2
12.8	6.89023	404.3	1.8
13.5	6.53562	8056.1	35.5
14.5	6.1126	15012.5	66.1
15.0	5.8985	3170.8	14.0
16.1	5.48883	3413.1	15.0
16.7	5.30615	7483.4	32.9
17.1	5.16882	15264.5	67.2
18.6	4.7613	22713.5	100.0
19.7	4.49802	9814.6	43.2
20.3	4.37281	17125.8	75.4
21.1	4.21352	17983.4	79.2
21.6	4.11337	10451.8	46.0
22.4	3.97034	12127.7	53.4
23.3	3.82143	17177.4	75.6
24.7	3.60773	1152.7	5.1
25.0	3.5586	2939.4	12.9
25.8	3.44868	2017.1	8.9
26.5	3.35551	732.8	3.2
26.9	3.31671	2791.4	12.3

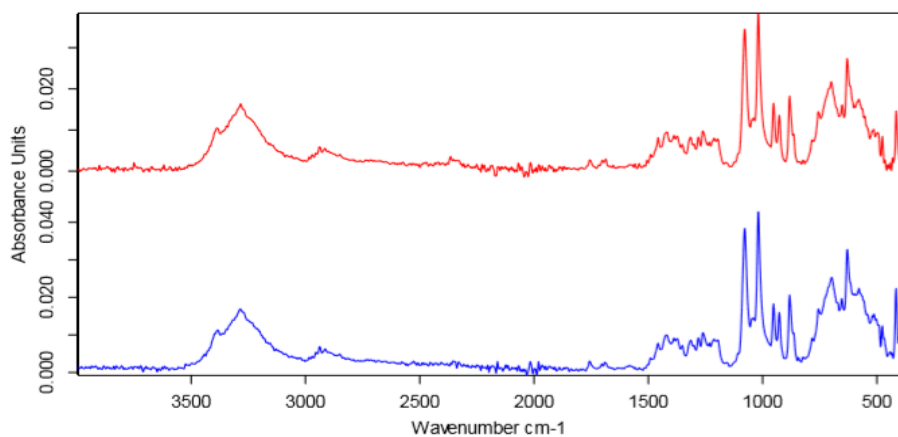
25.0	3.55899	2885.4	12.6	27.4	3.25545	1998.7	8.8
25.8	3.44904	1848.2	8.1	28.0	3.18065	6222.7	27.4
26.5	3.35775	641.7	2.8	28.3	3.14783	1208.5	5.3
26.9	3.31714	2363.4	10.3	29.3	3.04157	3955.9	17.4
27.4	3.25421	1733.7	7.6	30.2	2.95603	777.5	3.4
28.0	3.18175	5873.2	25.7	30.4	2.93519	567.9	2.5
28.3	3.15397	1639.9	7.2	31.3	2.8523	1728.2	7.6
29.3	3.04204	3728.5	16.3	31.5	2.83859	1608.4	7.1
30.2	2.95685	659.9	2.9	32.7	2.74007	1269.5	5.6
30.4	2.93752	567.8	2.5	33.0	2.70848	3557.3	15.7
31.3	2.85223	1851.2	8.1	33.5	2.67056	3550.1	15.6
32.7	2.73818	1311.1	5.7	33.8	2.64813	4928.9	21.7
33.1	2.70811	3597.4	15.7	34.1	2.62393	2982.3	13.1
33.6	2.66869	3581.9	15.7	34.8	2.57947	954.3	4.2
33.8	2.64837	4782.4	20.9	35.4	2.53164	2074.4	9.1
34.1	2.62374	2801.9	12.3	36.0	2.49326	4390.5	19.3
34.8	2.57872	993.2	4.3	36.5	2.46233	1715.2	7.6
35.4	2.53096	2013.8	8.8	38.6	2.33339	2162.9	9.5
36.0	2.49389	4012.6	17.6	39.5	2.28219	1410.6	6.2
36.5	2.46277	1634.4	7.2				
38.9	2.33361	2221.0	9.7				
39.5	2.28232	1234.7	5.4				

Υπέρυθρη ακτινοβολία (IR)

Η ανάλυση των Αυστραλιανών (Lot. C804457, Lot. C745139) και των Ευρωπαϊκών (Lot. C910328, Lot. C889119) δειγμάτων, μέσω υπέρυθρης ακτινοβολίας, παρείχε τα προφίλ που παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες:

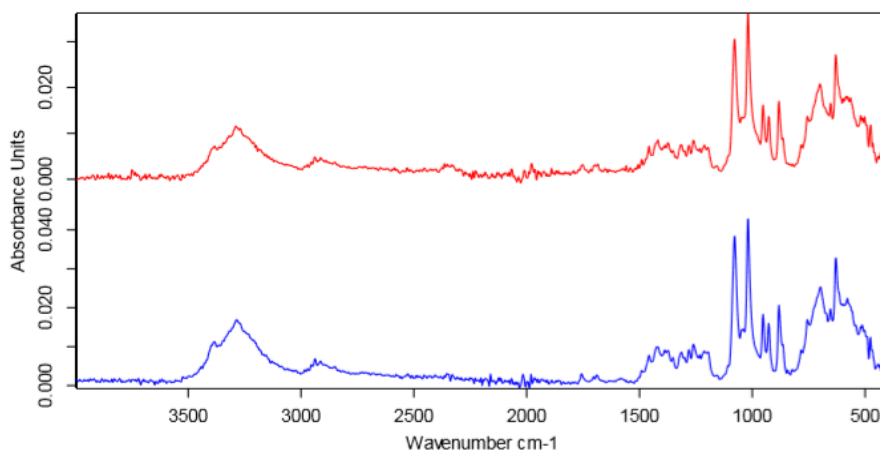


Εικόνα 8.2: Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων του Prasugrel με IR (AUS: Lot. C804457 - Μπλε γραμμή Lot. C745139 - Κόκκινη γραμμή)



Εικόνα 8.3: Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων του Prasugrel με IR (EU: Lot. C910328 - Μπλε γραμμή Lot. C889119 - Κόκκινη γραμμή)

Μετά την ανάλυση των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ ενός Αυστραλιανού και ενός Ευρωπαϊκού δείγματος, όπως φαίνεται και στην εικόνα που ακολουθεί:



Εικόνα 8.4: Αποτελέσματα συγκριτικής ανάλυσης δειγμάτων του Prasugrel με IR (EU: Lot. C910328 - Μπλε γραμμή και AUS: Lot. C804457 - Κόκκινη γραμμή)

Τέλος, για την επιβεβαίωση της ομοιότητας / συσχέτισης των φασμάτων υπερύθρου, όλα τα παραπάνω φάσματα συγκρίθηκαν με το φάσμα αναφοράς ενός Ευρωπαϊκού δείγματος (Lot. C910328). Ένα ποσοστό συσχέτισης μεγαλύτερο από 90 %, λειτουργεί ως υπερασπιστικό στοιχείο της ομοιότητας που παρουσιάζουν πράγματι, τα δείγματα. Συνεπώς, τα αποτελέσματα αναφέρονται παρακάτω:

Πίνακας 8.6: Αποτελέσματα ομοιότητας / συσχέτισης δειγμάτων Prasugrel

Lot	% Συσχέτιση	Αποτέλεσμα
C889119 [EU]	98,70	Παρόμοιο
C804457 [AUS]	98,56	Παρόμοιο
C745139 [AUS]	98,34	Παρόμοιο

8.3 Συμπεράσματα

Συνοψίζοντας λοιπόν, η επιτυχία μιας φαρμακοβιομηχανίας παραγωγής γενόσημων φαρμάκων, σε μία αγορά που χαρακτηρίζεται έντονα από το κόστος και την ταχύτητα, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις μελέτες αντίστροφης μηχανικής (Reverse Engineering Studies). Οι μελέτες αυτές καθίστανται το χρησιμότερο εργαλείο για την ανάπτυξη των γενόσημων φαρμάκων και την επίτευξη της βιοϊσοδυναμίας τους με τα πρωτότυπα φαρμακευτικά σκευάσματα, ενώ μια ορθολογική στρατηγική αντίστροφης μηχανικής που περιλαμβάνει την αποκωδικοποίηση της ποσοτικής σύστασης, τον χαρακτηρισμό της δραστικής ουσίας, μέσω ποιοτικών αποτελεσμάτων, και του καθορισμού της διαδικασίας παρασκευής μπορεί να μειώσει σημαντικά τα

χρονοδιαγράμματα ανάπτυξης και κόστους. Πέραν όλων αυτών ωστόσο, οι μελέτες αυτές παρέχουν αυξημένη γνώση και τεράστιο κίνητρο, στοιχεία που απορρέουν από την προσπάθεια κατανόησης του μηχανισμού δράσης του εκάστοτε φαρμάκου και ποσοτικοποίησης των περιεχόμενων εκδόχων του.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενόγλωσσος Όρος	Ελληνικός Όρος
Accuracy	Ακρίβεια
Active Pharmaceutical Ingredient	Ενεργό φαρμακευτικό συστατικό
Acute Coronary Syndrome	Οξύ Στεφανιαίο Σύνδρομο
Aerosol	Αερόλυμα
Analysis of Variance	Ανάλυση της Διακύμανσης
Binary pump	Διαδική Αντλία
Branded	Πρωτότυπα
Charged Aerosol Detector	Ανιχνευτής Φορτισμένων Αερολυμάτων
Collision / Reaction Cell	Κυψελίδα συγκρούσεων / αντιδράσεων
Croscarmellose (Sodium)	(Νατριούχος) Κροσκαρμελλόζη
Deformulation	Αποσύνθεση
Dilution Factor	Παράγοντας αραίωσης
Direct Thrombin Inhibitors	Άμεσοι αναστολείς της θρομβίνης
Design of Experiments	Πειραματικός Σχεδιασμός
Food and Drug Administration	Παγκόσμιος Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων

Fortification Level	Επίπεδο εμβολιασμού
Fourier Transform Infrared Spectroscopy	Φασματοσκοπία υπεράυθρου μετασχηματισμού Fourier
Freeze - thaw stability	Σταθερότητα κατάψυξης - απόψυξης
Generics	Γενόσημα
Guidelines	Κατευθυντήριες γραμμές
Heparin	Ηπαρίνη
High Performance Liquid Chromatography	Υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης
Hypromellose	Υπρομελλόζη
Ion - Exchange Chromatography	Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής
Ion optics	Ιοντικοί φακοί
Inductively Coupled Plasma	Επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα
Interface Region	Περιοχή Διασύνδεσης
International Normalized Ratio	Διεθνής Δείκτης Κανονικοποίησης
Kinetic Energy Discrimination	Διάκριση κινητικής ενέργειας
Limit of Detection	Όριο ανίχνευσης
Limit of Quantitation	Όριο ποσοτικοποίησης
Linearity	Γραμμικότητα
Long - term stability	Μακροπρόθεσμη σταθερότητα
Low Molecular Weight Heparins	Ηπαρίνες μικρού μοριακού βάρους
Magnesium Stearate	Στεατικό Μαγνήσιο
Mannitol	Μαννιτόλη
Medical Reverse Engineering	Ιατρική Αντίστροφη Μηχανική
Microcrystalline Cellulose	Μικροκρυσταλλική Κυτταρίνη
Nebulizer	Εκνεφωτής

Non - Steroidal Anti - Inflammatory Drugs	Μη Στεροειδή Αντιφλεγμονώδη φάρμακα
Percutaneous Coronary Intravenous	Διαδερμική Στεφανιαία Παρέμβαση
Peristaltic pump	Περισταλτική αντλία
Photodiode Array Detector	Ανιχνευτής Συστοιχίας Φωτοδιόδων
Precision	Πιστότητα
Quaternary pump	Τετραεδρική αντλία
Range	Εύρος γραμμικής περιοχής
Recovery	Ανάκτηση
Refractive Index	Δείκτης διάθλασης
Relative Standard Deviation	Σχετική τυπική απόκλιση
Reverse Engineering Studies	Μελέτες Αντίστροφης Μηχανικής
Ruggedness	Ανθεκτικότητα
Sampler Cone	Κώνος δειγματοληψίας
Selectivity	Εκλεκτικότητα
Short - term stability	Βραχυπρόθεσμη σταθερότητα
Skimmer Cone	Αποκορυφωτής
Specificity	Ειδικότητα
Spectrophotometer	Φασματοφωτόμετρο
Spray Chamber	Θάλαμος ψεκασμού
Stability	Σταθερότητα
Torch	Πυρός
Ultraviolet	Υπεριώδες
United States Pharmacopeia	Αμερικανική Φαρμακοποιία
X - Ray Diffraction	Περίθλαση ακτίνων Χ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ - ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ - ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

ABS	Absorbance
ACS	Acute Coronary Syndrome
ADP	Adenosine Diphosphate
ANOVA	Analysis of Variance
API	Active Pharmaceutical Ingredient
AUS	Australia
BDS	Base Deactivated Silica
CAD	Charged Aerosol Detector
DF	Dilution Factor
DOE	Design of Experiments
DTIs	Direct Thrombin Inhibitors
EU	Europe
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
GC	Gas Chromatography

HILIC	Hydrophilic Interaction Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICP	Inductively Coupled Plasma
IEC	Ion - Exchange Chromatography
INR	International Normalized Ratio
IR	Infrared Spectroscopy
KED	Kinetic Energy Discrimination
LC	Liquid Chromatography
LD	Lethal Dose
LMWHs	Low Molecular Weight Heparins
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantitation
MCC	Microcrystalline Cellulose
MRE	Medical Reverse Engineering
MS	Mass Spectrometry
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NSAIDS	Non - Steroidal Anti - Inflammatory Drugs
ODS	Octadecyl Deactivated Silica
PCI	Percutaneous Coronary Intravenous
PDA	Photodiode Array Detector
RE	Reverse Engineering
RI	Refractive Index
RLD	Reference Listed Drug
RSD	Relative Standard Deviation
SEC	Size - Exclusion Chromatography
SFC	Supercritical Fluid Chromatography

S/N	Signal-to-Noise
TLC	Thin Layer Chromatography
UFH	Unfractionated Heparin
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultraviolet
XRD	X - Ray Diffraction

ΑΝΑΦΟΡΕΣ - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] D. Brown, G. Superti - Furga, "Rediscovering the sweet spot in drug discovery", Drug Discovery Today, 1067-77, 2003.
- [2] Μ. Μαρσέλος, "Συνοπτική Φαρμακολογία - Τόμος 1", Φαρμακοκινιτική, 8-10, 2006.
- [3] S. Chaudhari, P. Patil, "Pharmaceutical Excipients: A review", International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry, 21-34, 2012.
- [4] P. Imming, A. Meyer, "Introduction to drug utilization research", World Health Organization, 33, 2003.
- [5] A. Mahoney, J. Evans, "Comparing drug classification systems", AMIA Annual Symposium Proceedings, 1039, 2008.
- [6] P. Somnath, "Shifts in the Generic - Drug Market: Trends and Causes", US Pharm, 6-10, 2013.
- [7] J. Dimasi, "The Price of Innovation: New Estimates of Drug Development Cost", Journal of Health Economics, 151-185, 2003.
- [8] A. Huang, "An Introduction to Reverse Engineering", Xenatera, 55-60, 2003.
- [9] V. Koradia, G. Chawla, A. Bansal, "Comprehensive Characterization of the Innovator Product: Targetting Bioequivalence Generics", Generic Medicine, 335-346, 2005.
- [10] Z. Zahid, K. Furgan Nazimuddin, K. Sarfaraz, H. Moizul, S. Obaid, K. Raheel, "Reverse engineering and development of Generic Orlistat formulation", Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Sciences (JIPBS), 17-25, 2016.
- [11] Pharmaceutical Technology Editors, "The Role of Reverse Engineering in the Development of Generic Formulations", Pharmaceutical Technology, 1-5, 2005.
- [12] J.M. Peny, "How Bright is the Future for Generics?", Scrip Magazine, 13-17, 2003.
- [13] P. York, "Solid - State Properties of Powders in the Formulation and Processing of Solid Dosage Forms", International Journal of Pharmacy, 1-28, 1983.

- [14] M.N. Martinez and G.L. Amidon, "Mechanistic Approach to Understanding the Factors Affecting Drug Absorption: A Review of Fundamentals", *Journal of Clinical Pharmacology*, 620-643, 2002.
- [15] S.R. Byrn, "Pharmaceutical Solids: A Strategic Approach to Regulatory Considerations", *Journal of Pharmacy*, 945-954, 1995.
- [16] A. Bhatti, N.A. Syed, P. John, "Reverse Engineering and Its Applications", National University of Sciences and Technology (NUST), 1-16, 2017.
- [17] N.A Campbell, "Platelets: Cytoplasmic fragments of specialized bone marrow cells", *Journal of Biology*, 912, 2008.
- [18] A. Maton, "Human Biology and Health", Prentice Hall Science, 192, 2003.
- [19] K. Bogale, D. Mekonnen, T.Nedi, M. Alebachew Woldu, "Treatment Outcomes of Patients with Acute Coronary Syndrome Admitted to Tikur Anbessa Specialized Hospital, Addis Ababa, Ethiopia", *Clinical Medicine Insights: Cardiology*, 1-9, 2019.
- [20] E. Μελισσάρη, "Αντιθρομβωτική Αγωγή: Πότε και πώς χορηγείται", *Υγεία και Άνθρωπος*, 1-2, 2017.
- [21] EMA Editors, "European Public Assessment Report for Efient", EMA, 1-3, 2009.
- [22] W.L. Baker, C.M. White, "Role of prasugrel, a novel P2Y₁₂ receptor antagonist, in the management of acute coronary syndromes", *American Journal of Cardiovascular Drugs*, 213–229, 2009.
- [23] <https://www.drugbank.ca/drugs/DB06209>, Τελευταία επίσκεψη: 16/11/2019.
- [24] D.J. Angiolillo, S. Suryadevara, P. Capranzano, T.A. Bass, "Prasugrel: a novel platelet ADP P2Y₁₂ receptor antagonist. A review on its mechanism of action and clinical development", *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2893–2900, 2008.
- [25] S.D. Wiviott, E. Braunwald, C.H. McCabe, "Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes", *Journal of Medicine*, 2001-2015, 2008.
- [26] M. Silvano, "A case of resistance to clopidogrel and prasugrel after percutaneous coronary angioplasty", *Journal of Thrombolysis*, 233-234, 2011.
- [27] <https://www.medicines.org.uk/emc/product/6466/smpc> , Efient 10 mg film-coated tablets, Τελευταία επίσκεψη: 18/11/2019.
- [28] N. Stephanie, D. Schatz, R.J. Weber, "Adverse Drug Reactions", *Journal of Pharmacology*, 1-22, 2015.
- [29] J. Jinu, S. Koshy, "Efient: Highlights of prescribing information", *Journal of American Board of Family Medicine*, 19, 2011.
- [30] P.J. Crowley, L.G. Martini, "Excipients for Pharmaceuticals Dosage Forms", *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, 242-245, 2006.

- [31] G. Pifferi, P. Restani, "The safety of pharmaceutical excipients", *Journal of Pharmacology*, 541-550, 2003.
- [32] M.Z. Ahmad, "Drug Excipient Interactions and Compatibility Study: A Review", *Journal of Pharmaceutical Research*, 2092-2095, 2010.
- [33] F. Qiu, "Identification of drug excipient interaction products using stress testing assisted approach", *Journal of Pharmaceutical Science*, 31-39, 1998.
- [34] R.C. Rowe, P.J. Sheskey, M.E. Quinn, "Handbook of Pharmaceutical Excipients", American Pharmaceutical Association, 158, 235, 326, 404, 424, 2006.
- [35] M.R. Siddiqui, Z.A. Allothman, N. Rahman, "Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A Review", *Arabian Journal of Chemistry*, 1409-1421, 2017.
- [36] L. Barry, "HPLC: Early and Recent Perspectives", *Journal of Chemical Education*, 45, 1997.
- [37] A. Richard, "The Early Days of HPLC at Dupont", *Avanstar Communications Inc.*, 23-25, 2009.
- [38] C. Ettre, "Milestones in Chromatography: The Birth of Partition Chromatography", *LCGC*, 506-512, 2001.
- [39] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, "Introduction to Modern Liquid Chromatography", New York, 39-45, 1979.
- [40] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, "Principles of Instrumental Analysis", Saunders College Publishing, 849, 1998.
- [41] E. Rogatsky, "Modern high performance liquid chromatography and HPLC", *Journal of Chromatographic Separations Technology*, 135, 2016.
- [42] M. Tammana, "A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC)", *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 1-7, 2016.
- [43] C.F. Poole, "Principles and Applications of Chromatography", *Encyclopedia of Separation Science*, 566, 2000.
- [44] ChromAcademy Editors, "Theory of HPLC: Reversed Phase Chromatography", *ChromAcademy*, 2-93, 2017.
- [45] V. Cerda, "An Introduction to Laboratory Automation", John Wiley & Sons, 45-55, 1990.
- [46] M. Carvalho, "Practical Laboratory Automation: Made Easy with Autosampler", Wiley VCH, 328-333, 2017.
- [47] C.F. Poole, "The Essence of Chromatography", Elsevier, 19-22, 2003.
- [48] E.L. Johnson, R. Stevenson, "Basic Liquid Chromatography and Columns", Varian Associates, 54, 1978.

- [49] Z. Eshaghi, "Photodiode Array Detection in Clinical Applications: Quantitative Analyte Assay Advantages, Limitations and Disadvantages", Communications, BioSensings, Measurements and High-Energy Physics Department, 23, 2011.
- [50] <https://www.britannica.com/science/optimization/The-simplex-method> , Τελευταία επίσκεψη: 18/11/2019.
- [51] E.S. Leslie, "The Birth of Partition Chromatography", LCGC, 505-512, 2001.
- [52] V.P. Pakhomov, "Chromatography in Pharmaceutical Chemistry (100 Years of the Discovery of Chromatography by M.S. Tswett)", 451-452, 2003.
- [53] J. Stahlberg, "Chromatography: Liquid, Ion Pair Liquid Chromatography", Encyclopedia of Separation Science, 23-29, 2000.
- [54] D. Seebach, R. Andrea, M. Hoffman, "Self-Regeneration of Stereocenters (CRS) - Applications, Limitations and Abandonment of a Synthetic Principle", Chemical International Edition", 2708-2748, 1996.
- [55] J.A. Alpert, "Hydrophilic-Interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds", Journal of Chromatography, 177-196, 1990.
- [56] F.A. Settle, "Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry", Journal of Analytical Chemistry, 767-801, 1997.
- [57] H. Gunzler, A. Williams, "Handbook of Analytical Techniques", Wiley, 66-69, 2001.
- [58] A.A. Ammann, "Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP MS): a versatile tool", Journal of Mass Spectrometry, 417-427, 2007.
- [59] Spectroscopy Editors, "Nebulizers for Inductively Coupled Plasma Spectroscopy", Spectroscopy, 1-3, 2013.
- [60] P. Gaines, "Nebulizers, Spray Chambers and Torches", ICP Operation Guide, 1, 2012.
- [61] R. Thomas, "Practical Guide to ICP-MS: A tutorial for beginners", Practical Spectroscopy Series, 121-335, 2008.
- [62] R.A. Yost, C.G. Enke, "Selected ion fragmentation with a tandem quadrupole mass spectrometer", Journal of the American Chemical Society, 2274, 1978.
- [63] K. Sakata, "Inductively coupled plasma mass spectrometry and method", US Patent", 43, 2017.
- [64] R. Ahrends, S. Pieper, A. Kuhn, "A metal-coded affinity tag approach to quantitative proteomics", Molecular & Cellular Proteomics, 1907-1916, 2007.
- [65] K. Klotz, W. Weistenhofer, H. Drexler, "Chapter 4. Determination of Cadmium in Biological Samples", Metal Ions in Life Sciences, 85-98, 2013.
- [66] L. Huber, "Validation of Analytical Methods and Procedures", LabCompliance, 9, 2010.

- [67] P. Ravisankar, C.N. Navya, D. Pravallika, D. Navya, "A Review on Step-by-Step Analytical Method Validation", *Journal of Pharmacy*, 1-13, 2015.
- [68] P. Gamache, "HPLC Analysis of nonvolatile analytes using charged aerosol detection", *Journal of Analytical Chemistry*, 17, 2015.
- [69] C.D. Harris, "Quantitative Chemical Analysis", *Journal of Chemical Education*, 703, 2003.
- [70] T. Vehovec, A. Obreza, "Review of operating principle and applications of the charged aerosol detector", *Journal of Chromatography*, 1549-1556, 2010.
- [71] I.N. Acworth, W. Kopaciewicz, P. Gamache, "Charged Aerosol Detection for Liquid Chromatography and Related Separation Techniques", John Wiley & Sons, 67-162, 2017.
- [72] G. Ishani, "The first commercial UV-Vis spectrophotometer", *The Scientist*, 100, 2006.
- [73] E.R. Holiday, "Spectrophotometry of proteins", *Biochemical Journal*, 1795-1803, 2006.