ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΤΙΤΛΟ:

"Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδων ελέγχου ποιότητας δισκίων Minocycline®"

Επιβλέπων καθηγητής : **Κουππάρης Μιχαήλ**

Λουκάκης Στυλιανός (Α.Μ. : 201300140)
Μιχαήλ Αριστείδης (Α.Μ. : 201300068)

ΑΘΗΝΑ
ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2017

NATIONAL AND KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS

SCHOOL OF SCIENCE

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

Laboratory of Analytical Chemistry

DIPLOMA THESIS WITH TITLE :

"Development and validation of methods for the quality control of Minocycline® tablets"

Supervisor professor : **Koupparis Michail**

Loukakis Stylianos
Michail Aristeidis

ATHENS
SEPTEMBER 2017

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αντικείμενο της παρούσας πτυχιακής εργασίας, με τίτλο *Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου για τον έλεγχο ποιότητας δισκίων Minocycline®,* που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας στα πλαίσια του προπτυχιακού προγράμματος σπουδών του τμήματος Χημείας, αποτελεί ο έλεγχος τόσο της δραστικής ουσίας, όσο και των προσμίξεων που περιέχονται στο φάρμακο αυτό. Ο έλεγχος ποιότητας των φαρμάκων είναι άκρως απαραίτητος για τη διασφάλιση της Δημόσιας Υγείας και κοινωνικής ευημερίας.

Στο πρώτο κεφάλαιο, παρουσιάζονται ορισμένες πληροφορίες για τα φάρμακα, την ταξινόμησή τους και τους χημικούς και φαρμακοτεχνικούς ελέγχους στους οποίους υπόκεινται. Έπειτα, παρατίθενται πληροφορίες για το εξεταζόμενο φάρμακο, την Υδροχλωρική Μινοκυκλίνη (Minocycline Hydrochloride) και περιγράφεται αναλυτικά η διαδικασία προετοιμασίας ενός δείγματος φαρμάκου προς ανάλυση, η τεχνική της Υγροχρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC), όπως και κάποιοι άλλοι τύποι χρωματογραφίας και τα χαρακτηριστικά ορθής επικύρωσης, τα οποία οδηγούν στην εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων.

Το πειραματικό μέρος, περιλαμβάνει τον οργανολογικό εξοπλισμό, τους διαλύτες αλλά και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της ανάλυσης του συγκεκριμένου φαρμάκου. Παρουσιάζονται, αναλυτικά, όλοι οι έλεγχοι που πραγματοποιήθηκαν, για τη μελέτη του φαρμάκου, ώστε να αποδειχθεί ότι είναι κατάλληλο και έτοιμο για αποδέσμευση στην αγορά.

Θεματική περιοχή: Φαρμακευτική ανάλυση

Λέξεις κλειδιά: Μινοκυκλίνη, HPLC, δραστική ουσία, προσμίξεις, φάρμακο, αντιβιοτικά

ABSTRACT

The purpose of this diploma thesis, entitled *Development and validation of methods for the quality control of Minocycline® tablets,* carried out in the Analytical Chemistry laboratory in the frame of the undergraduate program of Chemistry, is the control both of the active pharmaceutical ingredient (API) and the impurities contained in this formulation. The quality control of pharmaceuticals is essential for the assurance of public health and social prosperity.

In the 1st chapter, there are some information about the medicines, their classification and the chemical and pharmaceutical controls they are subject to. Then, information about the test drug, **Minocycline Hydrochloride®**, is provided and the procedure for preparation a drug sample for analysis, the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) technique, as well as some other types of chromatography and the correct validation characteristics, which lead to the export of reliable results, are described.

The experimental part, includes the instrumentation, solvents and reagents used during the analysis of this particular drug. All the tests that have been carried out in order to prove that this drug is suitable and ready for release on the market, are presented in detail.

Subject area: Pharmaceutical Analysis

Key words: Minocycline, HPLC, active pharmaceutical ingredient, impurities, medicine, antibiotics

Ευχαριστίες

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε ιδιαιτέρως τον επιβλέποντα καθηγητή, κ. Κουππάρη Μιχαήλ, καθηγητή Αναλυτικής Χημείας- Φαρμακευτικής Ανάλυσης του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την ανάθεση της εργασίας και για την καθοδήγηση του καθ' όλη τη διάρκειά της. Με την ξεχωριστή προσωπικότητα που διαθέτει και με το ήθος που τον χαρακτηρίζει, συνέβαλε καθοριστικά στην ολοκλήρωση της παρούσας πτυχιακής εργασίας.

Επίσης, ευχαριστούμε την κ. Κάκου Αικατερίνη και όλους εκείνους που μας βοήθησαν, προσφέροντας μας γνώσεις και αφιερώνοντας μας πολύτιμο προσωπικό χρόνο, κατά τη διάρκεια της εκπονήσεως της πτυχιακής μας εργασίας.

Τέλος, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τις οικογένειες μας και το φιλικό μας περιβάλλον για την στήριξη που μας παρείχαν όλο το διάστημα ολοκλήρωσης των σπουδών μας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο : ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

1.1 Εισαγωγή 2

1.1.1 Τι είναι τα φάρμακα 3

1.1.2 Μορφές των φαρμάκων 4

1.1.3 Ταξινόμηση των φαρμάκων 6

1.2 Έλεγχος Ποιότητας 7

1.3 Είδη ελέγχων 9

1.3.1 Χημικός έλεγχος 9

1.3.1.1 Ταυτοποίηση 9

1.3.1.2 Έλεγχοι καθαρότητας και προσμείξεων (Impurities-Related substances) 10

1.3.1.3 Έλεγχος περιεκτικότητας δραστικής ουσίας (Assay) 11

1.3.2 Φαρμακοτεχνικός έλεγχος 12

1.4 Δοκιμή ομοιομορφίας δόσης (Uniformity of dosage units) 13

1.5 Μελέτες σταθερότητας (Stability) 13

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2Ο : MINOCYCLINE ®, ΕΝΑ ΕΥΡΕΩΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΟ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟ ΦΑΡΜΑΚΟ

2.1 Αντιβιοτικά φάρμακα 14

2.1.1 Ταξινόμηση των αντιβιοτικών 15

2.1.2 Παρενέργειες των αντιβιοτικών 16

2.2 Οι τετρακυκλίνες και η φαρμακολογία τους 16

2.3 Minocycline® Hydrochloride (Υδροχλωρική Μινοκυκλίνη) 18

2.3.1 Εισαγωγή 18

2.3.2 Χημικά και Φυσικά χαρακτηριστικά 19

2.3.3 Ιατρικές χρήσεις του Minocycline® 20

2.3.4 Μηχανισμός δράσης 21

2.3.5 Κλινικές ενδείξεις 22

2.3.6 Δοσολογία και τρόπος χορήγησης 22

2.3.7 Υπερδοσολογία 23

2.3.8 Κύηση και θηλασμός 24

2.3.9 Αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα και άλλες μορφές αλληλεπίδρασης 24

2.3.10 Πιθανές ανεπιθύμητες ενέργειες 25

2.4 Προσμίξεις στο φάρμακο Minocycline® 26

2.5 Μέθοδοι προσδιορισμού Minocycline ® 27

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο: ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ

3.1 Προετοιμασία φαρμακευτικού σκευάσματος 29

3.2. Τεχνικές προκατεργασίας δείγματος 30

3.2.1. Τεχνικές διαλυτοποίησης 30

3.2.2 Κλασικές τεχνικές εκχύλισης 31

3.2.3. Σύγχρονες τεχνικές εκχύλισης 32

3.2.4. Τεχνικές εκχύλισης στις οποίες δεν χρησιμοποιείται διαλύτης (solvent free) 32

3.2.5. Άμεσες τεχνικές – μικροδιαπίδυση (microdialysis) 35

3.2.6. Τεχνικές εναλλαγής στηλών 36

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο: ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)

4.1 Εισαγωγή - Ιστορική Αναδρομή 37

4.2. Αρχή της Τεχνικής 40

4.3. Οργανολογία 42

4.4. Βασικές αρχές και παράμετροι χρωματογραφίας 43

4.4.1. Χρόνος Κατακράτησης (t_R) - Παράγοντας Κατακράτησης (k') 43

4.4.2. Όγκος ανάσχεσης 44

4.4.3. Εύρος και ημιεύρος κορυφής 45

4.4.4. Εκλεκτικότητα (α) 46

4.4.5. Διαχωριστική ικανότητα (Rs) 46

4.4.6. Αποδοτικότητα (N) 47

4.4.7. Παραμόρφωση χρωματογραφικής ζώνης 48

4.4.8. Βελτιστοποίηση διαχωρισμών 49

4.5. Είδη υγροχρωματογραφίας 50

4.5.1. Χρωματογραφία Προσρόφησης 50

4.5.2. Χρωματογραφία Κατανομής 51

4.5.3. Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής 51

4.5.4. Χρωματογραφία Συγγένειας 51

4.6. Ποσοτικοποίηση στη χρωματογραφική ανάλυση 52

4.6.1. Τεχνική ενός εξωτερικού προτύπου 52

4.6.2. Τεχνική πολλαπλών εξωτερικών προτύπων (καμπύλης αναφοράς) 52

4.6.3. Τεχνική προσθήκης γνωστής ποσότητας 53

4.6.4. Τεχνική εσωτερικού προτύπου (internal standard) 53

4.6.5. Μέθοδος κανονικοποιήσεως (normalization) 54

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^{ο}: ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ HPLC

5.1 Ορισμός επικύρωσης 55

5.2 Χαρακτηριστικά ορθής επικύρωσης 56

5.2.1 Ακρίβεια 56

5.2.2 Πιστότητα (Precision) 57

5.2.3 Γραμμικότητα 58

5.2.4 Εύρος γραμμικής περιοχής 58

5.2.5 Ευαισθησία 58

5.2.6 Όριο ανίχνευσης (Limit of Detection-LOD) 59

5.2.7 Όριο ποσοτικοποίησης (Limit of quantitation-LOQ) 59

5.2.8 Ανθεκτικότητα (Ruggedness) 60

5.2.9 Αντοχή (Robustness) 60

5.2.10 Εκλεκτικότητα (Selectivity) 60

5.2.11 Ειδικότητα (Specificity) 60

5.3. Απαραίτητες προδιαγραφές για την επιτυχή εφαρμογή μιας μεθόδου HPLC 61

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6ο: ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ, ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

6.1 Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν 63

6.1.1 Χρωματογραφικό σύστημα HPLC 63

6.1.2 Αναλυτικές στήλες 64

6.1.3 Συσκευή παραγωγής νερού υψηλής καθαρότητας 64

6.1.4 Αναλυτικός ζυγός 65

6.1.5 Πεχάμετρο 66

6.1.6 Συσκευή υπερήχων 67

6.1.7 Συσκευή διήθησης κινητής φάσης 68

6.1.8 Συσκευή ελέγχου διαλυτότητας των φαρμάκων 68

6.2 Διαλύτες 69

6.3 Αντιδραστήρια 70

6.4 Υλικά αναφοράς 70

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7ο: ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΔΙΣΚΙΩΝ MINOCYCLINE®

7.1. Εμφάνιση (Appearance) 71

7.2. Χρώμα 72

7.3. Αντίσταση στη σύνθλιψη (Resistance to crushing) 73

7.4. Αποσάρθρωση (Disintegration) 73

7.5. Μέση Μάζα 73

7.6. Απώλεια στην ξήρανση (Loss on drying) 74

7.7. Δοκιμασία Ταυτοποίησης (Identification test) 74

7.8. Έλεγχος περιεκτικότητας (Assay) 75

7.9. Συγγενείς ενώσεις (Related Substances) 79

7.10. Διάλυση - Διαλυτότητα (Dissolution) 81

7.11. Ομοιογένεια - Ομοιομορφία μάζας (Uniformity of mass) 83

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8ο: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ, ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

8.1 Μέση Μάζα (Average Mass) 85

8.1.1 Δισκία των 100 mg/tab 85

8.2 Διακύμανση βάρους/ Ομοιομορφία μάζας (Weight variation/ Uniformity of mass) 85

8.2.1 Δισκία των 100 mg/tab 85

8.3 Αντίσταση στη σύνθλιψη (Resistance to crushing) 85

8.3.1 Δισκία των 100 mg/tab 85

8.4 Αποσάρθρωση (Disintegration) 86

8.4.1 Δισκία των 100 mg/tab 86

8.5 Απώλεια στην ξήρανση (Loss on drying) 86

8.5.1 Δισκία των 100 mg/tab 86

8.6 Δοκιμασία ταυτοποίησης (Identification test) 86

8.6.1 Δισκία των 100 mg/tab 86

8.7 Έλεγχος περιεκτικότητας (Assay) 87

8.7.1 Δισκία των 100 mg/tab 87

8.8 Συγγενείς ουσίες (Related Substances) 87

8.8.1 Δισκία των 100 mg/tab 87

8.9 Διαλυτότητα (Dissolution) 91

8.9.1 Δισκία των 100 mg/tab 91

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ 92

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ 93

ΑΝΑΦΟΡΕΣ-ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 95

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 2.1: Φάσμα αντιμικροβιακής δράσης 16
Εικόνα 2.2: Χημικός και μοριακός τύπος της Υδροχλωρικής Μινοκυκλίνης 18
Εικόνα 2.3: Ετικέτα δισκίων Minocycline® HCl, σκευάσματος που διατίθεται στην αγορά 20
Εικόνα 2.4: Μηχανισμός δράσης των τετρακυκλινών, όπως και της Minocycline 21
Εικόνα 3.1: Σχηματική αναπαράσταση σταδίων εκχύλισης στερεάς φάσης-υγρού (SPE) 34
Εικόνα 4.1: Σύστημα HPLC 40
Εικόνα 4.2: Διάταξη ενός συστήματος HPLC 43
Εικόνα 4.3: Χρόνοι ανάσχεσης 44
Εικόνα 4.4: Εύρος (W) κορυφής σήματος από χρωματογράφημα 45
Εικόνα 4.5: Διαχωρισμός ουσιών 47
Εικόνα 4.6: Σήμα ανιχνευτή σε περιπτώσεις παραμόρφωσης 49
Εικόνα 6.1: Χρωματογράφος HPLC της εταιρείας Shimadzu 64
Εικόνα 6.2: Αναλυτικός ζυγός της εταιρείας Shimadzu 65
Εικόνα 6.3: Πεχάμετρο υψηλής ακρίβειας 67
Εικόνα 6.4: Λουτρό υπερήχων της εταιρείας Branson 68
Εικόνα 6.5: Συσκευή Dissolution για τον έλεγχο της διαλυτότητας των σκευασμάτων 69
Εικόνα 7.1: Δομή της Minocycline® 71
Εικόνα 7.2: Δισκία Minocycline® , από συγκεκριμένο batch, που έγινε η ανάλυση 72
Εικόνα 7.3/7.4: Σύστημα HPLC, στο οποίο πραγματοποιήθηκε η ανάλυση 77
Εικόνα 7.5: Προετοιμασία του δείγματος, κατά το Assay 78
Εικόνα 8.1 Ενδεικτικό χρωματογράφημα προτύπου δραστικής ουσίας. 87
Εικόνα 8.2. Ενδεικτικό Χρωματογράφημα διαλύματος Αναφοράς Β (Reference B) 88
Εικόνα 8.3. Ενδεικτικό Χρωματογράφημα διαλύματος Αναφοράς C (Reference C) 88

Εικόνα 8.4. Ενδεικτικό Χρωματογράφημα άλλων συγγενών ουσιών 90

Εικόνα 8.5. Ενδεικτικό Χρωματογράφημα λευκού διαλύματος 90

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ/ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 3.1: Κατανομή χρόνου στην αναλυτική διαδικασία 29

Πίνακας 5.1: Χαρακτηριστικά επικύρωσης που εξετάζονται σε κάθε τύπο δοκιμής 56

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο : ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

1.1 Εισαγωγή[1,2]

Τα φάρμακα αποτελούν, σήμερα, το επίκεντρο των ερευνών πολλών σπουδαίων επιστημόνων και αυτό, διότι χαρακτηρίζονται ως αναγκαία κοινωνικά αγαθά τα οποία μελετούνται και αναπτύσσονται 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 ανακάλυψη νέων φαρμάκων είναι μια συνεχής 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. Εκτεταμένες μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα φάρμακα δρουν εμπλεκόμενα σε κάποια συγκεκριμένη βιολογική πορεία. Αυτό όμως, δεν αποκλείει ένα φάρμακο να εμπλέκεται, πέραν της επιθυμητής βιολογικής πορείας, και σε άλλες βιολογικές πορείες προκαλώντας ανεπιθύμητες παρενέργειες. Επίσης, θα πρέπει να τονισθεί ότι ένα φάρμακο μπορεί να δράσει και ως δηλητήριο αν χρησιμοποιηθεί σε υπερβολική δόση. Συνεπώς, τα φάρμακα χαρακτηρίζονται όχι μόνο από το ότι αποσκοπούν σε κάποια θεραπεία, αλλά και από το ότι πρέπει να δίνονται με μία συγκεκριμένη δόση και με ένα συγκεκριμένο τρόπο. Όταν υπερβούμε τη δοσολογία ή όταν χορηγήσουμε ένα φάρμακο με άλλη οδό ή τρόπο, μπορεί να μεταβληθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα και αντί για ωφέλεια, να γίνουν δηλητήρια και να προκαλέσουν βλάβη στον οργανισμό.

Πέρα όλων αυτών, ωστόσο, η συμβολή των φαρμάκων στην Δημόσια Υγεία και την κοινωνική ευημερία είναι αδιαμφισβήτητη με αποτέλεσμα να εντείνονται συνεχώς οι προσπάθειες ανακάλυψης και ελέγχου των φαρμάκων με την αρωγή της σύγχρονης φαρμακευτικής επιστήμης.

1.1.1 Τι είναι τα φάρμακα

Τα φάρμακα (**pharmaceutical drugs**, medicine) ορίζονται ως οι χημικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται για την πρόληψη ή θεραπεία ασθενειών στους ανθρώπους, αλλά και σε ζώα και φυτά και είναι ικανές να επηρεάσουν την λειτουργία του οργανισμού κάθε έμβιου όντος η μικροοργανισμού όταν εισέλθουν σε αυτόν. Πρόκειται, δηλαδή, για ουσίες ή παρασκευάσματα που είτε ανακουφίζουν είτε θεραπεύουν από ασθένειες ή πόνους τον ανθρώπινο οργανισμό και αποκαθιστούν την ανθρώπινη υγεία.[2]

Σύμφωνα με τον ορισμό του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization – W.H.O) ως φάρμακο χαρακτηρίζεται *''κάθε ουσία ή μίγμα ουσιών, που παράγεται, προσφέρεται προς πώληση ή παρουσιάζεται για χρήση στη διάγνωση, στη θεραπεία, στον μετριασμό ή στην πρόληψη νόσου, μη φυσιολογικής φυσικής κατάστασης ή των συμπτωμάτων τους στον άνθρωπο ή στα ζώα, καθώς και για χρήση στην αποκατάσταση, τη διόρθωση ή τη μεταβολή οργανικών λειτουργιών στον άνθρωπο ή τα ζώα''*. Η επιστήμη δε, που έχει κύριο αντικείμενο έρευνας και μελέτης τη παρασκευή και τη τυποποίηση των φαρμάκων ονομάζεται Φαρμακολογία, και αποτελεί ιδιαίτερο κλάδο της Ιατρικής, καθώς επίσης και αυτόνομη επιστήμη της Φαρμακευτικής.[3]

Κάθε φαρμακευτικό προϊόν περιέχει δύο βασικά συστατικά, α) το ενεργό φαρμακευτικό συστατικό, το ονομαζόμενο ως δραστική ουσία (API) και β) τα έκδοχα (συνδετικά, χρώματα, γεύσεις, αραιωτικά κλπ.), που ουσιαστικά

συναποτελούν τα περιεχόμενα του φαρμάκου. Τα ενεργά συστατικά είναι με άλλα λόγια η χημική του σύσταση και είναι η βάση της βιοτεχνολογίας. Τα έκδοχα, παρόλο που θεωρούνται παθητικά συστατικά, μπορεί να επηρεάσουν την ίδια τη δράση του φαρμάκου, τη φαρμακοκινητική του και να το κάνουν πιο αναγνωρίσιμο.[2,3]

Από τα παραπάνω, γίνεται αντιληπτό το πόσο αναγκαία είναι η εξασφάλιση υψηλής ποιότητας των φαρμάκων που διατίθενται στους ασθενείς. Η παραγωγή, εισαγωγή και κυκλοφορία τους, λοιπόν, διέπονται από αυστηρούς κανονισμούς, οι οποίοι σχεδιάζονται προσεκτικά, εφαρμόζονται και αναμορφώνονται όταν κρίνεται απαραίτητο.

1.1.2 Μορφές των φαρμάκων[2-4]

Μία χημική ουσία, που χρησιμοποιείται ως φάρμακο, τις περισσότερες φορές δεν χορηγείται στον άνθρωπο, όπως είναι στην αρχική της μορφή, δηλαδή ως στερεό, υγρό ή αέριο. Με τη βοήθεια αδρανών ουσιών πρέπει να πάρει μία μορφή χορήγησης (δισκίο, αλοιφή, υπόθετο, κλπ.) που να διευκολύνει τη χορήγησή της στον ασθενή, αλλά και την ασφαλή διατήρηση και φύλαξή της από αλλοιώσεις και χημικές μεταβολές. Έτσι, λοιπόν, ανάλογα με τη μορφή τους, τα σκευάσματα διακρίνονται σε στερεά (δισκία, καψάκια), ημιστερεά (αλοιφές, κρέμες, πάστες, πηκτές), υγρά (διαλύματα, σιρόπια, ελιξίρια, γαλακτώματα, εναιωρήματα) και αέρια (αερολύματα). Οι παρασκευαστικές αυτές μορφές λέγονται φαρμακευτικά σκευάσματα και είναι το αντικείμενο μελέτης μιας συγγενικής με τη Φαρμακολογία επιστήμης, της Φαρμακευτικής Τεχνολογίας.

Πιο συγκεκριμένα, τα συνηθέστερα φαρμακοτεχνικά σκευάσματα είναι τα ακόλουθα:

1.Δισκία (χάπια). Είναι παρασκευάσματα κονιοποιημένων φαρμάκων, που με τη βοήθεια εκδόχων και ειδικών πιεστικών μηχανών παίρνουν τη μορφή δισκίου. Υπάρχουν διάφορα είδη δισκίων, όπως τα σακχαρόπηκτα και τα δισκία με εντερικό περίβλημα. Προορίζονται κυρίως για λήψη από το στόμα .

2. Κάψουλες, καψάκια (capsules). Η δραστική ουσία περιέχεται σε ειδικό περίβλημα από ζελατίνη, το οποίο επικαλύπτει τυχόν δυσάρεστη γεύση και επιτρέπει βαθμιαία διάλυση μέσα στα πεπτικά υγρά ή μόνο μέσα στα εντερικά υγρά (εντερικό περίβλημα). Όταν επιδιώκεται παρατεταμένη χρήση, το περιεχόμενο παρασκευάζεται σε μεγαλοκοκκιώδη μορφή.

3. Υπόθετα (suppositoria). Πρόκειται για μείγματα φαρμάκων με λιπαρές ουσίες, που λειώνουν στους 37 °C. Έχουν ειδικό σχήμα και τοποθετούνται στην κοιλότητα του απευθυσμένου και του κόλπου.

4. Απλά διαλύματα (solutiones). Εφαρμόζονται τοπικά για πλύσεις του δέρματος και των βλεννογόνων ή προορίζονται για συστηματική χορήγηση (σιρόπια, ελιξίρια κλπ.) Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι τα ρινικά και ωτικά διαλύματα. Πρόκειται για διαλύματα φαρμάκων σε νερό ή λάδι, που χορηγούνται σε σταγόνες και γι' αυτό συσκευάζονται σε ειδικά σταγονομετρικά φιαλίδια.

5. Ενέσιμα διαλύματα (injectiones). Διατίθενται σε αμπούλες, οι οποίες εκτός από τις δραστικές ενώσεις περιέχουν κατάλληλα αποστειρωμένα έκδοχα. Είναι διαλύματα φαρμάκων σε απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό ή λάδι. Συνήθως τα ενέσιμα διαλύματα είναι μέσα σε φύσιγγες ή φιαλίδια.

6. Οφθαλμικά διαλύματα (collyria). Τα γνωστά κολλύρια είναι διαλύματα φαρμάκων σε αποστειρωμένο νερό ή λάδι και χρησιμοποιούνται τοπικά για διάφορες οφθαλμικές παθήσεις.

7. Σιρόπια. Είναι απλά διαυγή διαλύματα με σακχαρόζη ή κάποια άλλη γλυκαντική ουσία, για βελτίωση της γεύσης.

8. Βάμματα (tincture). Είναι υδροαλκοολικά διαλύματα φαρμάκων που η προέλευσή τους είναι είτε φυτική, είτε χημική. Προορίζονται για εξωτερική και εσωτερική χρήση. Ως βάμματα, συνήθως χρησιμοποιούνται αντισηπτικά διαλύματα για τοπική εφαρμογή στο δέρμα ή τους βλεννογόνους. Τα σύνθετα βάμματα, που προορίζονται για εσωτερική λήψη, μπορεί να περιέχουν σακχαρόζη και άλλα βελτιωτικά της γεύσης, οπότε ονομάζονται «ελιξίρια».

9. Εναιωρήματα (suspensiones). Προκύπτουν από αδιάλυτα δραστικά συστατικά και προορίζονται συνήθως για εξωτερική εφαρμογή.

10. Αλοιφές (ungüenta). Μείγματα φαρμάκων με λιπαρά έκδοχα, δηλαδή έχουν σύσταση κατάλληλη για την επάλειψη των φαρμάκων στο δέρμα και στους βλεννογόνους. Όταν τα έκδοχα είναι υδρόφιλες ουσίες, χαρακτηρίζονται ως κρέμες. Προορίζονται για τοπικές επαλείψεις στο δέρμα και χρησιμοποιούνται κυρίως για την πρόληψη ή τη θεραπεία δερματικών ασθενειών.

11. Εισπνεόμενα (inhalationes). Οι δραστικές ουσίες εισπνέονται προκειμένου να δράσουν στο αναπνευστικό σύστημα ή να απορροφηθούν για κάποια συστηματική ενέργεια. Ουσίες που δεν είναι πτητικές χορηγούνται μαζί με κάποιο προωθητικό αέριο, με τη βοήθεια ειδικού δοσιμετρικού ψεκαστήρα. Ορισμένες συσκευές εισπνοών απελευθερώνουν το δραστικό συστατικό σε στερεή λεπτοκοκκιώδη μορφή.

12. Εμποτισμένα αυτοκόλλητα. Αποτελούν συστήματα σταδιακής αποδέσμευσης ενός δραστικού συστατικού από ένα εμποτισμένο αδρανές υλικό

που επικολλάται στο δέρμα. Στόχος είναι η δράση τους σε ιστούς ή ακόμη και η συστηματική απορρόφηση ή με την κυκλοφορία του αίματος. Δεν πρέπει να συγχέονται με τα έμπλαστρα (τοπική ανακούφιση μυοσκελετικών πόνων).

Αρκετά συχνά, κάποιο δραστικό συστατικό διατίθεται στην αγορά με πολλά εμπορικά ιδιοσκευάσματα μιας συγκεκριμένης φαρμακοτεχνικής μορφής (π.χ. δισκία), ή πολλών διαφορετικών μορφών (π.χ. δισκία και σιρόπι). Στις περιπτώσεις αυτές, έχει μεγάλη πρακτική σημασία η ομοιότητα της βιοδιαθεσιμότητας όλων των παρεμφερών ιδιοσκευασμάτων, ιδιαίτερα όταν κυκλοφορούν με την ίδια φαρμακοτεχνική μορφή και προορίζονται για χορήγηση από του στόματος (βιοϊσοδυναμία). Η φαρμακοτεχνική μορφή, όπως και τα έκδοχα, έχει στόχο να καταστήσει το φάρμακο περισσότερο αποτελεσματικό, δηλαδή να βελτιώσει τις οργανοληπτικές του ιδιότητες και τη βιοδιαθεσιμότητά του.

1.1.3 Ταξινόμηση των φαρμάκων [2,3]

Οι μέθοδοι που ακολουθούνται για την ταξινόμηση γενικά των διαφόρων φαρμακευτικών προϊόντων είναι συχνά τέσσερις:

α) χημική ταξινόμηση, δηλαδή σχετικά με τη χημική ομάδα στην οποία μπορεί αυτά να ανήκουν, π.χ. αλκαλοειδή.
β) φαρμακολογική ταξινόμηση, από τη φαρμακολογική τους δράση, όπως αναλγητικά, σπασμολυτικά, αντιμικροβιακά, αναισθητικά.
γ) θεραπευτική ταξινόμηση, δηλαδή σχετικά με τη θεραπευτική τους δράση, όπως τα αντικαταθλιπτικά, τα ανθελονοσιακά, τα αγχολυτικά.
δ) σύνθετη ταξινόμηση, από την πάθηση του λειτουργικού συστήματος ή οργάνου για το οποίο χορηγούνται και του επιδιωκόμενου σκοπού, π.χ. αντισηπτικά, καθαρτικά, αποχρεμπτικά, βλεννολυτικά κ.λπ.

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

Με βάση τον τρόπο διάθεσής τους τα φάρμακα διακρίνονται σε αυτά που πωλούνται κατόπιν ιατρικής συνταγής και στα μη συνταγογραφούμενα φάρμακα. Με βάση την προέλευσή τους ωστόσο, διαχωρίζονται σε **πρωτότυπα** (**ευρεσιτεχνίες** με κατοχυρωμένα δικαιώματα προστασίας) και τα **αντίγραφα**

(**generics**), τα οποία έχουν ίδια χημική σύσταση με τα πρωτότυπα, αλλά παράγονται με διαφορετική μέθοδο, συνήθως αφού περάσει ο χρόνος κατοχύρωσης της πατέντας, καθώς και σε προϊόντα βιοτεχνολογίας που παράγονται με ειδικές διαδικασίες. (Στην κατηγορία των φαρμακευτικών ειδών εντάσσονται και τα φαρμακευτικά καλλυντικά, που αφορούν κυρίως στην φροντίδα του δέρματος και των μαλλιών). Εκτεταμένες έρευνες και μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σήμερα, προκειμένου να αποσαφηνιστεί και να περιγραφεί με ακρίβεια η διαφορά ανάμεσα στα πρωτότυπα και τα γενόσημα φάρμακα.

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

1.2 Έλεγχος Ποιότητας [4-6]

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

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

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

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

2. Τα δείγματα των πρώτων υλών, υλικών συσκευασίας, ενδιάμεσων και τελικών προϊόντων λαμβάνονται από ειδικευμένο προσωπικό με μεθόδους εγκεκριμένες από το τμήμα Ελέγχου Ποιότητας.

3. Οι μέθοδοι ελέγχου υπόκεινται σε έλεγχο αξιοπιστίας (επικύρωση).

4. Τηρούνται στοιχεία που καταδεικνύουν ότι εκτελέστηκαν πράγματι όλες οι διαδικασίες που απαιτούνται για δειγματοληψία και έλεγχο. Κάθε απόκλιση καταγράφεται και διερευνάται λεπτομερώς.

5. Τα τελικά προϊόντα περιέχουν δραστικά συστατικά σύμφωνα με την ποιοτική και ποσοτική σύσταση που καθορίζεται στην άδεια κυκλοφορίας, είναι της απαιτούμενης καθαρότητας και τοποθετούνται στον κατάλληλο περιέκτη με τη σωστή επισήμανση.

6. Τηρούνται στοιχεία για τα αποτελέσματα της επιθεώρησης και διενεργείται υπεύθυνη εκτίμηση των αποτελεσμάτων των δοκιμών των υλικών συσκευασίας, των ενδιαμέσων, χύμα και τελικών προϊόντων ως προς τις προδιαγραφές. Η εκτίμηση του προϊόντος περιλαμβάνει εξέταση και αξιολόγηση σχετικών με την παραγωγή εγγράφων στοιχείων και εκτίμηση πιθανών αποκλίσεων από καθορισμένες διαδικασίες.

7. Καμία παρτίδα προϊόντος δεν αποδεσμεύεται για πώληση ή διάθεση πριν να υπάρξει πιστοποίηση από ειδικευμένο πρόσωπο ότι είναι σύμφωνο με τις απαιτήσεις της άδειας κυκλοφορίας.

8. Τηρούνται επαρκή δείγματα-μάρτυρες πρώτων υλών και προϊόντων, ώστε να είναι δυνατή η μελλοντική εξέταση του προϊόντος, εφόσον χρειασθεί και το προϊόν κρατείται στην τελική του συσκευασία εκτός και αν παράγεται σε εξαιρετικά μεγάλες συσκευασίες.

1.3 Είδη ελέγχων [4-9]

Ο έλεγχος των τελικών φαρμακευτικών προϊόντων περιλαμβάνει την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό τόσο των δραστικών συστατικών, όσο και των προσμίξεων και των εκδόχων . Ο έλεγχος γίνεται δειγματοληπτικά χρησιμοποιώντας κατάλληλες μεθόδους, οι οποίες εξασφαλίζουν ότι τα ληφθέντα δείγματα είναι όσο το δυνατόν αντιπροσωπευτικότερα του συνόλου της παραγωγής. Τα θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα του ελέγχου οδηγούν στην απελευθέρωση ή της απόσυρση των προϊόντων. Οι κυριότεροι έλεγχοι που γίνονται στα τελικά φαρμακευτικά προϊόντα από αναλυτικά εργαστήρια ελέγχου ποιότητας (QC), είναι οι εξής:

1.3.1 Χημικός έλεγχος

Σκοπός τους είναι ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των δραστικών ουσιών και άλλων συστατικών των φαρμακευτικών προϊόντων. Χρησιμοποιείται κυρίως, η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), η φασματοφωτομετρία UV/Vis και η αεριοχρωματογραφία (GC), τεχνικές με υψηλή ευαισθησία και χαμηλά όρια ανίχνευσης. Διακρίνουμε **1)** τον χημικό έλεγχο των πρώτων υλών, δηλαδή όλων των συστατικών του φαρμακευτικού προϊόντος και **2)** τον χημικό έλεγχο των τελικών φαρμακευτικών προϊόντων. Τα διάφορα είδη χημικού ελέγχου, είναι τα εξής :

1.3.1.1 Ταυτοποίηση[4]

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

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

1.3.1.2 Έλεγχοι καθαρότητας και προσμείξεων (Impurities-Related substances)[4-5]

Η δοκιμή προσδιορισμού προσμίξεων έχει ως σκοπό την εξέταση της παρουσίας τους στο τελικό φαρμακευτικό προϊόν και την παρακολούθηση της σταθερότητας του. Με την εφαρμογή τέτοιων ελέγχων, διαπιστώνεται η καθαρότητα της φαρμακευτικής ουσίας με δοκιμασίες για την ύπαρξη προσμίξεων, δηλαδή ουσιών που προβλέπεται να συνυπάρχουν στην πρώτη ύλη, ως υπολείμματα αντιδραστηρίων παρασκευής ή παραπροϊόντων. Ιδιαίτερα ελέγχεται η παρουσία προσμίξεων που δύνανται να έχουν επιβλαβή δράση. Οι προσμίξεις διακρίνονται σε:

1. Προσμίξεις που επιτρέπονται σε ανεκτά όρια

2. Προσμίξεις που η παρουσία τους είναι ανεπίτρεπτη

Στα φαρμακευτικά σκευάσματα, το μεγαλύτερο ποσοστό των προσμίξεων είναι είτε προϊόντα αποικοδόμησης της δραστικής ουσίας, είτε προϊόντα αντίδρασης μεταξύ της δραστικής ουσίας και κάποιου εκδόχου. Ωστόσο, απαντώνται προσμίξεις και ως προϊόντα αντίδρασης μεταξύ της δραστικής ουσίας και του περιέκτη με τον οποίο έρχεται σε άμεση επαφή, ως προσμίξεις πρώτης ύλης και εκδόχων και ως ουσίες που έχουν μεταναστεύσει από το υλικό του περιέκτη.

Βάσει της οδηγίας ICH Q3B (R2) υπάρχουν τρία όρια που μας ενδιαφέρουν κατά τη μελέτη των προσμίξεων ενός φαρμακευτικού προϊόντος, **1)** το όριο αναφοράς, **2)** το όριο ταυτοποίησης και **3)** το όριο αξιολόγησης. Ο προσδιορισμός των ορίων γίνεται βάσει της μέγιστης ημερήσιας δόσης (Maximum Daily Dose-MDD) της δραστικής του φαρμάκου, με κριτήρια που παρατίθενται στην οδηγία. Για κάθε νέο φαρμακευτικό σκεύασμα πρέπει να ορίζονται προδιαγραφές, όπου να αναφέρονται ποιες είναι οι γνωστές και οι άγνωστες προσμίξεις ειδικών προδιαγραφών και τα όριά τους, προσμίξεις χωρίς ειδικές προδιαγραφές που έχουν επιτρεπτό όριο μικρότερο από το όριο ταυτοποίησης, καθώς επίσης και το όριο των ολικών προσμίξεων.

Στους ελέγχους καθαρότητας εξετάζονται τα εξής:

- pH
- εμφάνιση διαλύματος
- απορρόφηση

- ειδική στροφή
- οξύτητα
- συγγενείς ουσίες
- τέφρα
- αριθμός οξέων (I_A)
- αριθμός σαπωνοποίησης (I_S)
- αριθμός εστέρων (I_E)
- αριθμός ιωδίου (I_I)
- αριθμός υπεροξειδίων (I_P)
- αριθμός υδροξυλίων (I_{OH})

ασαπωνοποίητα

Γίνονται επίσης οι έλεγχοι για : α) την απώλεια κατά την ξήρανση, β) τον προσδιορισμό νερού, γ) τον έλεγχο παρουσίας και ορίου βαρέων μετάλλων, δ) τα όρια ανόργανων ιόντων και ε) όρια υπολειμμάτων διαλυτών στις πρώτες ύλες.

1.3.1.3 Έλεγχος περιεκτικότητας δραστικής ουσίας (Assay) [7-9]

Η δοκιμασία αυτή, αποτελεί το σημαντικότερο τμήμα του ελέγχου, καθώς διαπιστώνεται αν η περιεκτικότητα της πρώτης ύλης σε δραστικό συστατικό είναι σύμφωνη με τις προδιαγραφές της μονογραφίας. Περιλαμβάνει τον ποσοτικό προσδιορισμό της δραστικής ουσίας (**API**), ώστε να εξασφαλιστεί ότι το σκεύασμα συμμορφώνεται με την ονομαστική του περιεκτικότητα σε δραστική, ενώ κρίσιμος παράγοντας για τον επιτυχή προσδιορισμό της, είναι η επίτευξη ποσοτικής παραλαβής της δραστικής.

Υπάρχουν προδιαγραφές για την αξιολόγηση της συμμόρφωσης ή μη του σκευάσματος, τα όρια των οποίων μπορούν να κυμαίνονται μεταξύ 90,0% και 110,0% της ονομαστικής περιεκτικότητας. Τα όρια ανοχής καθορίζονται από το αναλυτικό σφάλμα της μεθόδου που χρησιμοποιείται, την καθαρότητα της πρώτης ύλης, την ταχύτητα αποικοδόμησης, την πιθανή υπερδόση και φυσικά

από τη φύση του προϊόντος. Αν η περιεκτικότητα της πρώτης ύλης σε φάρμακο είναι εκτός των ορίων, σημαίνει ότι η καθαρότητα της πρώτης ύλης δεν είναι αποδεκτή ή ότι έχει επέλθει διάσπαση του φαρμάκου.

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

- Μη υδατικές ογκομετρήσεις
- Υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης
- Φασματοφωτομετρία υπεριώδους
- Υδατικές ογκομετρήσεις διαφόρων τύπων
- Φασματοφωτομετρία ορατού μετά από χαρακτηριστικές αντιδράσεις
- Αεριοχρωματογραφία για πτητικές ουσίες ή ουσίες που μετατρέπονται σε πτητικές
- Φασματομετρία ατομικής απορρόφησης για φάρμακα άλατα μετάλλων
- Φθορισμομετρία κλπ.

1.3.2 Φαρμακοτεχνικός έλεγχος [4-6]

Αποσκοπεί στον έλεγχο της κατάλληλης φαρμακοτεχνικής συμπεριφοράς του σκευάσματος και αποτελείται κυρίως από ελέγχους, όπως ο έλεγχος αποσάθρωσης και διάλυσης στερεών μορφών (π.χ. δισκία, καψάκια, υπόθετα κλπ), ο έλεγχος ομοιομορφίας περιεχομένου και μάζας σκευασμάτων, ο έλεγχος ευθρυπτότητας δισκίων, η μέτρηση pH (π.χ. σιρόπια, κρέμες), η μέτρηση ιξώδους (viscosity) και η μέτρηση όγκου. Σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να παρουσιάζει και δοκιμασίες καύσης.

1.4 Δοκιμή ομοιομορφίας δόσης (Uniformity of dosage units)[6]

Είναι μία δοκιμασία για τον έλεγχο της συνέπειας στην παραγωγή κάθε μονάδας (δόσης) των φαρμακευτικών σκευασμάτων. Μπορεί να γίνει με έναν από τους ακόλουθους δύο ελέγχους :

α) ***Ομοιομορφία περιεχομένου*** (Content Uniformity-CU), ο οποίος βασίζεται στον προσδιορισμό της δραστικής (assay) σε μεμονωμένες μονάδες φαρμακευτικού σκευάσματος.

β) ***Διακύμανση μάζας*** (Mass Variation-MV), όπου ζυγίζονται, μεμονωμένα, μονάδες τελικού προϊόντος.

Ο έλεγχος που εφαρμόζεται τελικά, εξαρτάται από την περιεχόμενη ποσότητα δραστικής και από το είδος της φαρμακοτεχνικής μορφής. Για την πραγματοποίηση της δοκιμασίας χρησιμοποιούνται δέκα ανεξάρτητες μονάδες με μια κατάλληλη μέθοδο ανάλυσης.

1.5 Μελέτες σταθερότητας (Stability)[6]

Η μελέτη σταθερότητας ενός φαρμακευτικού σκευάσματος εξετάζει το βαθμό στον οποίο ένα προϊόν διατηρεί τις ίδιες ιδιότητες και τα ίδια χαρακτηριστικά που παρουσίαζε τη στιγμή της παρασκευής του, εντός των προβλεπομένων ορίων και της περιόδου αποθήκευσης και χρήσης του. Χωρίζεται σε χημική, φυσική, μικροβιολογική, θεραπευτική και τοξικολογική σταθερότητα. Εξυπηρετεί τρεις βασικούς σκοπούς:

1. τον καθορισμό της ημερομηνίας λήξεως για εμπορική χρήση
2. τη θέσπιση προδιαγραφών για τον έλεγχο και την απελευθέρωση των παρτίδων,
3. την υποστήριξη της σταθερότητας του προϊόντος που χρησιμοποιήθηκε σε κλινικές/μη-κλινικές μελέτες.

Οι βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη σταθερότητα του σκευάσματος που βρίσκεται σε στερεή ή υγρή μορφή είναι το μέγεθος των σωματιδίων και η σύσταση διαλυτών που περιέχει, το pH, η ιοντική ισχύς του διαλύματος, η συμβατότητα με έκδοχα, χημικά πρόσθετα, το δοχείο φύλαξης με το οποίο έρχεται σε επαφή και οι συνθήκες αποθήκευσης (θερμοκρασία, υγρασία, φως και οξυγόνο).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^{Ο}: MINOCYCLINE®,ΕΝΑ ΕΥΡΕΩΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΟ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟ ΦΑΡΜΑΚΟ

2.1 Αντιβιοτικά φάρμακα

Τα αντιβιοτικά είναι χημειοθεραπευτικά φάρμακα τα οποία χρησιμοποιούνται ευρύτατα, για την θεραπεία ή πρόληψη των βακτηριακών λοιμώξεων[10]. Παράγονται από μικροοργανισμούς (κυρίως μύκητες, αλλά και βακτήρια) και έχουν την ικανότητα, είτε να επιβραδύνουν και να αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών (**βακτηριολυτικά**), είτε να τους θανατώνουν (**βακτηριοστατικά**). Είναι πολύ σημαντικό να σημειωθεί ότι τα περισσότερα αντιβιοτικά προσφέρουν προστασία κυρίως εναντίον βακτηριακών λοιμώξεων και δεν είναι κατάλληλα για την αντιμετώπιση ιογενών λοιμώξεων, όπως το κοινό κρυολόγημα ή η γρίπη, προσβάλλοντας μόνο τα κύτταρα των βακτηρίων, χωρίς ωστόσο, τα ίδια να προκαλούν βλάβη στα ανθρώπινα κύτταρα. Αν και ο όρος **αντιβιοτικά** χρησιμοποιήθηκε αρχικά για οποιοδήποτε μέσο με βιολογική δράση ενάντια στους μικροοργανισμούς, εντούτοις σήμερα αναφέρεται στην περιγραφή ουσιών με αντιβακτηριακή, αντιμυκητιακή ή αντιπαρασιτική δράση.

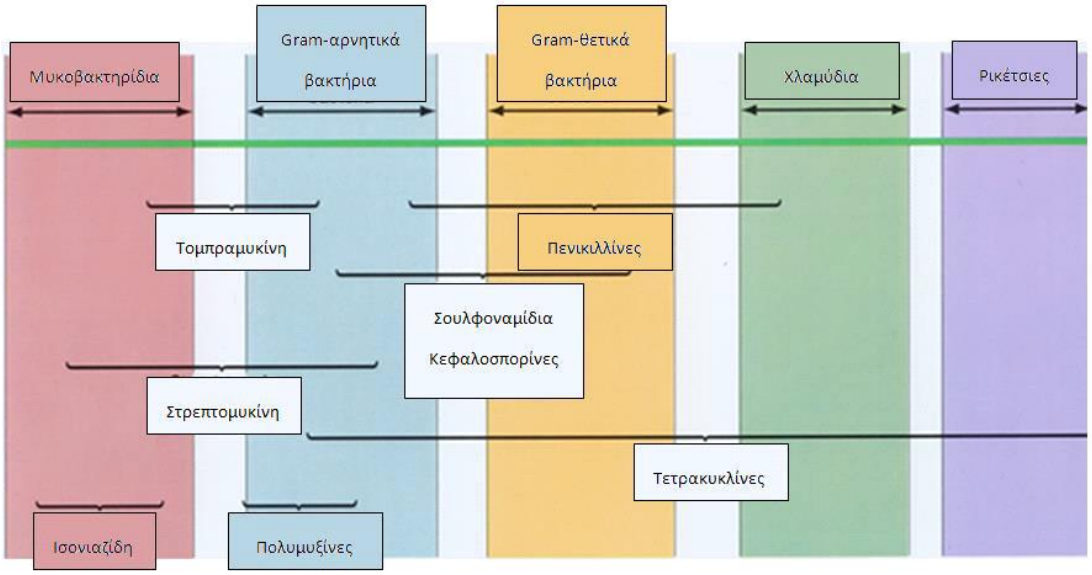
Οι πρώτες αντιβιοτικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στη σύγχρονη ιατρική παρήχθησαν και απομονώθηκαν από ζωντανούς οργανισμούς, όπως η κατηγορία των αντιβιοτικών πενικιλλίνης που παρήχθη από τους μύκητες γένους Penicillium ή η στρεπτομυκίνη, από τα βακτήρια του γένους Streptomyces. Τα περισσότερα αντιβιοτικά είναι σχετικά μικρά μόρια με μικρό μοριακό βάρος. Μέχρι σήμερα, τουλάχιστον 4.000 αντιβιοτικά έχουν απομονωθεί από καλλιέργειες μικροβίων και 30.000 έχουν παρασκευασθεί ημισυνθετικά.[11,12]

Παρότι οι ισχυρές αντιβιοτικές ενώσεις για τη θεραπεία των ανθρώπινων ασθενειών που προκαλούνται από βακτήρια, δεν ήταν απομονωμένες και προσδιορισμένες μέχρι τον 20^{ο} αιώνα, η πρώτη γνωστή χρήση αντιβιοτικών γινόταν από τους αρχαίους Κινέζους πριν από 2.500 έτη. Πολλοί άλλοι αρχαίοι πολιτισμοί, συμπεριλαμβανομένων των αρχαίων Αιγυπτίων και των αρχαίων Ελλήνων, χρησιμοποιούσαν ήδη μύκητες και φυτά για να θεραπεύουν μολύνσεις, εξ αιτίας της παραγωγής των αντιβιοτικών ουσιών από τους οργανισμούς αυτούς. Εκείνη τη στιγμή, ωστόσο, οι ενώσεις που ανέπτυσσαν την αντιβιοτική δράση ήταν ουσιαστικά άγνωστες.

Η χρήση των αντιβιοτικών προκάλεσε επανάσταση στη σύγχρονη ιατρική. Ασθένειες όπως η φυματίωση, η σύφιλη, η γονοκοκκική ουρηθρίτιδα και ο τυφοειδής πυρετός βρήκαν θεραπεία. Οι εγχειρήσεις μπορούσαν πλέον να γίνονται με ασφάλεια χωρίς τον κίνδυνο μολύνσεων. Ο τοκετός έγινε πολύ ασφαλέστερος για τις γυναίκες, ενώ βρεφικές ασθένειες μπορούσαν να αντιμετωπισθούν περιορίζοντας τη βρεφική θνησιμότητα. Αν και ο όρος αντιβιοτικό χρησιμοποιήθηκε αρχικά για να αναφερθεί μόνο στις ουσίες που εξάγονται από ένα μύκητα ή άλλο μικροοργανισμό, σήμερα χάρη στην αλματώδη πρόοδο της οργανικής χημείας περιλαμβάνει επίσης πολλές αντιβακτηριακές φαρμακευτικές ουσίες που παράγονται ημισυνθετικά ή συνθετικά σε εργαστήρια, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως.

2.1.1 Ταξινόμηση των αντιβιοτικών

Υπάρχουν πολλοί τύποι ταξινόμησης της πληθώρας των αντιβιοτικών που κυκλοφορούν σήμερα στην αγορά, ανάλογα με το κριτήριο το οποίο θα χρησιμοποιηθεί. Έτσι, τα αντιβιοτικά διακρίνονται σε : **1) βακτηριοστατικά** και **2) βακτηριοκτόνα**, ανάλογα με το αν με τη δράση τους μειώνουν το ρυθμό ανάπτυξης των βακτηρίων (π.χ. τετρακυκλίνες) ή αν τα θανατώνουν. Βασικό κριτήριο διαχωρισμού των αντιβιοτικών αποτελεί και το αντιμικροβιακό τους φάσμα (*Εικόνα 2.1*) , το οποίο σχετίζεται με την εστίαση της δράσης τους και τον αριθμό των διαφορετικών ειδών μικροβίων που επηρεάζονται από την παρουσία τους. Έτσι, τα αντιβιοτικά ταξινομούνται σε **στενού ή περιορισμένου φάσματος**, αν δρουν εναντίον ενός μόνο βακτηρίου ή μιας ομάδας ομοειδών βακτηρίων (π.χ. το ισονιαζίδιο δρα μόνο εναντίον του μυκοβακτηρίου της φυματίωσης) και **σε ευρέος ή εκτεταμένου φάσματος** που δρουν έναντι πολλών ειδών βακτηρίων (π.χ. πενικιλλίνες, τετρακυκλίνες). Η αποτελεσματικότητα των μεμονωμένων αντιβιοτικών ποικίλλει ανάλογα με τη θέση της μόλυνσης, τη δυνατότητα του αντιβιοτικού να φτάσει στην περιοχή της μόλυνσης, και τη δυνατότητα του μικροβίου να αδρανοποιηθεί ή να καταστραφεί από το αντιβιοτικό.



Εικόνα 2.1: Φάσμα αντιμικροβιακής δράσης

Ανάλογα με τη χημική τους σύσταση, τα αντιβιοτικά διακρίνονται σε : α)προϊόντα αμινοξέων (πενικιλλίνες), β) πολυπεπτιδίων (βακιτρακίνη), γ) σακχάρων (αμινογλυκοσίδες), δ) αλειφατικών οξέων (**τετρακυκλίνες**), ε) πολυενίων (αμφοτερικίνη), στ) αζολών (μικοναζόλη), κ.α. Τέλος, ως κριτήριο για την κατάταξη των αντιβιοτικών χρησιμοποιείται και ο μηχανισμός δράσης τους. Έτσι έχουμε τα αντιβιοτικά που δρουν αναστέλλοντας τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων (πενικιλλίνες, κεφαλοσπορίνες), αντιβιοτικά που παρεμποδίζουν την πρωτεϊνοσύνθεση των βακτηρίων (**τετρακυκλίνες**, μακρολίδια) και αντιβιοτικά που αναστέλλουν τη σύνθεση των νουκλεικών οξέων των βακτηρίων (σουλφοναμίδια, κινολόνες)[13].

2.1.2 Παρενέργειες των αντιβιοτικών

Οι πιθανές παρενέργειες της χρήσης αντιβιοτικών είναι ποικίλες και εξαρτώνται από τα χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά και τους μικροβιακούς οργανισμούς που στοχεύουν. Τα δυσμενή αποτελέσματα μπορούν να κυμανθούν από τον πυρετό και τη ναυτία ως σημαντικές αλλεργικές συμπεριλαμβανομένης και της φωτοδερματίτιδας. Μία από τις πιο κοινές παρενέργειες είναι η διάρροια, που οφείλεται στο αντιβιοτικό που αναστατώνει την κανονική ισορροπία της εντερικής χλωρίδας. Άλλες παρενέργειες μπορούν να προκύψουν από την αλληλεπίδραση με άλλα φάρμακα, όπως ο υψηλός κίνδυνος ζημίας τενόντων.

2.2 Οι τετρακυκλίνες και η φαρμακολογία τους

Οι **τετρακυκλίνες** (**TCs**) αποτελούν μια μεγάλη κατηγορία ευρέος φάσματος αντιβιοτικών και αντιμικροβιακών φαρμάκων. Ανακαλύφθηκαν τη δεκαετία του

1940 και ήταν η πρώτη ομάδα αντιβιοτικών στην οποία αποδόθηκε ο χαρακτηρισμός **αντιβιοτικά ευρέος φάσματος**, λόγω της υψηλής δραστικότητας τους έναντι διαφόρων τύπων βακτηρίων, τόσο Gram(+) (staphylococcus, streptococcus, pneumonococcus, eneterococcus), όσο και Gram(-) (gonococcus, cholera, dysentery bacillus, brucella), μικροοργανισμών, καθώς και έναντι πρωτόζωων παρασίτων. Το ευρύ πεδίο της αντιμικροβιακής δραστικότητας των τετρακυκλινών, το οποίο υπερκαλύπτει πολλές φορές αυτό άλλων ομάδων αντιβιοτικών, αλλά και η απουσία σημαντικών παρενεργειών, έχουν ως αποτέλεσμα οι τετρακυκλίνες να χρησιμοποιούνται ευρέως, τόσο στην ιατρική, όσο και στην κτηνιατρική. Επιπλέον βρίσκουν εφαρμογή και ως αυξητικά πρόσθετα σε ζωοτροφές, στους τομείς της κτηνοτροφίας και ιχθυοτροφίας, με στόχο την ταχεία αύξηση της παραγωγής[14]. Στην ιατρική, οι τετρακυκλίνες χορηγούνται για την αντιμετώπιση διαφόρων μολυσματικών ασθενειών, όπως η βρουκέλλωση, οι χλαμυδιακές λοιμώξεις, ο πυρετός Q, η μη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα, η χρόνια προστατίτιδα, η χολέρα, η ακμή (προτιμάται το **minocycline ®**) και η χρόνια ιγμορίτιδα[15].

Η χορήγηση, ωστόσο, τετρακυκλινών αντενδείκνυται σε περιπτώσεις υπερευαισθησίας, βαριάς νεφρικής και ηπατικής ανεπάρκειας, εγκυμοσύνης, καθώς και σε παιδιά κάτω των 8 ετών. Στις παρενέργειες των τετρακυκλινών περιλαμβάνονται : **1)** γαστρεντερικές και νεφρικές διαταραχές (ανορεξία, ναυτία, έμετοι, διάρροια, στοματίτιδα, γλωσσίτιδα), **2)** ονυχόλυση, **3)** φαιά χρώση δέρματος και βλεννογόνων (κυρίως με **minocycline®**), **4)** αύξηση ενδοκράνιας πίεσης κυρίως σε νεαρά άτομα και **5)** ίλιγγος (κυρίως με **minocycline®**)[16].

Οι τετρακυκλίνες εισέρχονται στους ευαίσθητους μικροοργανισμούς μέσω μεταφορικών πρωτεϊνών που βρίσκονται στην εσωτερική κυτταροπλασματική μεμβράνη των βακτηρίων. Η σύνδεση του αντιβιοτικού γίνεται με την υπομονάδα 30S του βακτηριακού ριβοσώματος, και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να εμποδίζεται η πρόσβαση των tRNA και mRNA στο ριβόσωμα. Κατά συνέπεια, δεν πραγματοποιείται ορθή ανάγνωση της αλυσίδας του DNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη και αναστέλλεται ,σε μεγάλο βαθμό, η πρωτεϊνική σύνθεση από το βακτήριο[17,18].

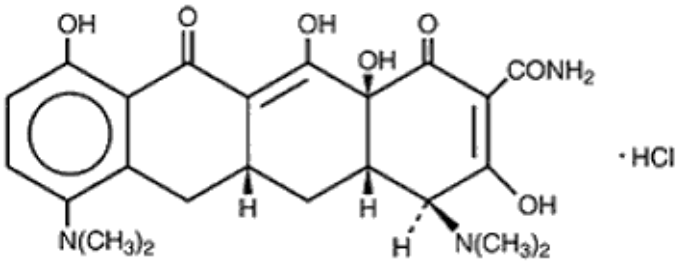
Η αντιμικροβιακή δραστικότητα των τετρακυκλινών σχετίζεται άμεσα με τη χημική τους δομή, αλλά και με τη σταθερότητα αυτής της δομής. Οι τετρακυκλίνες θεωρούνται σχετικά ασταθή μόρια, ιδιαίτερα ευαίσθητα στο φως, φυσικό ή τεχνητό, ενώ κάτω από ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και pH σχηματίζουν διάφορα παραπροϊόντα. Πιο συγκεκριμένα έχει διαπιστωθεί ότι σε μεθανολικά διαλύματα οι τετρακυκλίνες αρχίζουν να αποσυντίθενται μετά από έκθεση στο φως για χρονικό διάστημα 4 μηνών, ενώ σε υδατικά διαλύματα και σε θερμοκρασία 100 °C εμφανίζουν χρόνο ημιζωής μόλις 2 min. Τα παραπροϊόντα των τετρακυκλινών που σχηματίζονται σε κάθε περίπτωση είναι πολλά (έχουν ανιχνευθεί, χωρίς να έχουν όλα ταυτοποιηθεί, τουλάχιστον 14).

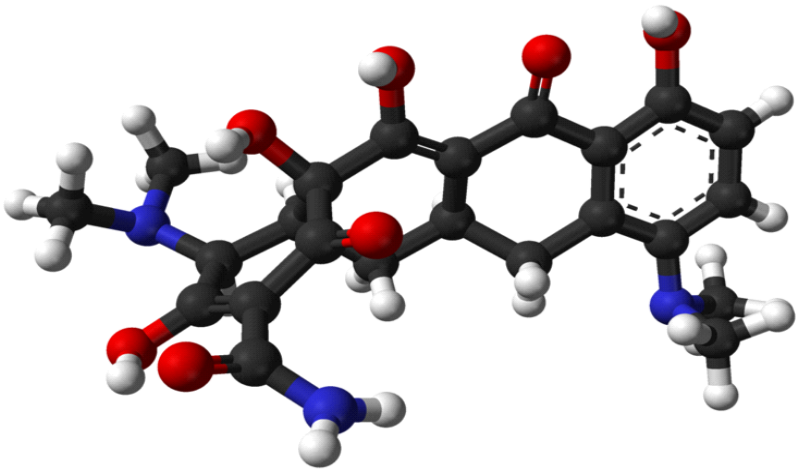
Πρόκειται ωστόσο, για χρήσιμα φάρμακα, παρόλο που η χρήση τους σήμερα, λόγω ανάπτυξης ανθεκτικών στελεχών είναι σχετικώς περιορισμένη[19]. Η ανακάλυψη των αντιβιοτικών αυτών ήταν ένα πολύ σημαντικό γεγονός, διότι, πέραν από τη θεραπεία πολλών ασθενειών, άνοιξε νέους ορίζοντες για την ανακάλυψη και τη σύνθεση νέων εξίσου σημαντικών αντιβιοτικών[20].

2.3 Minocycline® Hydrochloride (Υδροχλωρική Μινοκυκλίνη)

2.3.1 Εισαγωγή[21]

Η μινοκυκλίνη ανήκει στην κατηγορία των αντιβιοτικών τετρακυκλίνης ευρέος φάσματος, που αναφέρθηκαν προηγουμένως, ενώ το φάσμα της αντιμικροβιακής δράσης της υπερκαλύπτει τα φάσματα όλων των υπολοίπων μελών της ίδιας χημικής ομάδας αντιβιοτικών. Χρησιμοποιείται για τη θεραπεία μιας ποικιλίας βακτηριακών λοιμώξεων συμπεριλαμβανομένων της σοβαρής ακμής, δερματικών λοιμώξεων, λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος και πολλών άλλων. Έχει αποδειχθεί ότι ανακουφίζει από συμπτώματα και συναφείς επιδράσεις και εξαλείφει τα βακτήρια που προκαλούν τη λοίμωξη. Είναι πολύ σημαντικό να σημειωθεί ότι το φάρμακο αυτό είναι αποτελεσματικό μόνο στη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων, και δεν είναι κατάλληλο για την αγωγή ιογενών λοιμώξεων, όπως παραδείγματος χάριν το κοινό κρυολόγημα ή η γρίπη.





Εικόνα 2.2: Χημικός και μοριακός τύπος της Υδροχλωρικής Μινοκυκλίνης

Πρόκειται, λοιπόν, για ένα βακτηριοστατικό αντιβιοτικό με αρκετά μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής (11-22 ώρες), γεγονός που το καθιστά δραστικότερο σε σχέση με τις απλές υδατοδιαλυτές τετρακυκλίνες. Η μινοκυκλίνη είναι η πλέον διαλυτή στα λιπίδια από τα αντιβιοτικά κατηγορίας τετρακυκλίνης, και ως εκ τούτου, διεισδύει καλύτερα στον προστάτη και στον εγκέφαλο και παρουσιάζει τον μεγαλύτερο αριθμό παρενεργειών του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), όπως ο ίλιγγος.

Κατοχυρώθηκε με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας το 1961 και κυκλοφόρησε στο εμπόριο, για πρώτη φορά, το 1971. Δεν είναι φυσικώς απαντώμενο αντιβιοτικό, αλλά συντέθηκε ημισυνθετικά από φυσικά αντιβιοτικά τετρακυκλίνης, το 1966, στα εργαστήρια Lederle. Σήμερα, διατίθενται στο εμπόριο με την εμπορική ονομασία Minocin[22,23].

2.3.2 Χημικά και Φυσικά χαρακτηριστικά[24]

Το σκεύασμα της μινοκυκλίνης (**minocycline ®**) κυκλοφορεί στην αγορά με την μορφή υποκίτρινων δισκίων. Έχει σχετικά σταθερή σύσταση όταν προστατεύεται από την υγρασία και το φως, ενώ όταν θερμαίνεται, αποσυντίθενται ταχύτατα εκπέμποντας τοξικά αέρια που προέρχονται από τα νιτροξείδια. Απορροφάται ταχέως από τη γαστρεντερική οδό και η απορρόφηση αυτή δεν επηρεάζεται σημαντικά από την λήψη τροφής ή γάλακτος. Παρακάτω, συνοψίζονται μερικά ακόμα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά του φαρμάκου αυτού:

Μοριακός τύπος: $C_{23}H_{27}N_3O_7$ (βάση)
Σχετική Μοριακή μάζα: 457,483 (βάση)
Μορφή: Στερεά ουσία
Διαλυτότητα σε νερό: 52 g/L στους 25 °C
pKa (ισχυρότερη όξινη ομάδα) : 2,9
pKa (ισχυρότερη βάση) : 7,9
Maximum Drug dose: Ποσότητες μεγαλύτερες από 2 g/day δεν πρέπει να παρέχονται
Βιοδιαθεσιμότητα εκ του στόματος: 100%
Μεταβολισμός: Ηπατικός
Χρόνος ημίσειας ζωής: 11-22 ώρες
Βιολογικοί στόχοι: Κυτόπλασμα, εξωκυτταρική μεμβάνη.

Εικόνα 2.3 Ετικέτα δισκίων Minocycline HCL, σκευάσματος που διατίθεται στην αγορά

2.3.3 Ιατρικές χρήσεις του Minocycline®

Η μινοκυκλίνη και η δοξυκυκλίνη χρησιμοποιούνται ευρέως για τη θεραπεία της ακμής και την αναστολή της δράσης του βακτηρίου που προκαλεί αυτήν τη βακτηριακή λοίμωξη[25,26]. Και τα δύο αυτά συναφή αντιβιοτικά έχουν παρόμοια επίπεδα αποτελεσματικότητας και δραστικότητας, αν και το αντιβιοτικό της δοξυκυκλίνης εμφανίζει ελαφρώς μικρότερο κίνδυνο ανεπιθύμητων παρενεργειών[27]. Ιστορικά, η μινοκυκλίνη υπήρξε μια πολύ αποτελεσματική θεραπεία για την ακμή. Ωστόσο, η ακμή που προκαλείται από ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια είναι ένα ραγδαία αυξανόμενο πρόβλημα σε πολλές χώρες[28]. Στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική, ένας σημαντικός αριθμός ασθενών με ακμή, δεν ανταποκρίνεται πλέον καλά στη θεραπεία με αντιβιοτικά της οικογένειας των τετρακυκλινών, επειδή τα συμπτώματα τους, προκαλούνται από βακτήρια ανθεκτικά σε αυτά τα αντιβιοτικά (κυρίως Propionibacterium acnes)[29].

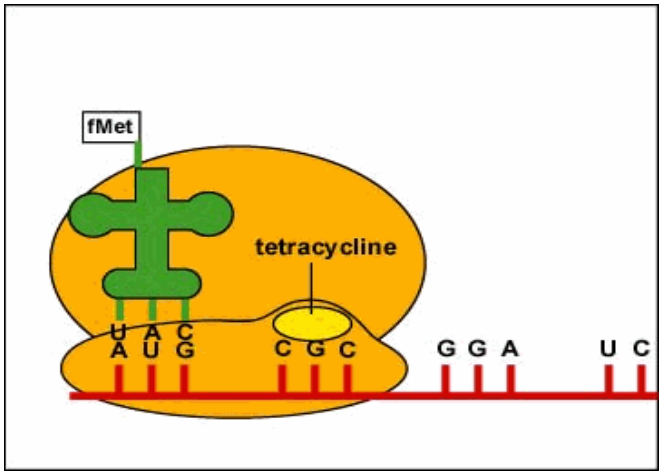
Το συγκεκριμένο φάρμακο χρησιμοποιείται επίσης και για άλλες λοιμώξεις του δέρματος, όπως η νόσος Lyme[30,31]. Η δράση του ενάντια στη νόσο αυτή ενισχύεται από την εκλεκτική ικανότητα του να διασχίζει τον αιμοτοεγκεφαλικό φραγμό, με σχετικά μεγάλη ευκολία. Αξίζει να αναφερθεί ακόμη, ότι παρόλο που το φάσμα της αντιμικροβιακής δράσης του φαρμάκου αυτού είναι το ευρύτερο σε σχέση με τις άλλες τετρακυκλίνες, η δραστικότητα και η χρησιμότητα του περιορίζεται από τις συχνά εμφανιζόμενες ανεπιθύμητες παρενέργειες του (π.χ. ζαλάδα, ίλιγγος κλπ.)[32]

Τέλος, τόσο η μινοκυκλίνη, όσο και η δοξυκυκλίνη, έχουν δείξει σημάδια αποτελεσματικότητας στο άσθμα λόγω των επιδράσεων του ανοσοποιητικού καταστολέα. Η μινοκυκλίνη ωστόσο, εμφανίζει μέτριου βαθμού αποτελεσματικότητα στη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας[33].

2.3.4 Μηχανισμός δράσης

Από εκτεταμένες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, έχει αποδειχθεί ότι η δράση του φαρμάκου **Minocycline®** και όλων των αντιβιοτικών τετρακυκλίνης, σχετίζεται με την αναστολή της σύνθεσης πρωτεϊνών, μιας διεργασίας του βακτηρίου. Για να αλληλεπιδράσουν με τους στόχους τους, τα φάρμακα αυτά, πρέπει να διασχίσουν ένα ή περισσότερα συστήματα μεμβράνης (ανάλογα με το αν το βακτήριο είναι Gram(+) ή Gram(-). Ως εκ τούτου, μία συζήτηση σχετικά με τον τροπο δράσης των φαρμάκων αυτών, απαιτεί την εξέταση των μηχανισμών πρόσληψης και ριβοσώματος, και η ικανότητα μικροβιακής εκλεκτικότητας αυτής της οικογένειας φαρμάκων[34].

Πιο συγκεκριμένα, τα αντιβιοτικά αυτά εισέρχονται στους ευαίσθητους μικροοργανισμούς μέσω μεταφορικών πρωτεϊνών που βρίσκονται στην εσωτερική κυτταροπλασματική μεμβράνη των βακτηρίων. Διασχίζουν την μεμβράνη αυτή, συνήθως ως θετικά φορτισμένα σύμπλοκα κατιόντων (Mg^{2+})-τετρακυκλίνης. Το σύμπλοκο αυτό προσελκύεται διαμέσου της μεμβράνης αυτής, οδηγώντας σε συσσώρευσή του στο περίπλασμα, όπου το σύμπλοκο στην συνέχεια, διασπάται για να απελευθερωθεί ηλεκτρικώς ουδέτερη τετρακυκλίνη. Μέσα στο κυτταρόπλασμα, τα μόρια μινοκυκλίνης πιθανώς να χηλιώνονται, επειδή οι συγκεντρώσεις δισθενούς μεταλλικού ιόντος, αλλά και το pH, είναι υψηλότερα από αυτά εκτός του κυττάρου.



Εικόνα 2.4 Μηχανσισμός δράσης των τετρακυκλινών, όπως και της Minocycline

Η σύνδεση του αντιβιοτικού γίνεται με την υπομονάδα 30S του ριβοσώματος και εμποδίζεται με τον τρόπο αυτό, η πρόσβαση των tRNA και mRNA στο ριβόσωμα. Κατά συνέπεια, η αδυναμία προσθήκης αμινοξέων στην πολυπεπτιδική αλυσίδα είναι έντονη και δεν πραγματοποιείται ορθή ανάγνωση της αλυσίδας του DNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη. Όλα αυτά οδηγούν στην καθυστέρηση της

πρωτεϊνικής σύνθεσης από το βακτήριο, με τελικό και άμεσο αποτέλεσμα την αναστολή της.

2.3.5 Κλινικές ενδείξεις[35]

Το **Minocycline®** ενδείκνυται, κυρίως, για τη θεραπεία:

Α) των ακόλουθων λοιμώξεων : Ρικετσιώσεων συμπεριλαμβανομένων της ερλιχίωσης, του πυρετού Q και του τύφου, λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος, αφροδίσιου λεμφοκοκκιώματος, ψιττάκωσης, τραχώματος και επιπεφυκίτηδος, μη γονοκοκκικής ουρηθρίτιδας, υπόστροφου πυρετού, αρχικών σταδίων της νόσου Lyme, μαλακού έλκους, χολέρας, βρουκελλώσεων σε συνδυασμό με στρεπτομυκίνη ή ριφαμπικίνη, μπαρτονέλλωσης, βουβωνικού λεμφοκοκκιώματος και φλεγμονωδών παθήσεων μικρής πυέλου των γυναικών.

Β) Λοιμώξεις οφειλόμενων σε Gram(-) μικρόβια, εφόσον η καλλιέργεια αποδεικνύει ότι είναι ευαίσθητα στη μινοκυκλίνη, όπως Escherichia coli, Enterobacter aerogenes, Shigella species και Acinetobacter species.

Γ) Λοιμώξεις από Gram(+) μικρόβια, όπως του ανωτέρου αναπνευστικού από streptococcus pneumonia και του δέρματος και των εξαρτημάτων του από Staplylococcus aureus.

Δ) Ως φάρμακο δεύτερης επιλογής όταν αντενδείκνυται η χρήση της πενικιλλίνης στις ακόλουθες λοιμώξεις : Ανεπίπλεκτη ουρηθρίτιδα στους άνδρες, γονοκοκκικές λοιμώξεις στις γυναίκες, σύφιλη, τροπική μόρωση, λιστερίωση, οξεία νεκροελκωτική ουλίτιδα και ακτινομυκητίαση.

Ε) Οξείας αμοιβαδικής εντερίτιδας σε συνδυασμό με αμοιβαδοκτόνο.

ΣΤ) Ακμής και ροδόχρου νόσου ως συμπληρωματική θεραπεία.

Ζ) Ελονοσίας από Plasmodium falciparum ανθεκτικό στην χλωροκίνη χορηγούμενη μαζί με κινίνη.

2.3.6 Δοσολογία και τρόπος χορήγησης[35]

Το συγκεκριμένο φάρμακο χορηγείται από το στόμα. Το δισκίο πρέπει να λαμβάνεται ακέραιο με άφθονο νερό (τουλάχιστον 1 ποτήρι) αμάσητο και αθρυμμάτιστο. Η διάρκεια της θεραπείας εξαρτάται από τη βαρύτητα της λοίμωξης και την κλινική και μικροβιολογική 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 διακρίνουμε τις ακόλουθες κατηγορίες ανθρώπων :

1) Ενήλικες. Η συνήθης από του στόματος δόση είναι 200 mg αρχικώς και εν συνεχεία 100 mg κάθε 12 ώρες. Η συνολική δόση 24ώρου δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 400 mg. Στη θεραπεία της ακμής και της ροδόχρου νόσου, η συνιστώμενη δόση είναι 100 mg ημερησίως χορηγούμενη σε 2 δόσεις. Η χορήγηση πρέπει να διαρκεί τουλάχιστον 6 εβδομάδες για να διαπιστωθεί εάν φέρει αποτέλεσμα ή όχι. Μέγιστη διάρκεια θεραπείας είναι οι 6 μήνες.

Στη θεραπεία των ανεπίπλεκτων γονοκοκκικών λοιμώξεων πλην της ουρηθρίτιδας και της πρωκτίτιδας των ανδρών η αρχική δόση είναι 200 mg ακολουθούμενη από 100 mg κάθε 12 ώρες για 4 τουλάχιστον ημέρες. Στη θεραπεία της ανεπίπλεκτης γονοκοκκικής ουρηθρίτιδας και πρωκτίτιδας των ανδρών η συνιστώμενη δόση είναι 100 mg κάθε 12 ώρες για 5 ημέρες. Στη θεραπεία της σύφιλης η συνήθης δόση της μινοκυκλίνης πρέπει να χορηγείται για 10 έως 15 ημέρες. Στη θεραπεία των φορέων του μηνιγγιτιδοκόκκου η συνιστώμενη δόση είναι 100 mg κάθε 12 ώρες για 5 ημέρες. Στη θεραπεία των λοιμώξεων από Mycobacterium marinum χορηγούνται 100 mg κάθε 12 ώρες για 6 έως 8 εβδομάδες. Στην θεραπεία της ελονοσίας από ανθεκτικό στην χλωροκίνη P.falciparum η συνιστώμενη δόση είναι 100 mg κάθε 12 ώρες για 10 ημέρες. Τέλος, στη θεραπεία της ανεπίπλεκτης ουρηθρίτιδας ή τραχηλίτιδας, ή πρωκτίτιδας που οφείλεται σε C. trachomatis ή U.urealyticum η συνιστώμενη δόση είναι 100 mg κάθε 12 ώρες για 7 τουλάχιστον ημέρες.

2) Υπερήλικες. Χρειάζεται προσοχή, ενώ συνιστώνται οι χαμηλότερες δόσεις.

3) Νεφροπαθείς. Στους πάσχοντες από νεφρική ανεπάρκεια, η ημερήσια δόση δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 200 mg.

4) Παιδιά. Η χορήγηση του **Minocycline®** επιτρέπεται σε παιδιά μεγαλύτερα από 8 χρονών. Η αρχική δόση είναι 4 mg/kg βάρους σώματος, ακολουθούμενη από 2 mg/kg κάθε 12 ώρες.

2.3.7 Υπερδοσολογία[35]

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

2.3.8 Κύηση και θηλασμός[35]

Τα αποτελέσματα μελετών σε ζώα έχουν δείξει ότι η υδροχλωρική μινοκυκλίνη, όπως και τα άλλα αντιβιοτικά της τάξης των τετρακυκλινών, διαπερνούν τον πλακούντα, ανευρίσκονται στους ιστούς του εμβρύου και μπορεί να έχουν τοξική επίδραση στο αναπτυσσόμενο έμβρυο (η οποία συχνά σχετίζεται με επιβράδυνση της ανάπτυξης του σκελετού). Έχουν σημειωθεί, λοιπόν, στοιχεία εμβρυοτοξικότητας σε ζώα στα οποία χορηγήθηκαν τετρακυκλίνες στα πρώτα στάδια της εγκυμοσύνης. Εάν η υδροχλωρική μινοκυκλίνη χρησιμοποιηθεί κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, ή εάν η γυναίκα μείνει έγκυος ενώ λαμβάνει το φάρμακο αυτό, η ασθενής πρέπει να ενημερωθεί για τον πιθανό κίνδυνο προς το έμβρυο.

Η χρήση, ακόμα, τετρακυκλινών, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των οδόντων (τελευταίο ήμισυ της εγκυμοσύνης) μπορεί να προκαλέσει μόνιμο χρωματισμό των οδόντων, μιας και το φάρμακο αυτό επικάθεται για μεγάλο χρονικό διάστημα, στα δόντια και στα οστά. Στις περισσότερες περιπτώσεις, παρατηρείται το φαινόμενο της υποπλασίας της αδαμαντίνης. Τέλος, οι τετρακυκλίνες που χορηγούνται κατά το τελευταίο τρίμηνο της κύησης, σχηματίζουν ένα σταθερό σύμπλεγμα ασβεστίου σε όλο τον σκελετό του εμβρύου. Έχει παρατηρηθεί μείωση στο ρυθμό ανάπτυξης της περόνης σε πρόωρα νεογνά στα οποία χορηγήθηκε μινοκυκλίνη από το στόμα σε δόσεις 25 mg/kg κάθε 6 ώρες. Οι μεταβολές στο ρυθμό ανάπτυξης της περόνης ήταν αναστρέψιμες όταν σταμάτησε η χορήγηση του φαρμάκου.

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

2.3.9 Αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα και άλλες μορφές αλληλεπίδρασης[36]

Τα αντιβιοτικά της τάξης των τετρακυκλινών, όπως και η **Minocycline®**, ανταγωνίζονται τη μικροβιοκτόνο δράση της πενικιλλίνης, ενώ ενισχύουν τη δράση της διγοξίνης (κίνδυνός τοξικού δακτυλιδισμού) και των από του στόματος αντιπηκτικών. Με θεοφυλλίνη αυξάνεται η συχνότητα ανεπιθύμητων ενεργειών από το γαστρεντρικό, ενώ με μεθοξυφλουράνιο ο κίνδυνος νεφροτοξικότητας ενίοτε θανατηφόρου. Βαρβιτουρικά, φαινυτοΐνη και καρβαμαζεπίνη μειώνουν τη δραστικότητά τους, ενώ τα αντιόξινα που περιέχουν αργίλιο, μαγνήσιο, ασβέστιο, τα άλατα σιδήρου ή βισμουθίου, σκευάσματα ψευδαργύρου, η σιμετιδίνη και τροφές (ιδιαιτέρως γαλακτοκομικά προϊόντα , εκτός της δοξυκυκλίνης και της μινοκυκλίνης που δεν επηρεάζονται σημαντικά από την ταυτόχρονη λήψη τροφής ή γάλακτος) αναστέλλουν την

απορρόφησή τους. Με τη χρησιμοποίηση ρετινοειδών, αυξάνεται ο κίνδυνος ενδοκρανιακής υπέρτασης, ενώ με τη χρήση αλκαλοειδών, αυξάνεται ο κίνδυνος εργοτισμού. Τέλος, η ταυτόχρονη χρήση τετρακυκλινών μπορεί να μειώσει τη δράση των από του στόματος αντισυλληπτικών.

2.3.10 Πιθανές ανεπιθύμητες ενέργειες[35]

Όπως όλα τα φάρμακα, έτσι και η **Minocycline®** μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες ενέργειες, αν και δεν παρουσιάζονται οι ίδιες παρενέργειες σε όλους τους ανθρώπους. Υπάρχουν περιορισμένα διαθέσιμα δεδομένα μακροχρόνιας ασφάλειας, ιδιαίτερα όσον αφορά την ανάπτυξη των παιδιών. Η ακόλουθη συνθήκη έχει χρησιμοποιηθεί για την κατηγοριοποίηση των ανεπιθύμητων ενεργειών: πολύ συχνές (>1/10), συχνές (>1/100), σπάνιες (>1/1000) και πολύ σπάνιες (>1/10000). Οι συχνότητες των ανεπιθύμητων καταστάσεων έχουν υπολογισθεί από αυθόρμητες αναφορές από στοιχεία μετά την κυκλοφορία του φαρμάκου.

Διαταραχές του αιμοποιητικού και του λεμφικού συστήματος
Σπάνιες: Ηωσινοφιλία, λευκοπενία, ουδετεροπενία, θρομβοπενία
Πολύ σπάνιες: Αιμολυτική αναιμία, πανκυτταροπενία
Απροσδιορίστου συχνότητας: Ακοκκιοκυτταραιμία

Καρδιακές διαταραχές
Πολύ σπάνιες: Μυοκαρδίτιδα, περικαρδίτιδα

Διαταραχές των ώτων και των λαβυρίνθων
Σπάνιες: Έκπτωση της ακουστικής οξύτητας, εμβοές

Διαταραχές του ενδοκρινικού συστήματος
Πολύ σπάνιες: Ανώμαλη λειτουργία του θυρεοειδούς, φαιοχρούς, δυσχρωμασία του θυρεοειδούς

Διαταραχές του γαστρεντερικού συστήματος
Σπάνιες: Διάρροια, ναυτία, στοματίτιδα, χρωματισμός δοντιών, έμετος
Πολύ σπάνιες: Δυσπεψία, δυσφαγία, υποπλασία της αδαμαντίνης, εντεροκολίτιδα, οισοφαγίτιδα, γλωσσίτιδα.

Γενικές διαταραχές και καταστάσεις της θέσης χορήγησης
Σπάνιες: Πυρετός
Πολύ σπάνιες: Δυσχρωματισμός εκκρίσεων

Διαταραχές του ήπατος και των χοληφόρων
Σπάνιες: Αυξημένα ηπατικά ένζυμα, ηπατίτιδα
Πολύ σπάνιες: Ηπατική χολόσταση, ηπατική ανεπάρκεια, ίκτερος

Διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος
Σπανιες: Αναφυλακτικές/ αναφυλακτοειδείς αντιδράσεις
Απροσδιόριστης συχνότητας: Υπερευαισθησία
Πολύ σπάνιες: Στοματική και πρωκτογεννητική καντιντίαση, αιδοιοκολπίτιδα

Διαταραχές του μεταβολισμού και της θρέψης
Σπάνιες: Ανορεξία

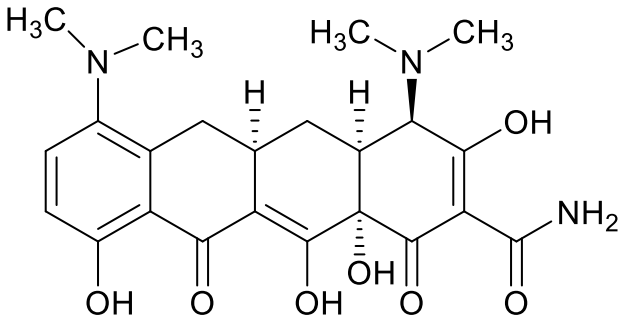
Διαταραχές νευρικού συστήματος
Συχνές: Ζάλη (αδιαθεσία)
Σπάνιες: Κεφαλαλγία, υπαισθησία, παραισθησία, ίλιγγος
Πολύ σπάνιες: Προβολή των πηγών του κρανίου των βρεφών
Απροσδιόριστης συχνότητας: Σπασμοί, καταστολή

Διαταραχές των νεφρών και των ουροφόρων οδών
Σπάνιες: Αύξηση του αζώτου/ ουρίας του αίματος (BUN)
Πολύ σπάνιες: Οξεία νεφρική ανεπάρκεια, διάμεση νεφρίτιδα

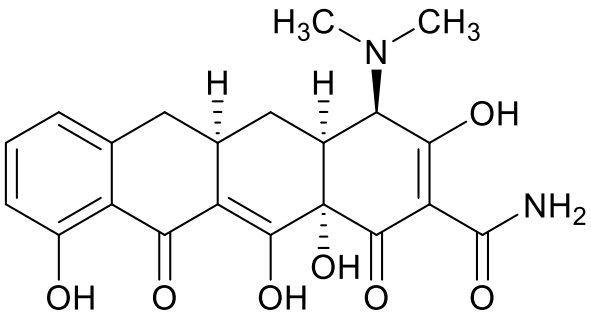
Διαταραχές του αναπνευστικού συστήματος, του θώρακα και του μεσοθωρακίου
Σπάνιες: Βήχας, δύσπνοια
Πολύ σπάνιες: Παρόξυνση άσθματος
Απροσδιόριστης συχνότητας: Πνευμονίτιδα

2.4 Προσμίξεις φαρμάκου Minocycline®

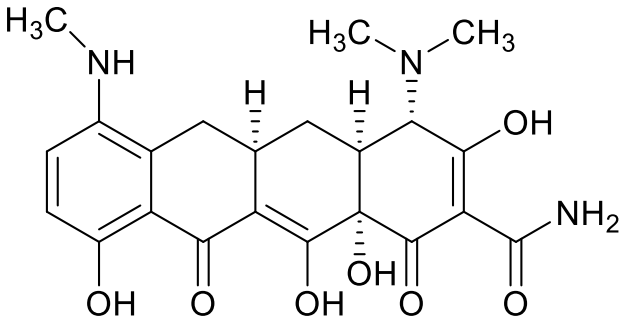
Οι γνωστές προσμίξεις του αντιβιοτικού της μινοκυκλίνης, που αναφέρονται στην Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία (European Pharmacopeia) είναι οι εξής:



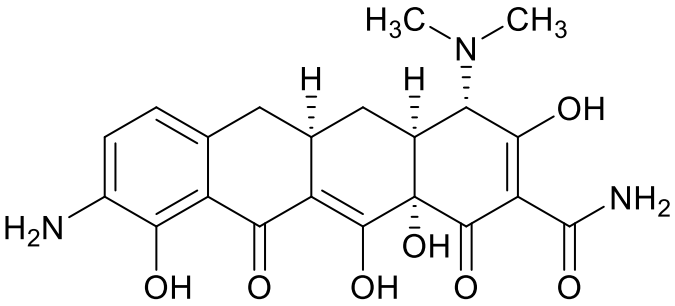
ImpurityA (4-epiminocycline)



ImpurityB (sancycline)



ImpurityC (7-monodemethylminocycline)



ImpurityD (7-aminosancycline)

2.5 Μέθοδοι προσδιορισμού Minocycline ®

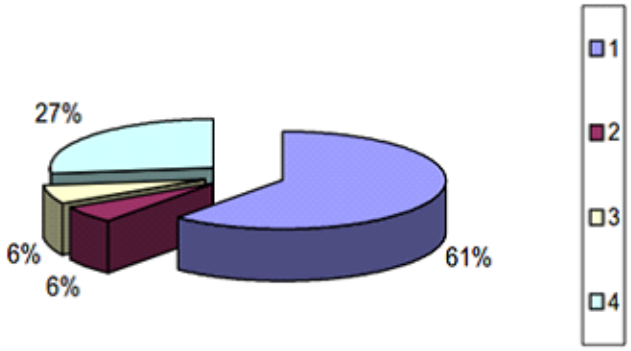
Μετά από βιβλιογραφική έρευνα σε δημοσιευμένα άρθρα διαπιστώθηκε πως έχουν εφαρμοστεί αρκετές αναλυτικές τεχνικές για τον προσδιορισμό της μινοκυκλίνης. Συγκεκριμένα, υπάρχουν αναφορές όπου εφαρμόζονται οι τεχνικές:

- Κυκλικού διχρωισμού (CD)[37]
- Πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)[38]
- Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC)
- Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC)[39]
- Αεριοχρωματογραφίας (GC)
- Φθορισμομετρίας
- Χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης (RP-HPLC).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο: ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ

3.1 Προετοιμασία φαρμακευτικού σκευάσματος[40,41]

Ανεξάρτητα από τη χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική, η προκατεργασία ενός δείγματος αποτελεί το πλέον ουσιαστικό και χρονοβόρο στάδιο της αναλυτικής διαδικασίας, αλλά και ένα από τα πιο σημαντικά για την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων και την αποφυγή ανεπιθύμητων σφαλμάτων. Στο σχήμα 3.1, δίνεται ποσοστιαία ο μέσος χρόνος προκατεργασίας του δείγματος σε σχέση με τη συνολική διαδικασία.



Σχήμα 3.1 Κατανομή χρόνου στην αναλυτική διαδικασία (1. Προκατεργασία δείγματος, 2. Ανάλυση, 3. Συλλογή δεδομένων, 4. Επεξεργασία δεδομένων)

Η σωστή προκατεργασία έχει ως σκοπό:

- τον καθαρισμό του δείγματος προς ανάλυση, από τυχόν παρεμποδίσεις ή προσμίξεις
- την απομόνωση και παραλαβή του συστατικού που μας ενδιαφέρει
- την προσυγκέντρωση του
- την τροποποίηση της φυσικής του κατάστασης

Το συγκεκριμένο στάδιο της αναλυτικής διαδικασίας, κρίνεται απαραίτητο σε περιπτώσεις στις οποίες στο δείγμα υπάρχουν ενώσεις οι οποίες έχουν παραπλήσιες ιδιότητες (π.χ. απορροφούν στην ίδια περιοχή του υπεριώδους με τις προσδιοριζόμενες ενώσεις), γεγονός που καθιστά ιδιαίτερα δύσκολη τη διαδικασία του ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού. Χαρακτηριστικά

δείγματα που χρήζουν προκατεργασίας αποτελούν τα βιολογικά υγρά, στα οποία απαιτείται η αποπρωτεΐνωσή τους, προς αποφυγή καταβυθίσεων οι οποίες ενδέχεται να αποδειχτούν επιζήμιες για τη χρησιμοποιούμενη αναλυτική στήλη.

Μία ιδανική τεχνική προκατεργασίας δείγματος θα πρέπει να:

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

3.2. Τεχνικές προκατεργασίας δείγματος[40-43]

3.2.1. Τεχνικές διαλυτοποίησης [40,41]

Είναι η απλούστερη τεχνική προκατεργασίας του δείγματος. Κατά τη διαλυτοποίηση με υπερήχους (sonication) το δείγμα, έχοντας υποστεί ελαφριά διαλυτοποίηση και ευρισκόμενο μέσα σε ογκομετρική φιάλη, εμβαπτίζεται σε λουτρό υπερήχων με διαλύτη και υπόκειται σε επίδραση κυμάτων υπερήχων. Από τα βασικότερα πλεονεκτήματα της διαλυτοποίησης με υπερήχους, πέρα από το ότι είναι ασφαλής, γρήγορη και ενδείκνυται για χονδρόκοκκα υλικά, είναι το γεγονός ότι επιτρέπεται η ταυτόχρονη επεξεργασία πολλαπλών δειγμάτων. Αντίστοιχα, στην υγρή διαλυτοποίηση, το δείγμα κατεργάζεται με διαλύτη και το διάλυμα λαμβάνεται με ή χωρίς χημική μεταβολή.

3.2.2 Κλασικές τεχνικές εκχύλισης [41,42]

- Εκχύλιση υγρού – υγρού

Η συγκεκριμένη τεχνική, αποτελούσε την κυριότερη τεχνική που χρησιμοποιούνταν για την επεξεργασία δείγματος. Η εκχύλιση υγρού-υγρού περιλαμβάνει την απομάκρυνση οργανικών ενώσεων με εκχύλιση, με διαλύτη μη αναμίξιμο με το υπόστρωμα του δείγματος, και στηρίζεται στις σχετικές διαλυτότητες του συστατικού ανάμεσα στο διαλύτη εκχύλισης και στο υπόστρωμα του δείγματος. Τα βασικότερα μειονεκτήματα του συγκεκριμένου τρόπου εκχύλισης είναι ότι:

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

- Εκχύλιση Soxhlet

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

- Διαλυτοποίηση εξαναγκασμένης ροής (Forced flow leaching)

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

3.2.3. Σύγχρονες τεχνικές εκχύλισης[41]

- Επιταχυνόμενη εκχύλιση (Accelerated solvent extraction)

Στη συγκεκριμένη μέθοδο το δείγμα τοποθετείται σε σφραγισμένο δοχείο και θερμαίνεται σε θερμοκρασία μεγαλύτερη του σημείου ζέσεως, προκαλώντας έτσι αύξηση της πίεσης στο δοχείο. Το εκχυλιζόμενο δείγμα απομακρύνεται αυτόματα και μεταφέρεται σε υποδοχέα για περαιτέρω κατεργασία. Η τεχνική αυτή είναι αρκετά γρήγορη, και δίνει τη δυνατότητα αυτοματοποίησης, όμως η λήψη μέτρων ασφαλείας πριν την εφαρμογή της είναι απαραίτητη.

- Αυτοματοποιημένη Soxhlet

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

- Εκχύλιση με επίδραση μικροκυμάτων (Microwave assisted extraction)

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

3.2.4. Τεχνικές εκχύλισης στις οποίες δεν χρησιμοποιείται διαλύτης (solventfree) [40-43]

- Αέρια εκχύλιση

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

- Εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού (SFE)

Στη SFE το δείγμα τοποθετείται σε δοχείο συνεχούς ροής και ένα υπερκρίσιμο ρευστό (συνήθως CO_2) διέρχεται από το δείγμα. Μετά από αποσυμπίεση το εκχυλιζόμενο δείγμα συλλέγεται σε διαλύτη ή παγιδεύεται σε προσροφητικό υλικό και εκροφάται με πλύση με διαλύτη. Στη συγκεκριμένη τεχνική υπάρχει δυνατότητα αυτοματοποίησης, ενώ το δείγμα προσυγκεντρώνεται και είναι καθαρό, επειδή το CO_2 απομακρύνεται μετά την εκχύλιση.

- Εκχύλιση στερεάς φάσης-υγρού (SPE)[43]

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

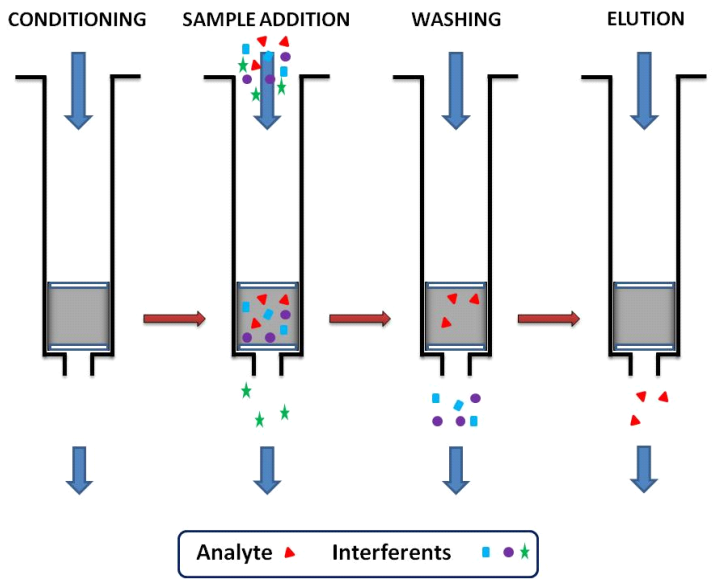
- Επιτυγχάνεται μεγάλο ποσοστό ανάκτησης της ένωσης που μας ενδιαφέρει και σε υψηλή καθαρότητα
- Απαιτούνται μικροί χρόνοι προκατεργασίας.
- Δε σχηματίζονται γαλακτώματα.
- Υπάρχει δυνατότητα αυτοματοποίησης της τεχνικής, η οποία συνεπάγεται μεγαλύτερη ταχύτητα, καλύτερη επαναληψιμότητα και ταυτόχρονη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

Ως βασικό μειονέκτημα της εκχύλισης στερεάς φάσης-υγρού είναι το γεγονός ότι έχει υψηλό υπόβαθρο εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με GC η GC/MS. Το δυσκολότερο στάδιο στη συγκεκριμένη τεχνική εκχύλισης είναι η επιλογή του κατάλληλου προσροφητικού υλικού, ανάλογα με το υπό εξέταση δείγμα. Ο τύπος και η ποσότητα του προσροφητικού υλικού το οποίο επιλέγεται, εξαρτάται από τη διαλυτότητα των προσδιοριζόμενων ενώσεων στους διάφορους διαλύτες, την πολικότητά τους, τη φύση του υποστρώματος του δείγματος, καθώς και τη συγκέντρωση των προσδιοριζόμενων ενώσεων μέσα σ’αυτό. Παράλληλα η επιλογή του διαλύτη γίνεται με τέτοιο τρόπο, ούτως ώστε

να απομακρύνονται από το δείγμα όσο το δυνατόν περισσότερες παρεμποδίσεις, ενώ ταυτόχρονα να εξασφαλίζεται η μέγιστη δυνατή ανάκτηση για τις προσδιοριζόμενες ενώσεις. Γενικά επιλέγονται πολικοί διαλύτες όταν χρησιμοποιούνται μη πολικές στατικές φάσεις και αντίστροφα.

Συνοπτικά τα στάδια τα οποία ακολουθούνται στην εκχύλιση στερεάς φάσης υγρού, και τα οποία αποδίδονται γραφικά και στην εικόνα 3.2[44] που ακολουθεί, είναι τα παρακάτω:

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



Εικόνα 3.1. Σχηματική αναπαράσταση σταδίων εκχύλισης στερεάς φάσης-υγρού (SPE)

Η εκχύλιση στερεάς φάσης – υγρού δύναται να εφαρμοστεί:

- Σε περιβαλλοντικά δείγματα (εντομοκτόνα, παρασιτοκτόνα)

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

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

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

- Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης – υγρού (SPME)

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

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

3.2.5. Άμεσες τεχνικές – μικροδιαπίδυση (microdialysis)

Πρόκειται για μια βιοαναλυτική μέθοδο δειγματοληψίας, η οποία δύναται να

εφαρμοστεί σε μελέτες οι οποίες γίνονται σε ζώα, φυτά, καλλιέργειες κυττάρων και μπύρες στο στάδιο της ζύμωσης. Η μικροδιαπίδυση επιτυγχάνεται εισάγοντας μια μικροσκοπική μεμβράνη στο ζωντανό ιστό. Σε σύγκριση με τις άλλες τεχνικές, όσον αφορά τα συγκεκριμένα δείγματα, οδηγεί σε πιο αντιπροσωπευτικά συμπεράσματα, ενώ δεν προϋποθέτει τη θανάτωση του ζώου. Αντίστοιχα σε σύγκριση με τη λήψη αίματος δεν εμφανίζει απώλεια συστατικού, επιτρέπει πιο συχνή δειγματοληψία, ενώ παράλληλα τα δείγματα είναι ελεύθερα πρωτεϊνών και ως εκ τούτου δεν απαιτούν περαιτέρω προκατεργασία.

3.2.6. Τεχνικές εναλλαγής στηλών

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

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο: ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)

4.1 Εισαγωγή - Ιστορική Αναδρομή[9,45,46]

Η σύγχρονη υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης ή αλλιώς HPLC, έχει τις ρίζες της σε μια συγκεκριμένη μορφή διαχωρισμού, που μπορεί να θεωρηθεί η πρώτη μορφή υγροχρωματογραφίας. Στις αρχές του εικοστού αιώνα χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά μια αναλυτική τεχνική ως μέθοδος διαχωρισμού χρωματισμένων ενώσεων. Έτσι προέκυψε το όνομα χρωματογραφία. Ένας Ρώσος βοτανολόγος με το όνομα Mikhail S. Tswett, χρησιμοποίησε μια στοιχειώδη μορφή χρωματογραφικού διαχωρισμού για να καθαρίσει τα μίγματα φυτικών χρωστικών ουσιών στα καθαρά συστατικά τους. Διαχώρισε τις χρωστικές 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 στον διαχωρισμό της ήταν ο διαλύτης. Αφού η στερεά στατική φάση συσκευάσθηκε σε μια γυάλινη στήλη (ουσιαστικά ένα μακρύ κοίλο γυάλινο σωλήνα), έχυσε το μίγμα φυτικών χρωστικών ουσιών και διαλύτη στην κορυφή της στήλης. Στη συνέχεια εισήγαγε επιπλέον διαλύτη εντός της στήλης, μέχρις ότου τα δείγματα εκλούσθηκαν 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.

Γενικά, πριν από την HPLC οι επιστήμονες χρησιμοποίησαν άλλες τεχνικές υγροχρωματογραφίας. Τα συστήματα υγροχρωματογραφίας ήταν σε μεγάλο βαθμό αναποτελεσματικά λόγω του ρυθμού ροής των διαλυτών, που εξαρτώνταν από τη βαρύτητα. Οι διαχωρισμοί χρειάζονταν πολλές ώρες για να ολοκληρωθούν. Η αέρια χρωματογραφία (GC) κατά την εποχή εκείνη ήταν πιο ισχυρή από την υγροχρωματογραφία (LC), ωστόσο, πιστεύεται ότι ο διαχωρισμός αερίου φάσης και η ανάλυση πολύ πολικών βιοπολυμερών υψηλού μοριακού βάρους δεν ήταν δυνατή. Η τεχνική GC ήταν αναποτελεσματική για πολλές βιοχημικές ουσίες, λόγω της θερμικής αστάθειας των διαλυμένων ουσιών. Ως αποτέλεσμα, έγιναν έρευνες για εναλλακτικές τεχνικές, οι οποίες είχαν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη της HPLC.

Κατα τη δεκαετία του 1970, εμφανίστηκαν οι πρώτες εμπορικά διαθέσιμες, χρωματογραφικές συσκευές . Η Χρωματογραφία Ανοιχτής Στήλης, η Χρωματογραφία Χάρτη και η Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας ήταν οι πρώτες χρωματογραφικές τεχνικές, επιτυγχάνοντας αρχικά ένα σημαντικό 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.

Η δεκαετία του 1970 , επίσης, είχε πολλές εξελίξεις στα υλικά και τα όργανα που χρησιμοποιούνταν. Οι ερευνητές άρχισαν να χρησιμοποιούν αντλίες και εγχυτήρες για να κάνουν ένα στοιχειώδη σχεδιασμό ενός συστήματος HPLC.

Τα γεγονότα αυτό συνετέλεσαν στην επέκταση της χρήσης της Υγρο-χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (Πίεσης) (HPLC) με την οποία επιτυγχάνονταν μικρότεροι χρόνοι ανάλυσης αν και παρέμειναν ερωτηματικά κατά πόσο έπρεπε να χρησιμοποιείται σταθερή ροή ή σταθερή πίεση.

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

Η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης είναι τώρα ένα από τα πιο σημαντικά εργαλεία της αναλυτικής χημείας. Μέσω της τεχνικής αυτής, είναι δυνατός ο διαχωρισμός, η ανίχνευση, αλλά και ο ποσοτικός προσδιορισμός των ουσιών που υπάρχουν σε ένα δείγμα, το οποίο μπορεί να διαλυθεί σε υγρό. Σήμερα, ενώσεις σε ίχνη, με συγκεντρώσεις, τόσο χαμηλές, όσο μέρη ανά τρισεκατομμύριο (ppt), μπορούν εύκολα να προσδιοριστούν.

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

- **Γενικές πληροφορίες**[47]

Η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography – HPLC) , που παλαιότερα αναφερόταν ως υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης, είναι μια ενόργανη αναλυτική τεχνική, που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον ποσοτικό προσδιορισμό κάθε συστατικού σε ένα μείγμα, τα οποία έχουν παραπλήσιες ιδιότητες. Μέσα από αντλίες, περνάει υγρός διαλύτης υπό πίεση, ο οποίος περιέχει το μείγμα δείγματος, μέσω στήλης γεμάτης με στερεό υλικό, δηλαδή η κινητή φάση διαβιβάζεται μέσα από τη στατική φάση με αυξημένη πίεση. Κάθε συστατικό του δείγματος αλληλεπιδρά ελαφρώς διαφορετικά με το υλικό, προκαλώντας διαφορετικούς ρυθμούς ροής για τα διάφορα συστατικά και οδηγώντας στον διαχωρισμό των συστατικών καθώς ρέουν έξω από τη στήλη.

Η HPLC έχει χρησιμοποιηθεί για βιομηχανική χρήση (π.χ. κατά τη διάρκεια της διαδικασίας παραγωγής φαρμακευτικών και βιολογικών προϊόντων), νομική χρήση (π.χ. ανίχνευση φαρμάκων ντόπινγκ στα ούρα), στην έρευνα (π.χ. διαχωρισμός των συστατικών ενός σύνθετου βιολογικού δείγματος ή άλλων συνθετικών χημικών ουσιών μεταξύ τους) και για ιατρικούς λόγους (π.χ. ανίχνευση επιπέδων βιταμίνης D στον ορό του αίματος).

Τα βασικότερα πλεονεκτήματά της σε σχέση με άλλες αναλυτικές τεχνικές, είναι τα παρακάτω:

- Έχει σχεδόν καθολική εφαρμογή
- Παρουσιάζει πολύ καλή επαναληψιμότητα
- Διαθέτει μεγάλο εύρος εξοπλισμού, στηλών, και άλλων υλικών, επιτρέποντας τη χρήση της σχεδόν σε κάθε εφαρμογή
- Είναι ευρέως διαδεδομένη τεχνική και τα περισσότερα αναλυτικά εργαστήρια, διαθέτουν κατάλληλο εξοπλισμό, ώστε να εφαρμόζουν τις μεθόδους.

Το σχήμα ενός οργάνου HPLC περιλαμβάνει συνήθως έναν δειγματολήπτη, αντλίες και έναν ανιχνευτή. Ο δειγματολήπτης φέρνει το μείγμα δείγματος στο ρεύμα κινητής φάσης το οποίο το μεταφέρει στη στήλη. Οι αντλίες παρέχουν την

επιθυμητή ροή και τη σύσταση της κινητής φάσης μέσω της στήλης. Ο ανιχνευτής παράγει ένα σήμα ανάλογο προς την ποσότητα των συστατικών του δείγματος που εκλούονται από τη στήλη, επιτρέποντας έτσι την ποσοτική ανάλυση των συστατικών του δείγματος. Ένας ψηφιακός μικροεπεξεργαστής μαζί με το λογισμικό χρήστη ελέγχουν το όργανο HPLC και παρέχουν ανάλυση δεδομένων. Ορισμένα μοντέλα αντλιών σε ένα όργανο HPLC μπορούν να αναμειγνύουν πολλαπλούς διαλύτες μαζί σε αναλογίες που αλλάζουν στο χρόνο, δημιουργώντας μια βαθμίδα σύστασης στην κινητή φάση (**βαθμιδωτή έκλουση**). Διάφοροι ανιχνευτές είναι κοινής χρήσης, όπως ο UV / Vis, η συστοιχία φωτοδιόδων (PDA) ή η φασματομετρία μαζών. Τα περισσότερα όργανα HPLC έχουν επίσης έναν φούρνο στήλης που επιτρέπει την ρύθμιση της θερμοκρασίας στην οποία γίνεται ο διαχωρισμός.

Εικόνα 4.1. Σύστημα HPLC

4.2. Αρχή της Τεχνικής[40,48,51]

Τα συστατικά του μίγματος, στην HPLC, διαχωρίζονται μέσω της διασποράς τους μεταξύ δύο φάσεων, μιας στατικής και μιας κινητής (φέρουσας) που βρίσκονται μέσα στη χρωματογραφική στήλη. Η αρχή της χρωματογραφίας είναι παρόμοια με αυτή της εκχύλισης και της κλασματικής απόσταξης. Ουσίες που κατανέμονται περισσότερο στη κινητή φάση, διαχωρίζονται διαδοχικά από άλλες που κατανέμονται 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 μερίζονται 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 εκλούονται αργότερα, ενώ εκείνα τα οποία κατακρατούνται ασθενέστερα εκλούονται 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 δώσουν την επιθυμητή ταχύτητα ροής. Για αυτό το λόγο στα σύγχρονα όργανα HPLC, χρησιμοποιούνται αντλίες υψηλής πίεσης και βελτιωμένα συστήματα συνεχούς παροχής διαλύτη. Επίσης για την εισαγωγή του δείγματος στη στήλη, χρησιμοποιείται ένας δειγματολήπτης, όπου η εισαγωγή του δείγματος στο ρεύμα της κινητής φάσης μέσα στη στήλη γίνεται αυτόματα με εγχυτήρες βρόχου.

Ο εντοπισμός των διαχωρισμένων ενώσεων πλέον δεν μπορεί να γίνει με γυμνό μάτι, και για αυτό χρησιμοποιούνται ανιχνευτές. Ένας κατάλληλος ανιχνευτής έχει την ικανότητα να ανιχνεύει την παρουσία μιας ένωσης και να στείλει αντίστοιχο ηλεκτρικό σήμα σε έναν υπολογιστή. Μία επιλογή γίνεται μεταξύ πολλών διαφορετικών τύπων ανιχνευτών, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά και τις συγκεντρώσεις των ενώσεων που πρέπει να διαχωριστούν και να αναλυθούν.

Η κινητή φάση εξέρχεται από τον ανιχνευτή και συλλέγεται ή αποστέλλεται στα απόβλητα.

4.3. Οργανολογία[48,50,51]

Ένα τυπικό σύστημα υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης απαρτίζεται από τα εξής κύρια τμήματα:

1. Φιάλες διαλυτών, στις οποίες φυλάσσονται οι διαλύτες ή τα μίγματα διαλυτών, που αποτελούν την κινητή φάση.

2. Σύστημα απαέρωσης διαλυτών, το οποίο έχει ως σκοπό, να απομακρύνει τον διαλυμένο αέρα που βρίσκεται στην κινητή φάση. Κατά την εφαρμογή πίεσης, δημιουργούνται φυσαλίδες όταν υπάρχει διαλυμένος αέρας στην κινητή φάση, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν αστάθεια στην πίεση του συστήματος, ανομοιογένεια στην ταχύτητα ροής της κινητής φάσης και αύξηση του θορύβου της γραμμής βάσης, έχοντας ως αποτέλεσμα τη μείωση της ευαισθησίας του οργάνου.

3. Σύστημα ανάμιξης διαλυτών, με το οποίο ελέγχεται και πραγματοποιείται η ανάμιξη διαλυτών (με χρήση κατάλληλης βαλβίδας), όταν το σύστημα έκλουσης αποτελείται από μίγμα διαλυτών, τόσο σε ισοκρατικό, όσο και σε βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης.

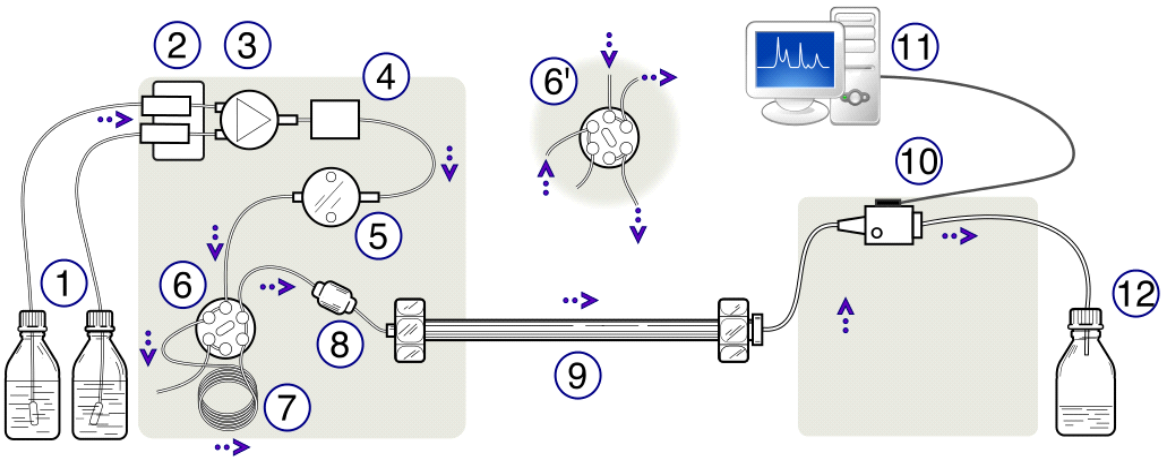
4. Σύστημα άντλησης, το οποίο αποτελεί το μέσο προώθησης της κινητής φάσης αναγκάζοντάς τη να διέλθει από τη στήλη κάτω από συνθήκες υψηλής πίεσης. Ο τύπος της παλινδρομικής αντλίας χρησιμοποιείται κατά κόρο στα σύγχρονα όργανα.

5. Σύστημα εισαγωγής δείγματος, το οποίο αποτελεί διατάξεις με βαθμονομημένους βρόχους (loop), αυστηρά καθοριζόμενου σταθερού ή μεταβλητού όγκου.

6. Αναλυτική στήλη, η οποία αποτελεί το πιο σημαντικό τμήμα ενός συστήματος HPLC, αφού μέσα σε αυτήν πραγματοποιείται ο χρωματογραφικός διαχωρισμός

7. Ανιχνευτής, ο οποίος αποτελεί κρίσιμο τμήμα 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.

8. Καταγραφέας – σύστημα επεξεργασίας αποτελεσμάτων, με τα οποία καταγράφεται, αποθηκεύεται, επεξεργάζεται και ύστερα ποσοτικοποιείται το σήμα που λαμβάνεται από τον ανιχνευτή. Τα σύγχρονα συστήματα διαθέτουν ηλεκτρονικούς υπολογιστές για την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων.



Εικόνα 4.2. Διάταξη ενός συστήματος HPLC. (1) Solvent reservoirs, (2) Solvent degasser, (3) Gradient valve, (4) Mixing vessel for delivery of the mobile phase, (5) High-pressure pump, (6) Switching valve in "inject position", (6') Switching valve in "load position", (7) Sample injection loop, (8) Pre-column (guard column), (9) Analytical column, (10) Detector (i.e. IR, UV), (11) Data acquisition, (12) Waste or fraction collector.

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

4.4. Βασικές αρχές και παράμετροι χρωματογραφίας[48-50,52]

4.4.1. Χρόνος Κατακράτησης (t_R) - Παράγοντας Κατακράτησης (k')

Ως χρόνος κατακράτησης t_R ή Rt, ορίζεται ο χρόνος που χρειάζεται από τη στιγμή που εισάγεται το δείγμα, μέχρι τη στιγμή που η κορυφή της ουσίας φτάνει στον ανιχνευτή. Ο χρόνος κατακράτησης εξαρτάται από την ταχύτητα ροής, τις διαστάσεις της στήλης και από άλλες παραμέτρους. Ένας άλλος τρόπος με τον οποίο εκφράζεται η κατακράτηση μιας ουσίας στη χρωματογραφική στήλη είναι ο παράγοντας κατακράτησης (ή χωρητικότητας). Ο παράγοντας κατακράτησης ισούται με τον λόγο του χρόνου που παραμένει η ουσία Α στη στατική φάση προς τον χρόνο που αυτή παραμένει στην κινητή φάση:

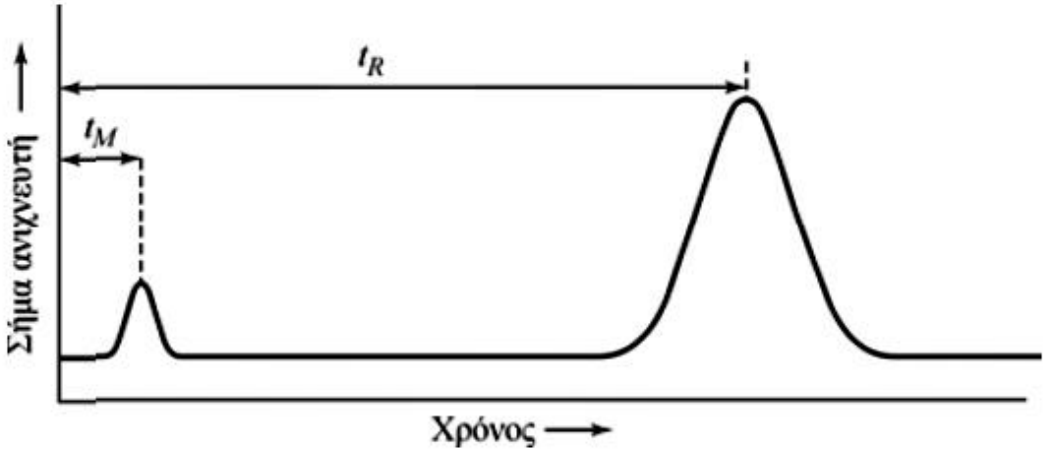
$$k' = (t_R - t_M)/t_M \quad (4.1)$$

όπου t_M ο χρόνος ανάσχεσης μιας μη κατακρατούμενης ουσίας (νεκρός χρόνος) και t_R - t_M ο ανηγμένος χρόνος ανάσχεσης (t_R').

Ο παράγοντας χωρητικότητας μετρά πόσες φορές περισσότερο κατακρατείται ο αναλύτης, σε σχέση με μία μη κατακρατούμενη ουσία. Ξαναγράφοντας την προηγούμενη εξίσωση, παίρνουμε:

$$t_R = t_M(1 + k') = t_M + t_M k \quad (4.2)$$

Επομένως ο χρόνος κατακράτησης είναι ανάλογος του k΄. Όταν k'<1, η έκλουση πραγματοποιείται ταχύτατα και δεν επιτυγχάνεται ικανοποιητικός διαχωρισμός, ενώ όταν k'>20, οι χρόνοι έκλουσης καθίστανται υπερβολικά μεγάλοι.



Εικόνα 4.3. Χρόνοι Ανάσχεσης

4.4.2. Όγκος ανάσχεσης

'Ογκος ανάσχεσης (V_R) ονομάζεται ο όγκος της κινητής φάσης που χρειάζεται να διέλθει από τη στατική φάση για να εκλουστεί μια ουσία, ενώ ο όγκος της κινητής φάσης στη στατική φάση (στήλη) ονομάζεται νεκρός όγκος (V_M). Υπάρχει

επίσης και ανηγμένος όγκος (V'R). Οι όγκοι αυτοί υπολογίζονται από τις παρακάτω σχέσεις:

$V_R=t_RF$ **(4.3)**

$V_M=t_MF$ **(4.4)**

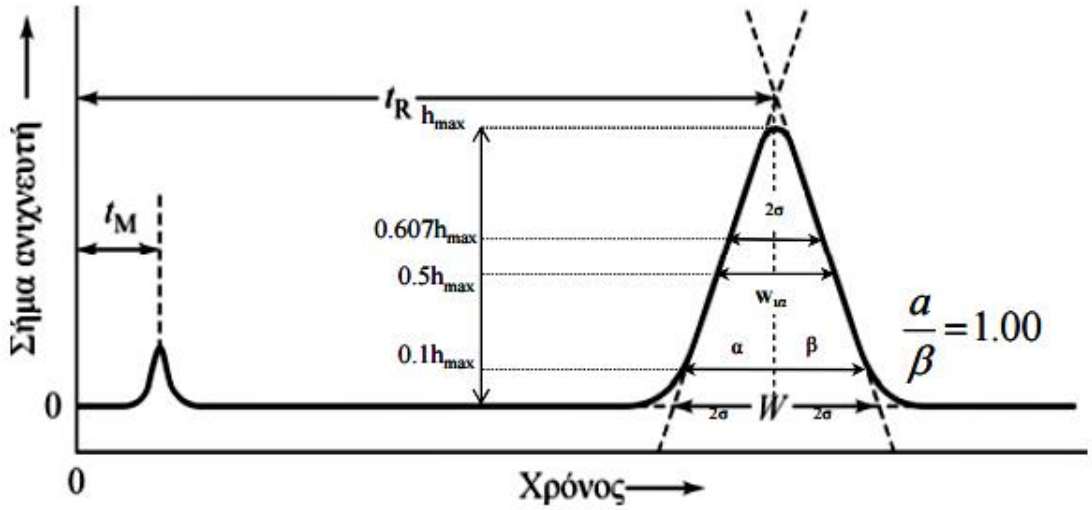
$V'_R=t_RF$ **(4.5)**

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

4.4.3. Εύρος και ημιεύρος κορυφής

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

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



Εικόνα 4.4. Εύρος (W) κορυφής σήματος από χρωματογράφημα

4.4.4. Εκλεκτικότητα (α)

Η εκλεκτικότητα δηλώνει τη δυνατότητα της χρωματογραφικής στήλης να διαχωρίσει δυο συστατικά του μίγματος, μεταξύ τους. Αποτελεί, δηλαδή ποσοτικό μέτρο της εκλεκτικότητας της χρωματογραφικής στήλης. Για δύο ουσίες Α και Β ο παράγοντας εκλεκτικότητας ορίζεται ως:

$$\alpha = K_B / K_A \quad (4.6)$$

όπου ΚΑ και ΚΒ οι συντελεστές κατανομής των ουσιών. Η ουσία Β είναι ισχυρότερα κατακρατούμενη. Άρα ο παράγοντας εκλεκτικότητας είναι πάντα μεγαλύτερος της μονάδας. Η εκλεκτικότητα πρέπει να είναι >1,0 για επαρκή διαχωρισμό κορυφών. Όταν α=1 πρακτικά σημαίνει ότι οι ουσίες συνεκλούονται (δεν επιτυγχάνεται διαχωρισμός). Ο παράγοντας εκλεκτικότητας προσδιορίζεται από δεδομένα κατακράτησης σύμφωνα με την παρακάτω σχέση:

$$\alpha = k'_B / k'_A = (tR_B - t_0) / (tR_A - t_0) \quad (4.7)$$

όπου k' ο παράγοντας κατακράτησης και t_R ο χρόνος κατακράτησης. Η τιμή του παράγοντα εκλεκτικότητας εξαρτάται από τη φύση της στατικής και της κινητής φάσης, την αναλογία των φάσεων και τη θερμοκρασία της στήλης.

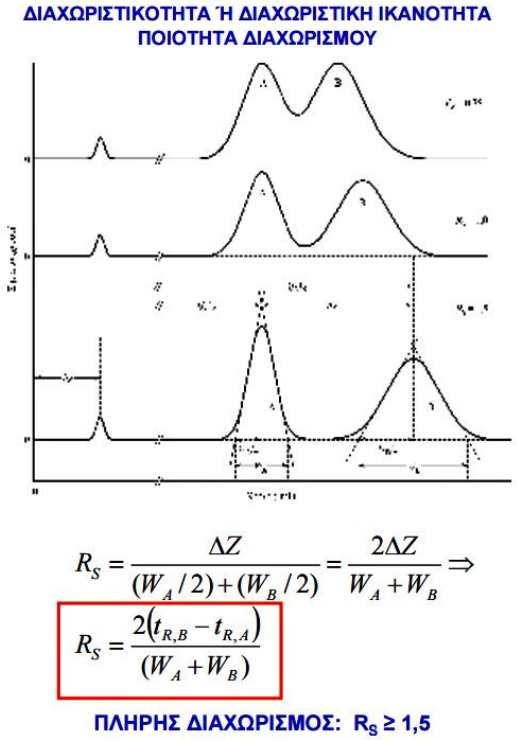
4.4.5. Διαχωριστική ικανότητα (Rs)

Οι αναλύσεις HPLC, έχουν ως στόχο το διαχωρισμό ενός ή περισσότερων αναλύτων από άλλα συστατικά του δείγματος, ώστε να ληφθούν ποσοτικές πληροφορίες για κάθε αναλύτη. Η διαχωριστική ικανότητα (resolution) ή διαχωριστότητα Rs μιας στήλης, αποτελεί ένα ποσοτικό μέτρο της ικανότητάς της να διαχωρίσει δύο αναλύτες. Σε σύγκριση με τον παράγοντα εκλεκτικότητας (α), είναι πιο ακριβές μέγεθος ελέγχου του διαχωρισμού δύο αναλυτών , επειδή ο (α) δεν περιέχει καμία πληροφορία σχετικά με το εύρος των κορυφών. Ορίζεται ως εξής:

$$R_S = 2(tR_1 - tR_2) / (w_1 + w_2)$$

όπου w_1 και w_2 τα εύρη των κορυφών στη γραμμή βάσης. Μηδενική τιμή Rs, σημαίνει πλήρη συνέκλουση ουσιών, Rs=1 δείχνει ότι επιτυγχάνεται μερικός διαχωρισμός, ενώ Rs=1,5 υποδεικνύει ότι επιτυγχάνεται διαχωρισμός «γραμμής βάσης». Ο στόχος των αναλύσεων είναι να επιτευχθεί διαχωρισμός γραμμής

βάσης για όλους τους αναλύτες. Τιμή Rs>2,0 είναι επιθυμητή, επειδή κάτι τέτοιο υποδεικνύει ανθεκτικότερο διαχωρισμό και καλύτερη ποσοτικοποίηση.



Εικόνα 4.5. Διαχωρισμός ουσιών

4.4.6. Αποδοτικότητα (N)

Αποτελεί μέτρο της χρωματογραφικής διεύρυνσης. Ο αριθμός των θεωρητικών πλακών (N) της στήλης, συνήθως, υπολογίζεται με χρήση της παρακάτω εξίσωσης:

$$N = 16\,(t_R/w)^2 = 5{,}54\,(t_R/w_{1/2})^2 \qquad \textbf{(4.8)}$$

Με w συμβολίζεται το εύρος στη βάση της κορυφής και με $w_{0,5}$ το εύρος στο μισό του ύψους της κορυφής. Εξαρτάται κυρίως από κινητικές παραμέτρους, όπως η διάχυση των μορίων, οι ιδιότητες της στήλης (εσωτερική διάμετρος, διάμετρος και σχήμα σωματιδίων πλήρωσης) και η ταχύτητα ροής. Η εξάρτησή της από τις παραμέτρους αυτές περιγράφεται από την εξίσωση Van Deempter:

$$H = A + B/u + C^{*}u = A + B/u + (C_S + C_M)u \qquad \textbf{(4.9)}$$

και τη σχέση:

$$N = L / H \quad \textbf{(4.10)}$$

Όπου:

H : ύψος ισοδύναμο προς μια θεωρητική πλάκα,

L : μήκος της στήλης,

A : συντελεστής στροβιλώδους διάχυσης,

B : συντελεστής διαμήκους διάχυσης,

C : συντελεστής μεταφοράς μάζας,

C_S : συντελεστής μεταφοράς μάζας στη στατική φάση,

C_M : συντελεστής μεταφοράς μάζας στην κινητή φάση,

u : ταχύτητα ροής της κινητής φάσης.

4.4.7. Παραμόρφωση χρωματογραφικής ζώνης

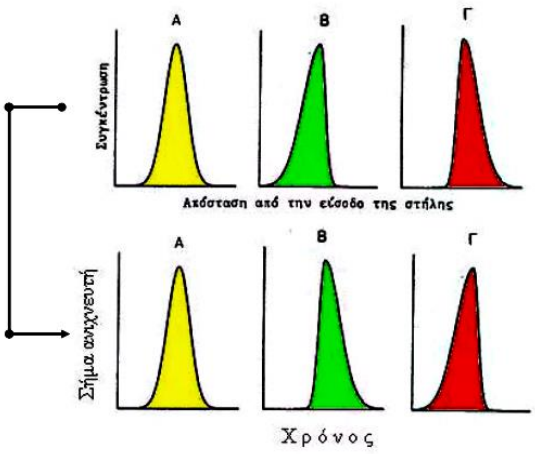
Το σχήμα της ζώνης εξαρτάται από την ιδανική ή όχι συμπεριφορά του συντελεστή κατανομής. Αν η τιμή του K είναι σταθερή, τότε η ζώνη είναι συμμετρική κι έχει το σχήμα κανονικής καμπύλης κατανομής (ή Gauss). Αν η τιμή του K ελαττώνεται όταν η συγκέντρωση της ουσίας στην κινητή φάση αυξάνεται, τότε η ζώνη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

Η παραμόρφωση ζώνης δεν είναι επιθυμητή επειδή:

- Οι ασύμμετρες κορυφές διευρύνονται ταχύτερα
- Η μεγάλη διεύρυνση κορυφών σημαίνει μη ικανοποιητικό διαχωρισμό
- Οι πολύ διευρυμένες κορυφές δεν είναι κατάλληλες για ποσοτική ανάλυση

Γενικές παρατηρήσεις για τη διεύρυνση κορυφών:

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



Εικόνα 4.6. Σήμα ανιχνευτή σε περιπτώσεις παραμόρφωσης

4.4.8. Βελτιστοποίηση διαχωρισμών

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

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

Κατά το διαχωρισμό μιγμάτων που περιέχουν δύο ή περισσότερες ουσίες με παρόμοιους παράγοντες κατακράτησης, η ρύθμιση των παραμέτρων σε μία σταθερή τιμή κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, ίσως να έχει ως αποτέλεσμα υπερβολικά μεγάλο χρόνο ανάλυσης άρα και αυξημένη διεύρυνση των κορυφών των 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 διαχωριστικότητα σε υψηλά επίπεδα.

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

4.5. Είδη υγροχρωματογραφίας[46,48,51,52]

Το είδος της εφαρμοζόμενης χρωματογραφίας, καθορίζεται κυρίως από τη φύση του πληρωτικού υλικού και τον τρόπο αλληλεπίδρασης των αναλύτων με αυτό. Τα διάφορα είδη υγροχρωματογραφίας, είναι τα εξής:

4.5.1. Χρωματογραφία Προσρόφησης

Ο διαχωρισμός των διαφόρων ουσιών βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό προσρόφησης στη στατική φάση. Οι κυριότερες αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι ηλεκτροστατικής φύσης. Η χρωματογραφία προσρόφησης βρίσκει εφαρμογή στο διαχωρισμό ουσιών με παρόμοια δομή, αλλά με διαφορετική πολικότητα.

4.5.2. Χρωματογραφία Κατανομής

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

- Χρωματογραφία Κανονικής Φάσης : Εδώ η στατική φάση (συνήθως SiO_2 ή Al_2O_3) είναι πολικότερη από την κινητή, η οποία αποτελείται από μη πολικούς διαλύτες, όπως εξάνιο, χλωροφόρμιο.

- Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης : Εδώ, η στατική φάση, που είναι λιγότερο πολική της κινητής, αποτελείται από οξείδιο πυριτίου συζευγμένο με διάφορες ομάδες, όπως αλκύλια, φαινύλιο, διόλες, αμινομάδες, ενώ η κινητή φάση αποτελείται από μείγματα οργανικών διαλυτών με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα και νερό.

4.5.3. Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής

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

4.5.4. Χρωματογραφία Συγγένειας

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

4.6. Ποσοτικοποίηση στη χρωματογραφική ανάλυση[48,51,52]

Με τη χρήση της HPLC, είναι δυνατή η πραγματοποίηση ποσοτικών προσδιορισμών στα δείγματα που αναλύονται. Αυτή είναι και μια από τις σημαντικότερες εφαρμογές της τεχνικής. Σε τέτοιους προσδιορισμούς, χρησιμοποιούνται διαλύματα αναφοράς γνωστής με ακρίβεια συγκέντρωσης (πρότυπα διαλύματα). Οι προσδιορισμοί γίνονται στην περιοχή, όπου ο ανιχνευτής παρουσιάζει γραμμικότητα. Το σήμα του ανιχνευτή υπολογίζεται, είτε με μέτρηση του εμβαδού της χρωματογραφικής κορυφής, είτε με μέτρηση του ύψους της. Ο προσδιορισμός του ύψους γίνεται με μέτρηση της απόστασης του μεγίστου της χρωματογραφικής κορυφής από τη γραμμή βάσης. Σε πολύ οξείες κορυφές οι μετρήσεις βάσει του ύψους είναι ιδιαίτερα ακριβείς. Όταν όμως οι κορυφές είναι διευρυμένες καλύτερα αποτελέσματα λαμβάνονται με τον προσδιορισμό του εμβαδού. Ο τελευταίος στα σύγχρονα συστήματα επεξεργασίας η μέτρηση, τόσο του ύψους, όσο και της κορυφής γίνεται με ηλεκτρονική ολοκλήρωση και τα λαμβανόμενα αποτελέσματα είναι ακριβέστερα και περισσότερο επαναλήψιμα.

Οι κυριότερες μέθοδοι ποσοτικοποιήσεως στην HPLC είναι οι εξής:

4.6.1. Τεχνική ενός εξωτερικού προτύπου

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

$$C_\delta = C_s(A_\delta/A_s) \qquad (4.11)$$

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

4.6.2. Τεχνική πολλαπλών εξωτερικών προτύπων (καμπύλης αναφοράς)

Η τεχνική αυτή βασίζεται στη βαθμονόμηση της διατάξεως μετρήσεως με τη

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

$$P = bC + \alpha + ei \quad \textbf{(4.12)}$$

Ο συντελεστής b (κλίση διαγράμματος βαθμονομήσεως) εκφράζει την ευαισθησία της μεθόδου. Στόχος της μεθόδου ελαχίστων τετραγώνων, με την οποία χαράσσεται το διάγραμμα παλινδρόμησης, είναι να βρεθούν οι εκτιμήτριες ποσότητες των παραμέτρων b και a, ώστε το άθροισμα των τετραγώνων των αποκλίσεων ei να τείνει στο μηδέν. Η ευθεία παλινδρόμησης είναι προτιμότερο να διέρχεται από την αρχή των αξόνων και η κλίση της να παραμένει σταθερή, ώστε να δύναται να χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

4.6.3. Τεχνική προσθήκης γνωστής ποσότητας

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

$$P' = k(Co + \Delta C) \quad \textbf{(4.13)}$$

Στη συνέχεια χαράσσεται ευθεία του τύπου:

$$Pi = a + b\Delta Ci \quad \textbf{(4.14)}$$

4.6.4. Τεχνική εσωτερικού προτύπου (internal standard)

Με την τεχνική αυτή επιλέγεται μια ουσία με καλή διαχωριστότητα από τα συστατικά του δείγματος, παρόμοιας χημικής δομής και χρόνου ανάσχεσης με

τον αναλύτη και σταθερή κατά τις πειραματικές διεργασίες. Αναλύονται διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης του εσωτερικού προτύπου και πρότυπα διαλύματα του αναλύτη, καθώς και μίγματα των δύο αυτών ουσιών σε γνωστές συγκεντρώσεις και ελέγχεται η γραμμικότητα των μετρήσεων. Το εσωτερικό πρότυπο προστίθεται σε σταθερή συγκέντρωση, τόσο στα πρότυπα διαλύματα, όσο και στα άγνωστης συγκέντρωσης δείγματα. Σχεδιάζεται διάγραμμα βαθμονόμησης, στο οποίο λαμβάνεται ως αναλυτικό σήμα ο λόγος του αναλυτικού σήματος του αναλύτη προς εκείνο του εσωτερικού προτύπου. Η χρήση του εσωτερικού προτύπου ενδείκνυται για δείγματα που απαιτούν προκατεργασία, όπου εξαιτίας της παρόμοιας συμπεριφοράς του με τον αναλύτη «διορθώνει» τις τυχόν απώλειες, ενώ επιπλέον διορθώνει σφάλματα προκαλούμενα από την ολίσθηση του οργανολογικού συστήματος.

4.6.5. Μέθοδος κανονικοποιήσεως (normalization)

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

$$X_i(\%) = (A_{xi}/\Sigma A_{xi})100 \quad \textbf{(4.15)}$$

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

$$Rfi = (A_A/A_i)/(C_A/C_i) \quad \textbf{(4.16)}$$

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

$$X_i\% = A_{Xi}R_{Fi}/\Sigma(A_{Xi}R_{Fi}) \quad \textbf{(4.17)}$$

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^{ο}: ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ HPLC

5.1 Ορισμός επικύρωσης

Η επικύρωση, σύμφωνα με τους επικρατέστερους ορισμούς, είναι η επιβεβαίωση μέσω εξέτασης και παροχής αντικειμενικών αποδείξεων, ότι ικανοποιούνται οι ιδιαίτερες απαιτήσεις για μια συγκεκριμένη, σκοπούμενη χρήση. Για να πραγματοποιηθούν οι χημικοί και φαρμακοτεχνικοί έλεγχοι των φαρμακευτικών σκευασμάτων, θα πρέπει να αναπτυχθούν και να επικυρωθούν κατάλληλες μέθοδοι. Κατά την διαδικασία της επικύρωσης μιας μεθόδου, γίνεται αξιολόγηση των χαρακτηριστικών ποιότητας της, μέσω πειραματικής τεκμηρίωσης. Εξετάζεται ο βαθμός με τον οποίο ανταποκρίνεται στις προδιαγραφές (specifications), ώστε να αποδειχθεί ότι είναι κατάλληλη για τον σκοπό για τον οποίο προορίζεται (fitness for purpose)[53].

Υπάρχουν διεθνείς οδηγίες (guidelines) οι οποίες δίνουν κατευθυντήριες γραμμές για την πραγματοποίηση επικύρωσης μεθόδων. Η ποσότητα και το είδος των εργασιών που απαιτούνται για κάθε μέθοδο ποικίλλει ανάλογα με το σκοπό της μεθόδου.

Οι αναλυτικές δοκιμές μπορούν να διακριθούν στους παρακάτω κύριους τύπους:

1. Δοκιμές ταυτοποίησης, οι οποίες αποσκοπούν στην επιβεβαίωση της ταυτότητας της δραστικής σε ένα δείγμα.
2. Δοκιμές προσμίξεων, οι οποίες μπορεί να είναι, είτε ποσοτικοί προσδιορισμοί, είτε δοκιμές ελέγχου ορίων των προσμίξεων. Αντανακλούν με ακρίβεια τα χαρακτηριστικά καθαρότητας της δραστικής του δείγματος.
3.Δοκιμές κύριας ουσίας (δραστικής), που προορίζονται για τη μέτρηση του αναλύτη σε ένα δεδομένο δείγμα (περιλαμβάνονται και οι δοκιμές διαλυτότητας (dissolution) και οι δοκιμές περιεχομένου (assay)).

Ο *πίνακας 5.1* που ακολουθεί συγκεντρώνει τα χαρακτηριστικά που θα πρέπει να εξετάζονται κατά την επικύρωση κάθε ενός από τους παραπάνω τύπους δοκιμών. Σημειώνεται πως η ανθεκτικότητα δεν αναφέρεται στον πίνακα, αλλά

θα πρέπει να εξετάζεται σε κατάλληλο στάδιο κατά την ανάπτυξη/βελτιστοποίηση της μεθόδου.

Πίνακας 5.1: Χαρακτηριστικά επικύρωσης που εξετάζονται σε κάθε τύπο δοκιμής

Χαρακτηριστικά Επικύρωσης της ICH ως προς Τύπο Αναλυτικής Διαδικασίας

Type of Analytical Procedure	Identification	Impurity Testing: Quantitative	Impurity Testing: Limit Tests	Assay
Accuracy	No	Yes	No	Yes
Precision				
Repeatability	No	Yes	No	Yes
Interm. precision	No	Yes	No	Yes
Specificity	Yes	Yes	Yes	Yes
LOD	No	No	Yes	No
LOQ	No	Yes	No	No
Linearity	No	Yes	No	Yes
Range	No	Yes	No	Yes

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. Οι αναλυτικές παράμετροι οι οποίες μελετώνται κατά την αξιολόγηση της μεθόδου είναι οι παρακάτω:

5.2.1 Ακρίβεια[54]

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

Αναφέρεται στη διαφορά (σφάλμα, error) μεταξύ του μέσου όρου (mean) x_{mean}, μιας σειράς μετρήσεων και της τιμής μ, η οποία γίνεται αποδεκτή ως η αληθή (true) ή ορθή (correct) τιμή της μετρούμενης ποσότητας. Οι κύριοι περιορισμοί στην ακρίβεια προέρχονται 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 αληθή τιμή). Η ακρίβεια ελέγχεται χρησιμοποιώντας τουλάχιστον 9 προσδιορισμούς, σε τρία τουλάχιστον επίπεδα που καλύπτουν την καθοριζόμενη περιοχή συγκεντρώσεων(π.χ. 3 συγκεντρώσεις χ 3 προσδιορισμούς κάθε μία).

5.2.2 Πιστότητα (Precision)[55]

Με τον όρο πιστότητα, αναφερόμαστε στο χαρακτηριστικό της μεθόδου να παρέχει ίδια αποτελέσματα για ένα δείγμα που αναλύεται κάτω από καθορισμένες συνθήκες. Ουσιαστικά, η πιστότητα μπορεί να περιγραφεί ως η ποσότητα που μετρά τη διασπορά των αποτελεσμάτων όταν η αναλυτική μεθοδολογία επαναλαμβάνεται σε ένα δείγμα. Υπάρχουν 3 υποσύνολα της πιστότητας, ανάλογα με τις συνθήκες μέτρησης:

1. Επαναληψιμότητα (Repeatability) : Πρόκειται για την εγγύτητα της συμφωνίας μεταξύ αποτελεσμάτων ανεξάρτητων δοκιμών τα οποία έχουν ληφθεί κάτω από τις ίδιες ακριβώς συνθήκες (δηλ. ίδια μέθοδος ελέγχου, ίδιος αναλυτής, ίδια συσκευή, ίδιο εργαστήριο και βραχύ χρονικό διάστημα). Η επαναληψιμότητα εξαρτάται μόνο από την κατανομή τυχαίων σφαλμάτων. Ο υπολογισμός της επιτυγχάνεται προσδιορίζοντας την τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων των δοκιμών από επαναληπτικές μετρήσεις. Χρησιμοποιώντας αριθμητικούς όρους, μεγάλη τιμή για την τυπική απόκλιση δείχνει φτωχή επαναληψιμότητα. Τα μέτρα της επαναληψιμότητας εξαρτώνται σε κρίσιμο βαθμό από τη σταθερότητα των συνθηκών κάτω από τις οποίες γίνονται οι μετρήσεις. Η μέγιστη ανεκτή διαφορά δύο μετρήσεων που διεξάγονται σε συνθήκες επαναληψιμότητας ονομάζεται όριο επαναληψιμότητας (r) και ισούται με 2,8 x SD_r.

2. Ενδιάμεση πιστότητα (Intermediate Precision) ή ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα. Εκφράζει τη διασπορά μέσα στο ίδιο το εργαστήριο σε όσο το δυνατό διαφορετικές συνθήκες (χρόνος, χειριστές, όργανα, παρτίδες

αντιδραστηρίων). Η μέγιστη ανεκτή διαφορά δύο μετρήσεων σε συνθήκες ενδιάμεσης πιστότητας λέγεται όριο ενδιάμεσης πιστότητας (R) και ισούται με 2 x SD_R.

3. Αναπαραγωγιμότητα (Reproductibility). Εκφράζει το μέτρο της διασποράς μεταξύ αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με την ίδια μέθοδο στο ίδιο δείγμα, κάτω από διαφορετικές συνθήκες, δηλ. διαφορετικός αναλυτής, διαφορετικές συσκευές, διαφορετικές παρτίδες αντιδραστηρίων, διαφορετικούς χρόνους και σε διαφορετικό εργαστήριο.

5.2.3 Γραμμικότητα

Πρόκειται για την εξάρτηση της απόκρισης του ανιχνευτή από την εισαγόμενη συγκέντρωση ή απόλυτη ποσότητα της ουσίας. Προσδιορίζεται με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων και εκφράζεται με το συντελεστή γραμμικής συσχέτισης. Ορθότερα αναφέρεται στην καλή προσαρμογή του γραμμικού μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα της καμπύλης αναφοράς. Εξετάζεται συνήθως, σε όλο το εύρος της περιοχής συγκεντρώσεων (range) της αναλυτικής μεθόδου και αποδεικνύεται με οπτική εξέταση του διαγράμματος αναλυτικού σήματος ως προς τη συγκέντρωση ή την περιεκτικότητα του αναλύτη.

5.2.4 Εύρος γραμμικής περιοχής

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

5.2.5 Ευαισθησία[56]

Με τον όρο ευαισθησία ορίζουμε το λόγο σήματος προς τη μάζα, ο οποίος δίνεται από την κλίση της ευθείας στο διάγραμμα της καμπύλης αναφοράς. Η περιοχή στην οποία υπάρχει ευαισθησία και έχει μια σαφή τιμή, καλείται **δυναμική περιοχή** (dynamic range). Αντιθέτως, η περιοχή στην οποία η ευαισθησία έχει σταθερή τιμή ονομάζεται **γραμμική δυναμική περιοχή** (linear dynamic range).

5.2.6 Όριο ανίχνευσης (Limit of Detection-LOD)[57]

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

$$xL = xbl + ksbl \quad \textbf{(5.1)}$$

όπου :

xbl: η μέση τιμή των λευκών μετρήσεων,

sbl: η τυπική απόκλιση των μετρήσεων του λευκού δείγματος,

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

Σε πολλές περιπτώσεις μεθόδων που έχουν γραμμή βάσης (π.χ. HPLC) το όριο ανίχνευσης προσδιορίζεται ως η συγκέντρωση/ ποσότητα για την οποία ο λόγος σήματος/ θορύβου ισούται με 3,3. Ο συγκεκριμένος τρόπος έκφρασης είναι επαρκής κατά τη διάρκεια επικύρωσης της μεθόδου, καθώς παρέχει ένδειξη της συγκέντρωσης στην οποία η ανίχνευση γίνεται πιο προβληματική. Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι σε ιδανικές συνθήκες το όριο ανίχνευσης της μεθόδου το οποίο επιλέγεται θα πρέπει να είναι τουλάχιστον το 1/10 της συγκέντρωσης που πρόκειται να μετρηθεί.

5.2.7 Όριο ποσοτικοποίησης (Limit of Quantitation-LOQ)[58]

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

Προσδιορίζεται με μεθόδους ανάλογες του LOD.

5.2.8 Ανθεκτικότητα (Ruggedness)[59]

Αντιστοιχεί στην ενδιάμεση πιστότητα της μεθόδου και εκφράζει την ικανότητα της μεθόδου να παρέχει ίδια αποτελέσματα για ένα δείγμα με όσο το δυνατό διαφορετικές συνθήκες. Εξετάζεται στη φάση της ανάπτυξης της μεθόδου και περιγράφει την ανθεκτικότητά της σε προσχεδιασμένες σκοπούμενες μικρομεταβολές των πειραματικών παραμέτρων. Από τα αποτελέσματα της ανθεκτικότητας θα διαμορφωθούν και οι έλεγχοι καταλληλότητας συστήματος για να εξασφαλισθεί η αξιοπιστία της μεθόδου κατά την εφαρμογή της.

5.2.9 Αντοχή (Robustness)[60]

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

5.2.10 Εκλεκτικότητα (Selectivity)[61]

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

5.2.11 Ειδικότητα (Specificity)[61]

Η εξειδίκευση, είναι παράμετρος η οποία μας εξασφαλίζει ότι το σήμα το οποίο λαμβάνεται, προέρχεται από την ένωση η οποία μας ενδιαφέρει και δεν υπάρχει καμία παρεμπόδιση από έκδοχα, προϊόντα αποικοδόμησης ή προσμίξεις. Εκφράζει, λοιπόν, την παρεμπόδιση στον προσδιορισμό ενός συστατικού σε ένα δείγμα από τα άλλα συστατικά του μείγματος.

Η έρευνα ειδικότητας απαιτείται, κυρίως, στους ελέγχους (δοκιμασίες) α) ταυτοποίησης, που ελέγχεται η ικανότητα διάκρισης μεταξύ ενώσεων παραπλήσιας δομής, β) προσδιορισμού προσμίξεων και γ) ποσοτικών προσδιορισμών. Η πορεία για την απόδειξη της ειδικότητας εξαρτάται από το σκοπό της μεθόδου, ενώ εάν δεν αποδειχθεί ειδικότητα, συνιστάται συνδυασμός δύο ή περισσότερων αναλυτικών μεθόδων.

5.3. Απαραίτητες προδιαγραφές για την επιτυχή εφαρμογή μιας μεθόδου HPLC

Η επιτυχή εφαρμογή μιας μεθόδου υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης-πίεσης (HPLC) εξαρτάται από τους ακόλουθους παράγοντες:

1. Δειγματοληψία, αποθήκευση δειγμάτων, προετοιμασία δειγμάτων

2. Δείγμα διαλύτη

3. Παρασκευή κινητής φάσης, έλεγχος ποιότητας του αντιδραστηρίου

4. Έλεγχος της θερμοκρασίας της στήλης

5. Διαστάσεις της στήλης (στατικής φάσης)

6. Έλεγχος της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης

7. Λεπτομερής ταυτοποίηση της στατικής φάσης

8. Δεδομένα ανιχνευτή

9. Παράμετροι ολοκλήρωσης

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6ο: ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ, ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

6.1 Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν

Παρακάτω περιγράφονται εκτενώς τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον έλεγχο ποιότητας των δισκίων **Minocycline®**. Η ύπαρξή τους σε ένα αναλυτικό εργαστήριο αποτελεί άμεση προϋπόθεση για την επιτυχή ολοκλήρωση των μελετών και την καταγραφή των πειραματικών δεδομένων.

6.1.1 Χρωματογραφικό σύστημα HPLC[62]

Η χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανήκει στις χρωματογραφικές τεχνικές, άρα ο διαχωρισμός είναι αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης μιας στατικής και μιας κινητής φάσης. Στην HPLC, το δείγμα εισάγεται στην κορυφή της στήλης και με την βοήθεια της κινητής φάσης, τα συστατικά του μετακινούνται με τη μορφή ζωνών και τελικά εκλούονται το ένα μετά το άλλο. Οι διαχωριζόμενες ουσίες κατανέμονται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης, με αποτέλεσμα να μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της στήλης.

Κατά τον έλεγχο ποιότητας δισκίων **Minocycline®**, χρησιμοποιήθηκαν τρία χρωματογραφικά συστήματα HPLC σειράς Prominence της εταιρείας Shimadzu, τα οποία απαρτίζονταν από έναν απαερωτή κινητής φάσης DGU-20A$_5$, μία αντλία δύο πιστονιών τύπου LC-20 AD, έναν αυτόματο δειγματολήπτη SIL-20AC$_{HT}$, ένα φούρνο για τη ρύθμιση της θερμοκρασίας της στήλης τύπου CTO-20AC και τέλος έναν ανιχνευτή φωτοδιόδων DAD SPD-M20 για την περιοχή του ορατού και του υπεριώδους, εξοπλισμένο με λυχνίες βολφραμίου (W) και δευτερίου (D2). (*Εικόνα 6.1*)

Εικόνα 6.1: Χρωματογράφος HPLC της εταιρείας Shimadzu

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

6.1.2 Αναλυτικές στήλες

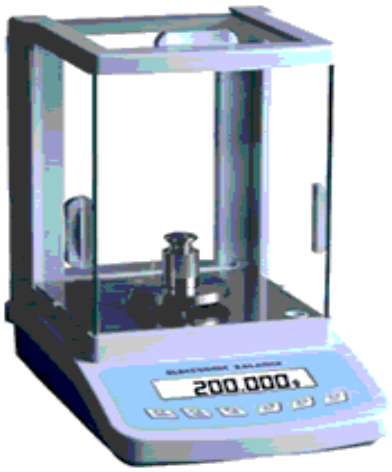
Για την ανάλυση των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική στήλη Zorbax Rx C8, 150 x 4,6 mm, 5μm, DUPONT.

6.1.3 Συσκευή παραγωγής νερού υψηλής καθαρότητας

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

6.1.4 Αναλυτικός ζυγός

Ο αναλυτικός ζυγός είναι ένα ευρέως διαδεδομένο όργανο μέτρησης της μάζας. Για ζυγίσεις ποσοτήτων μεγαλύτερες από 10 mg, χρησιμοποιήθηκε ζυγός AUW320 4 δεκαδικών ψηφίων της εταιρείας Shimadzu, ενώ για ζυγίσεις μικρότερων ποσοτήτων, χρησιμοποιήθηκε ζυγός Sartorius 5 δεκαδικών ψηφίων. (*Εικόνα 6.2*)



Εικόνα 6.2: Αναλυτικός ζυγός της εταιρείας Shimadzu

***Προφυλάξεις κατά τη χρήση αναλυτικού ζυγού*:**

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

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

Υπάρχουν ωστόσο, πολυάριθμοι μέθοδοι ελέγχου των αναλυτικών-εργαστηριακών ζυγών, οι κυριότερες εκ των οποίων είναι:

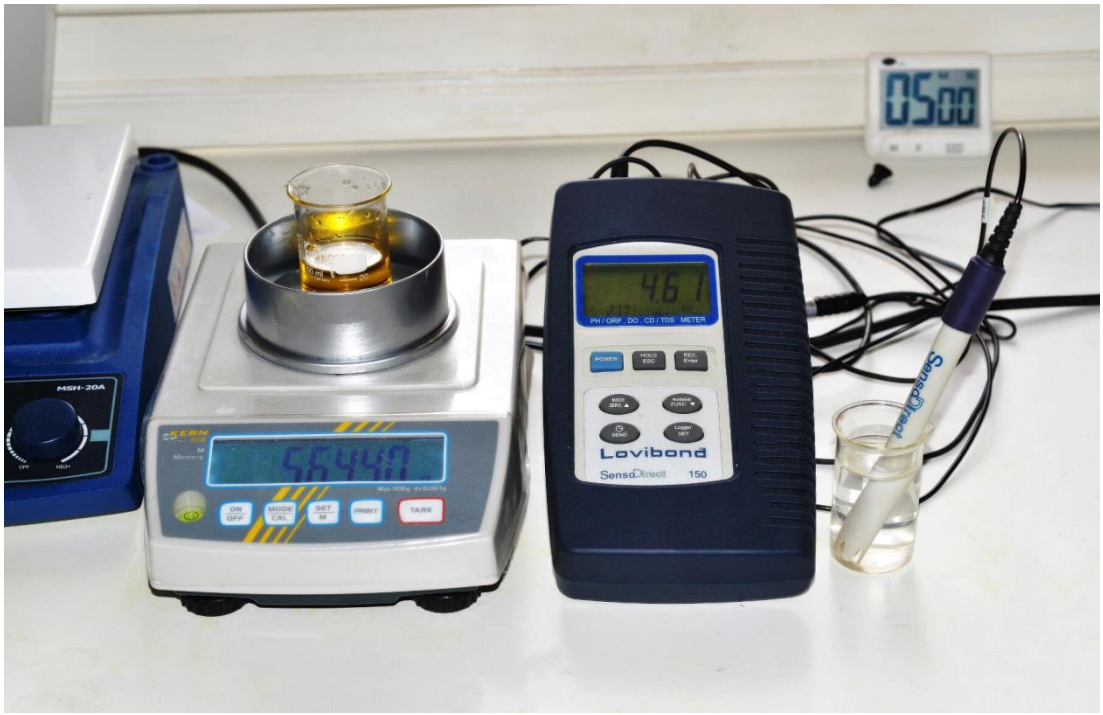
1. Επίδραση του χρόνου προθέρμανσης. Με τον έλεγχο αυτό, υπολογίζουμε τον μέγιστο χρόνο που χρειάζεται ο ηλεκτρονικός ζυγός για να μας δίνει σταθερές τιμές/μετρήσεις.
2. Έκκεντρη τοποθέτηση του βάρους. Ελέγχεται η μέγιστη επί τοις % διαφορά βάρους όταν τοποθετούμε το προς ζύγιση σώμα σε ακραίες θέσεις του δίσκου ζύγισης.
3. Χρόνος σταθεροποίησης. Γίνεται μέτρηση του χρόνου που χρειάζεται ο ζυγός για να δείξει σταθερή ένδειξη κατά την ζύγιση του βάρους.

Όλα τα παραπάνω, οδηγούν σε μετρήσεις βάρους με τη μέγιστη δυνατή ακρίβεια και επαναληψιμότητα, δύο χαρακτηριστικά που συμβαδίζουν με την επιτυχή μελέτη των φαρμακευτικών σκευασμάτων.

6.1.5 Πεχάμετρο

Πεχάμετρο ονομάζεται η συσκευή που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του pH ενός διαλύματος. Η μέτρηση του pH γίνεται με ειδικά ηλεκτρόδια και εφαρμόζεται η αρχή της ποτενσιομετρικής μέτρησης, που προσδιορίζει την ενεργότητα των ιόντων υδρογόνου σε ένα διάλυμα. Γίνεται χρήση ενός ενδεικτικού ηλεκτροδίου και ενός ηλεκτροδίου αναφοράς, με αποτέλεσμα η διαφορά δυναμικού ανάμεσα στα δύο ηλεκτρόδια, έπειτα από βαθμονόμηση, να δίνει το pH.

Κατά την πειραματική πορεία ελέγχου ποιότητας που πραγματοποιήθηκε, χρησιμοποιήθηκε πεχάμετρο Consort C3010 (*Εικόνα 6.3*) της εταιρείας Heach. Βαθμονόμηση του οργάνου γίνεται μία φορά την εβδομάδα με πρότυπα ρυθμιστικά διαλύματα pH 2.0, pH 4.0, pH 7.0 και pH 10.0, ενώ ο έλεγχος καλής λειτουργίας γίνεται στην αρχή κάθε ημέρας με πρότυπα ρυθμιστικά διαλύματα pH 4.0 και pH 7.0.



Εικόνα 6.3: Πεχάμετρο υψηλής ακρίβειας

6.1.6 Συσκευή υπερήχων

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

Εικόνα 6.4: Λουτρό υπερήχων της εταιρείας Branson

6.1.7 Συσκευή διήθησης κινητής φάσης

Η συσκευή διήθησης κινητής φάσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν τύπου AFORA poro 3, με χρήση φίλτρων αναγεννημένης κυτταρίνης (Millipore, Type HVLP) με πόρους διαμέτρου 0,45 μm και συνολική διάμετρο 47 mm.

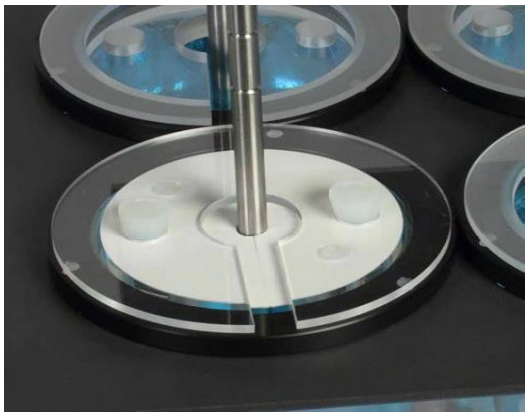
6.1.8 Συσκευή ελέγχου διαλυτότητας των φαρμάκων[63]

Η δοκιμασία διάλυσης των δισκίων των φαρμακευτικών σκευασμάτων παρέχει πληροφορίες σχετικά με τον ρυθμό αποδέσμευσης του φαρμάκου που περιέχεται στα δισκία και μπορεί να συνδεθεί άμεσα με τη βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου αν η απορρόφηση του φαρμάκου καθορίζεται από τον ρυθμό διάλυσής του στον γαστρεντερικό σωλήνα. Ο σκοπός μιας in vitro δοκιμασίας διάλυσης είναι να διαπιστωθεί ότι η αποδέσμευση του φαρμάκου είναι πλήρης (100%) και ότι ο ρυθμός διάλυσης ενός προϊόντος διατηρείται σταθερός από παρτίδα σε παρτίδα.

Η συσκευή διαλυτότητας που χρησιμοποιήθηκε, αποτελείται από 6 δοχεία, ένα θερμόμετρο και εξαρτήματα περιστροφής των σκευασμάτων (πτερύγια - paddles). Τα πτερύγια έχουν αυστηρά καθορισμένες διαστάσεις και είναι κατασκευασμένα από υψηλής ανθεκτικότητας ανοξείδωτο χάλυβα. Τα πτερύγια και τα τμήματα των αξόνων που είναι κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας βυθισμένα εντός του υγρού, επικαλύπτονται συχνά με ανθεκτικό στα υγρά πολυτετραφθοροαιθυλένιο (τεφλόν). Τα δισκία αφήνονται να βυθιστούν στον

πυθμένα των φιαλών ακριβώς πριν την έναρξη της δοκιμασίας διάλυσης. Ο έλεγχος διαλυτότητας δισκίου είναι ένας τυποποιημένος έλεγχος για μέτρηση του ρυθμού απελευθέρωσης του φαρμάκου από μία δοσομετρική μορφή. Ο έλεγχος διαλυτότητας περιλαμβάνεται στους in-vitro ελέγχους των σκευασμάτων που αποσκοπούν στη βελτιστοποίηση και στο συνεχή έλεγχο ποιότητας.(*Εικόνα 6.5*).

Εικόνα 6.5: Συσκευή Dissolution για τον έλεγχο της διαλυτότητας των σκευασμάτων



6.2 Διαλύτες

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν, είναι οι εξής:

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

απαλλαγμένου από τα παραπάνω στη χρήση χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Για την παρασκευή νερού καθαρότητας HPLC (HPLC grade), νερό βρύσης αρχικά διέρχεται από στήλη απιονισμού και ακολούθως από ειδικό σύστημα παραγωγής ύδατος υψηλής καθαρότητας. Νερό αποδεκτής καθαρότητας θεωρείται ότι λαμβάνεται όταν το σύστημα δίνει ένδειξη ειδικής αντίστασης >/ 18,2 MΩ cm (όπως αναφέρθηκε και παραπάνω).

2. Μεθανόλη HPLC, καθαρότητας HPLC.

6.3 Αντιδραστήρια

Όσον αφορά τα αντιδραστήρια, χρησιμοποιήθηκαν α) ακετονιτρίλιο (ACN), β) μεθανόλη (MeOH), γ) διμέθυλοφορμαμίδιο (DMF), δ) μονόξινο φωσφορικό νάτριο (Na_2HPO_4), ε) Na_2EDTA και στ) φωσφορικό οξύ 85% (H_3PO_4)

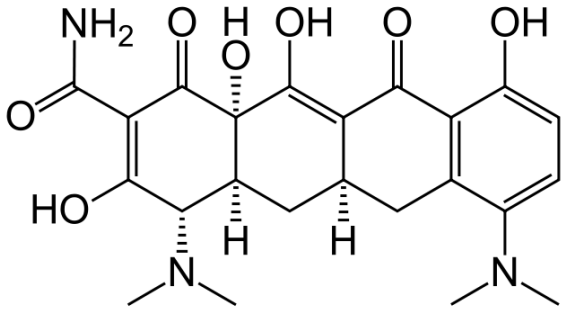
6.4 Υλικά αναφοράς

Τέλος, όσον αφορά τα υλικά αναφοράς, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

1. Πρότυπο Minocycline, ΧΟΑ Φαρμακοποιίας, για την ανάλυση της δραστικής ένωσης του φαρμάκου (Assay)
2. Πρότυπα προσμίξεων, φαρμακοποιίας, για την ανάλυση των προσμίξεων του φαρμάκου (Related Substances) .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7ο: ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΔΙΣΚΙΩΝ MINOCYCLINE[64]

- **Σκοπός**



Εικόνα 7.1. Δομή της Minocycline®.

Σκοπός αυτής της μελέτης, είναι να επιβεβαιωθεί ότι τα δισκία **Minocycline®** 100 mg, της συγκεκριμένης παρτίδας, είναι κατάλληλα για αποδέσμευση στην αγορά και χρήση από τον κόσμο, μέσα από μία σειρά διαδικασιών και ελέγχων. Αυτοί περιλαμβάνουν: εμφάνιση, χρώμα, διαστάσεις, μέσο βάρος, διακύμανση βάρους/ομοιομορφία μάζας, ομοιομορφία περιεχομένου, σκληρότητα, υποδιαίρεση δισκίων, διαλυτότητα, συγγενείς ουσίες, έλεγχο περιεκτικότητας, έλεγχο της μικροβιολογικής ποιότητας και ταυτοποίηση του εκδόχου, διοξειδίου του τιτανίου.

7.1. Εμφάνιση (Appearance)

- **Διαδικασία:**

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

- **Προδιαγραφές:**

100 mg/tab : Επιμήκη, αμφίκυρτα δισκία με λεία, ματ επιφάνεια.(Εικόνα 7.2)

Εικόνα 7.2. Δισκία Minocycline από το συγκεκριμένο batch, που έγινε η ανάλυση.

7.2. Χρώμα

- **Διαδικασία:**

Η διαδικασία πραγματοποιείται με οπτική εξέταση.

- **Προδιαγραφές:**

100 mg/tab : Το χρώμα είναι απαλό κίτρινο.

7.3. Αντίσταση στη σύνθλιψη (Resistance to crushing)

- **Προδιαγραφές:**

100 mg/tab : NLT 50 N

Έγινε έλεγχος με ειδική συσκευή μέτρησης της δύναμης (σε Newton) για να διαπιστωθεί ακριβώς η αντίσταση του φαρμάκου στη σύνθλιψη.

7.4. Αποσάρθρωση (Disintegration)

- **Προδιαγραφές:**

100 mg/tab : NMT 30 min

Έγινε έλεγχος με ειδική συσκευή αποσάρθρωσης.

7.5. Μέση Μάζα

- **Διαδικασία:**

Τυχαία παραλαβή 20 δισκίων, ζύγιση με ζυγό ακριβείας και προσδιορισμός της μέσης μάζας.

- **Υπολογισμοί:**

Μέσο Βάρος : = Συνολικό Βάρος 20 Δισκίων/20

- **Προδιαγραφές:**

100 mg/tab : 209,0-227,0 mg

7.6. Απώλεια στην ξήρανση (Loss on drying)

- **Διαδικασία:**

Κονιοποιείται κατάλληλη ποσότητα δισκίων (20 δισκία για 100 mg και 40 δισκία για 50 mg) και μεταφέρεται η σκόνη σε κατάλληλο γυάλινο δοχείο ξήρανσης και ξηραίνεται στους 70 ° C για 20 min μέχρι να ληφθεί σταθερό βάρος.

- **Προδιαγραφές:**

100 mg/tab : NMT 4,0%

7.7. Δοκιμασία Ταυτοποίησης (Identification test)

- **Διαδικασία:**

Συσκευή, χρωματογραφικές συνθήκες και διαλύματα σύμφωνα με την "Δοκιμασία" (Assay) (παρακάτω).

- **Προδιαγραφές:**

Ο χρόνος κατακράτησης της ουσίας να αντιστοιχεί σε εκείνον της μινοκυκλίνης (Minocycline).

7.8. Έλεγχος περιεκτικότητας (Assay)

- **Διαδικασία - Παράμετροι:**

1. Οργανολογία: HPLC-UV
2. Αναλυτική στήλη (Analytical column): Zorbax Rx C8, 150x4,6 mm, 5 μm, DUPONT
3. Πρότυπη Ουσία Αναφοράς: Υδροχλωρική Μινοκυκλίνη (Minocycline hydrochloride RS)
4. Αντιδραστήρια:

   α) Νερό HPLC (αντίσταση > 18 MΩ x cm) με απιονισμό και απόσταξη, β) ακετονιτρίλιο (ACN), γ) μεθανόλη (MeOH), δ) διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) , ε) μονόξινο φωσφορικό νάτριο (Na_2HPO_4), στ) Na_2EDTA, ζ) Φωσφορικό οξύ 85% (H_3PO_4)

5. Μείγμα διαλυτών (Solvent mixture) : Νερό : Μεθανόλη, 3:2 (v/v)
6. Διάλυμα Ελέγχου (Test Solution) :

100 mg/tab : 10 επικαλυμμένα με λεπτό υμένιο δισκία λειοτριβούνται, ζυγίζονται με ακρίβεια σε ογκομετρική φιάλη των 500 mL, διαλύονται σε 400 ml μίγματος διαλύτη και κατεργάζονται σε λουτρό υπερήχων (Sonication) για περίπου 5 min. Αραίωση με νερό σε 500,0 mL για να ληφθεί συγκέντρωση περίπου 2,0 mg / mL μινοκυκλίνης.

7. Διάλυμα Αναφοράς A (Reference solution A) (2,0 mg/mL) :

Περίπου 59 mg Minocycline Hydrochloride RS (ζυγίζονται με ακρίβεια σε

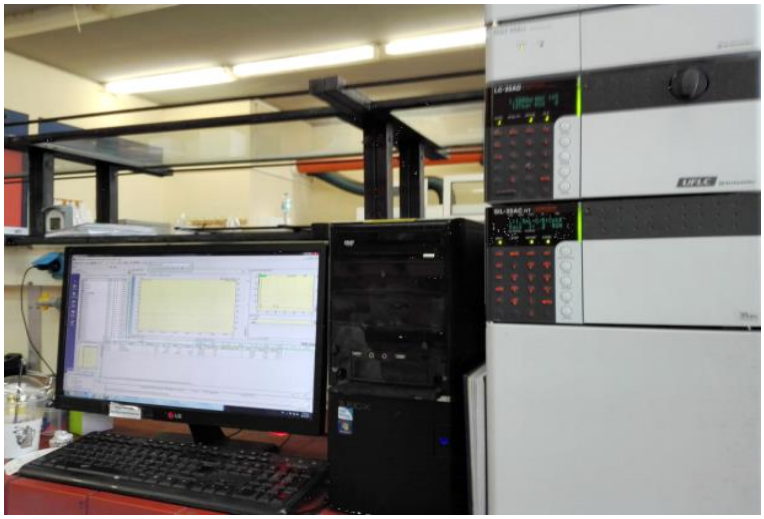
ογκομετρική φιάλη των 25 mL) διαλύονται σε 20 mL μείγματος διαλυτών και κατεργάζονται σε λουτρό υπερήχων για περίπου 5 min. Αραίωση με νερό σε 25,0 mL για να ληφθεί μια γνωστή συγκέντρωση περίπου 2,0 mg / mL της μινοκυκλίνης.

8. Χρωματογραφικές Παράμετροι:

Κινητή Φάση: 0,07 M διάλυμα μονόξινου φωσφορικού νατρίου: Ακετονιτρίλιο: Διμεθυλοφορμαμίδιο: 0,1 M διάλυμα Na_2EDTA, 62: 9,5: 9,5: 19 (v / v), ρυθμισμένο σε pH 7,0 με φωσφορικό οξύ 85%
Όγκος έγχυσης: 6 μL
Ρυθμός ροής: 1,5 ml/min
Θερμοκρασία στήλης: 40 ^oC
Χρόνος εκτέλεσης: 30 min
Θερμοκρασία αυτόματου δειγματολήπτη: 5 ^oC
Μήκος κύματος ποσοτικού προσδιορισμού: 280 nm.

9. Καταλληλότητα - Ικανότητα συστήματος (System suitability):

Η επαναληψιμότητα των εμβαδών των κορυφών των επαναλαμβανόμενων εγχύσεων του διαλύματος αναφοράς δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1,5%. Επιπλέον, ο αριθμός των θεωρητικών πλακών για την κύρια κορυφή δεν πρέπει να είναι μικρότερος από 3200.



Εικόνες 7.3 και 7.4. Σύστημα HPLC, που πραγματοποιήθηκε η ανάλυση.

- **Υπολογισμοί:**

Υπολογισμός της περιεκτικότητας της μινοκυκλίνης από την εξίσωση:

$$C = \frac{W_{RSA} \times C_{RSA} \times P_{TSA} \times M_T}{W_{TS} \times P_{RSA} \times 5} \qquad \textbf{(7.1)}$$

στην οποία:

C: Περιεκτικότητα μινοκυκλίνης σε mg ανά επικαλυμμένο με λεπτό υμένιο δισκίο

W_{RSA}: Βάρος της ουσίας αναφοράς σε mg (διάλυμα αναφοράς A - Reference solution A)

C_{RSA}: Περιεκτικότητα της ουσίας αναφοράς σε %

P_{RSA}: Το εμβαδόν κορυφής του δραστικού συστατικού στο χρωματογράφημα του διαλύματος αναφοράς A

W_{TS}: Βάρος δείγματος σε mg (διάλυμα ελέγχου- test solution)

P_{TSA}: Εμβαδόν κορυφής του δραστικού συστατικού στο χρωματογράφημα του διαλύματος ελέγχου

M_T: Μέση μάζα

- **Προδιαγραφές:**

100 mg/tab : 95,0-105,0 mg, (ονομαστική τιμή =100 mg), (95,0-105,0%)

Εικόνα 7.5. Προετοιμασία του δείγματος για Ανάλυση, κατά τον έλεγχο Assay.

7.9. Συγγενείς ουσίες (Related Substances)

- **Διαδικασία - Παράμετροι:**

1. Οργανολογία: HPLC-UV
2. Αναλυτική στήλη (Analytical column): Zorbax Rx C8, 150x4,6 mm, 5 μm, DUPONT (ακριβώς η ίδια αναλυτική στήλη με τον έλεγχο Assay)
3. Πρότυπη Ουσία Αναφοράς: Υδροχλωρική Μινοκυκλίνη (Minocycline Hydrochloride RS)
4. Αντιδραστήρια:

   Όπως με § 7.8.4

5. Μείγμα διαλυτών (Solvent mixture) : Νερό : Μεθανόλη, 3:2 (v/v)
6. Διάλυμα Ελέγχου (Test Solution) :

   Όπως με § 7.8.6

7. Διάλυμα Αναφοράς A (Reference solution A) (2.0 mg/mL) :

   Όπως με § 7.8.7

8. Διάλυμα Αναφοράς B (Reference solution B) (40 μg/mL) :

Αραίωση 2,0 mL διαλύματος αναφοράς A με μίγμα διαλυτών σε 100,0 mL για να ληφθεί συγκέντρωση περίπου 40 μg / mL (2% με διάλυμα αναφοράς A).

9. Διάλυμα Αναφοράς C (Reference solution C):

Θέρμανση 5 mL διαλύματος αναφοράς A σε υδατόλουτρο για 15 min, ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου και αραίωση με νερό σε 10,0 mL για το σχηματισμό του

προϊόντος αποικοδόμησης, 4-επι-μινοκυκλίνη (4-epi-minocycline) .

10. Χρωματογραφικές Παράμετροι:

Όπως με § 7.8.10

- **Υπολογισμοί:**

Το χρωματογράφημα του διαλύματος αναφοράς C δείχνει δύο ξεχωριστές κορυφές. Υπολογίζεται ο σχετικός χρόνος κατακράτησης για την 4-επι-μινοκυκλίνη με αναφορά στη μινοκυκλίνη (περίπου 0,6) .

Ο υπολογισμός της % περιεκτικότητας σε οποιαδήποτε πρόσμειξη μινοκυκλίνης, πραγματοποιείται από την εξίσωση:

$$C_{BD} = \frac{W_{RSA}}{25} \times \frac{2}{100} \times \frac{C_{RSA}}{100} \times \frac{500}{W_{TS}} \times \frac{P_{TSBD}}{P_{RSB}} \times M_T \times \frac{100}{C} \qquad \textbf{(7.2)}$$

στην οποία:

C_{BD} : Ποσότητα πρόσμιξης / προϊόντος αποικοδόμησης σε % σε σχέση με τη μινοκυκλίνη.

W_{RSA} : Βάρος της ουσίας αναφοράς σε mg (διάλυμα αναφοράς A).

C_{RSA} : Περιεκτικότητα της ουσίας αναφοράς σε %.

P_{RSB} : Εμβαδόν κορυφής του δραστικού συστατικού στο χρωματογράφημα του διαλύματος αναφοράς B.

W_{TS} : Βάρος δείγματος σε mg (διάλυμα ελέγχου- test solution).

P_{TSBD} : Εμβαδόν κορυφής πρόσμιξης / προϊόντος αποικοδόμησης στο χρωματογράφημα του διαλύματος ελέγχου.

P_{RSA}: Το εμβαδόν κορυφής του δραστικού συστατικού στο χρωματογράφημα του διαλύματος αναφοράς Α.

P_{TSA}: Εμβαδόν κορυφής του δραστικού συστατικού στο χρωματογράφημα του διαλύματος ελέγχου.

M_T: Μέση μάζα.

C: Περιεκτικότητα σε μινοκυκλίνη σε mg ανά επικαλυμμένο με λεπτό υμένιο δισκίο.

- **Προδιαγραφές:**

4-επι-μινοκυκλίνη (4-epi-minocycline) : NMT 2,0 %

Άλλες μεμονωμένες, συγγενείς ουσίες : NMT 1,2 %

Άθροισμα άλλων συγγενών ουσιών : NMT 2,0 %

7.10. Διάλυση - Διαλυτότητα (Dissolution)

- **Διαδικασία - Παράμετροι:**

1. Οργανολογία: Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης (Dual-beam) . Σύστημα διάλυσης (Dissolution System) (Paddles - συσκευή 2).
2. Πρότυπη Ουσία Αναφοράς: Υδροχλωρική Μινοκυκλίνη (Minocycline Hydrochloride RS).
3. Αντιδραστήρια: Απιονισμένο νερό, Υδροχλωρικό οξύ (HCl)
4. Μέσο διάλυσης (Dissolution medium): 0,1 N HCl
5. Διάλυμα Αναφοράς D (Reference solution D) :

Περίπου 50 mg Minocycline Hydrochloride RS (ζυγίζονται με ακρίβεια σε ογκομετρική φιάλη των 500 mL) διαλύονται σε 400 mL 0,1 N HCl και αφήνονται σε λουτρό υπερήχων (Sonication) για περίπου 5 min. Αραίωση με 0,1 N HCl στα 500,0 mL.

6. Διάλυμα Ελέγχου (Test Solution):

Τοποθετούμε ένα δισκίο σε κάθε ένα από τα έξι δοχεία και η συσκευή τίθεται αμέσως στις 50 στροφές ανά min (rpm) για 30 min. Λήψη 5 mL από το δείγμα και διήθηση μέσω κατάλληλου φίλτρου.

7. Συνθήκες διαλυτότητας (Dissolution conditions) :

Συσκευή: Paddles - (συσκευή 2).
Δείγμα: 1 δισκίο ανά δοχείο.
Μέσο διάλυσης (Medium): 0,1 N HCl.
Όγκος: 1000 mL.
Ταχύτητα περιστροφής: 50 rpm.
Χρόνος δειγματοληψίας: 30 min.
Θερμοκρασία: 37 °C ± 0.5 °C

8. Ανίχνευση: UV 385 nm

- **Υπολογισμοί:**

Ο υπολογισμός του ποσοστού % της διαλυμένης ουσίας Minocycline, γίνεται με τον ακόλουθο τύπο:

$$DR = \frac{W_{RSD} \times C_{RSD} \times A_{TSD}}{A_{RSD} \times 50} \quad \textbf{(7.3)}$$

στον οποίο:

DR: Ποσοστό διάλυσης της μινοκυκλίνης σε ποσοστό % του δηλωμένου περιεχομένου.

W_{RSD}: Βάρος της ουσίας αναφοράς σε mg.

C_{RSD}: Περιεκτικότητα της ουσίας αναφοράς σε ποσοστό %.

A_{RSD}: Απορρόφηση δραστικού συστατικού στο διάλυμα αναφοράς D στα 385 nm.

A_{TSD}: Απορρόφηση δραστικού συστατικού στο διάλυμα δοκιμής στα 385 nm.

- **Προδιαγραφές:**

100 mg/tab : NLT 75%

7.11. Ομοιογένεια - Ομοιομορφία μάζας (Uniformity of mass)

- **Διαδικασία - Παράμετροι:**

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

- **Υπολογισμοί:**

Μέγιστη Απόκλιση % = $((W_H - A)/A) \times 100$ **(7.4)**

Ελάχιστη Απόκλιση % = $((A-W_L)/A) \times 100$ **(7.5)**

Όπου W_H : το δισκίο με το μεγαλύτερο βάρος

W_L : το δισκίο με το μικρότερο βάρος

A : το μέσο βάρος των δισκίων

- **Προδιαγραφές:**

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

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8ο: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ, ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα πειραματικά αποτελέσματα προέκυψαν από τον έλεγχο δισκίων 100 mg/tab και περιλαμβάνουν τους ακόλουθους προσδιορισμούς:

8.1 Μέση Μάζα (Average Mass)

8.1.1 Δισκία των 100 mg/tab

m= 215,93mg , SD= 0,2 , %RSD= 0,06 %

Για να είναι αποδεκτό το αποτέλεσμα, πρέπει να είναι εντός ορίων 209,0- 227,0 mg. Έτσι το μέσο βάρος 215,93 mg για τα δισκία Minocycline® των 100 mg/tab είναι αποδεκτό.

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

8.2.1 Δισκία των 100 mg/tab

Μέγιστη απόκλιση %= (221,54 - 215,93)/ (215,93) x 100 = 2,598 %

Ελάχιστη απόκλιση %= (210,79- 215,93)/ (215,93) x100 = -2,380 %

Τα αποτελέσματα είναι εντός προδιαγραφών.

8.3. Αντίσταση στη σύνθλιψη (Resistance to crushing)

8.3.1 Δισκία των 100 mg/tab

100 mg/tab: NLT 50 N

Τα αποτελέσματα είναι εντός προδιαγραφών, γεγονός που τα καθιστά ως αποδεκτά, καθώς η αντίσταση στη σύνθλιψη είναι μεγαλύτερη από 50N.

8.4. Αποσάρθρωση (Disintegration)

8.4.1 Δισκία των 100 mg/tab

100 mg/tab: NMT 30 min

Τα αποτελέσματα είναι εντός προδιαγραφών, γεγονός που τα καθιστά ως αποδεκτά, καθώς ο χρόνος αποσύνθεσης είναι μικρότερος από 30 min.

8.5. Απώλεια στην ξήρανση (Loss on drying)

8.5.1 Δισκία των 100 mg/tab

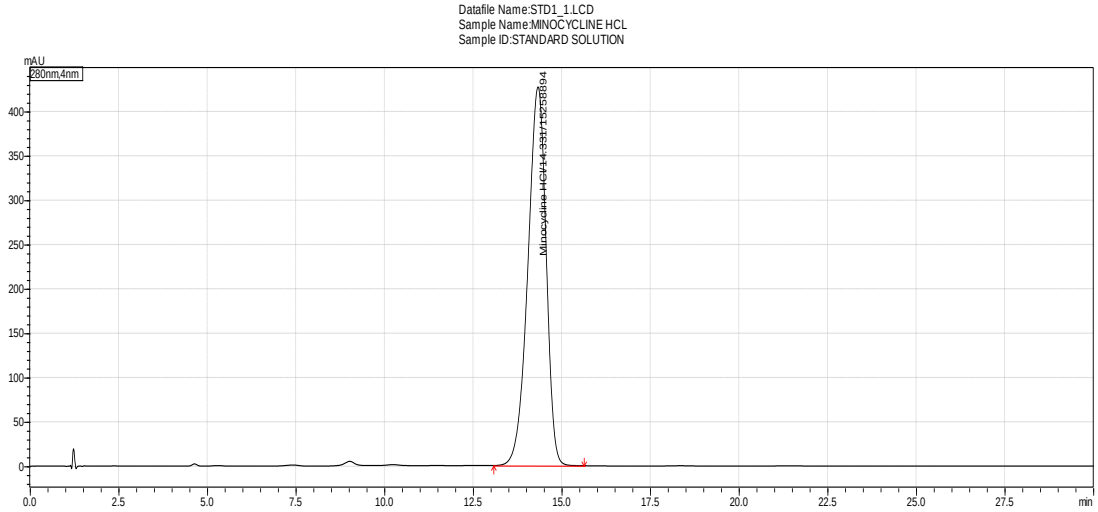
100 mg/tab : NMT 4,0%

Τα αποτελέσματα είναι εντός προδιαγραφών, γεγονός που τα καθιστά ως αποδεκτά, καθώς η επί τοις εκατό απώλεια στην ξήρανση είναι μικρότερη από 4,0%.

8.6. Δοκιμασία Ταυτοποίησης (Identification test)

8.6.1 Δισκία των 100 mg/tab

Ο χρόνος κατακράτησης αντιστοιχεί σε εκείνον της μινοκυκλίνης (Minocycline), ο οποίος είναι RT = 14,3.



Σχήμα 8.1 Ενδεικτικό χρωματογράφημα προτύπου δραστικής ουσίας.

8.7. Έλεγχος περιεκτικότητας (Assay)

8.7.1 Δισκία των 100 mg/tab

% Assay = $(A_{test}*Wt_{test}*Wr_{std})/(A_{std}*Wr_{test}*Wt_{std})$ = 95,9 %

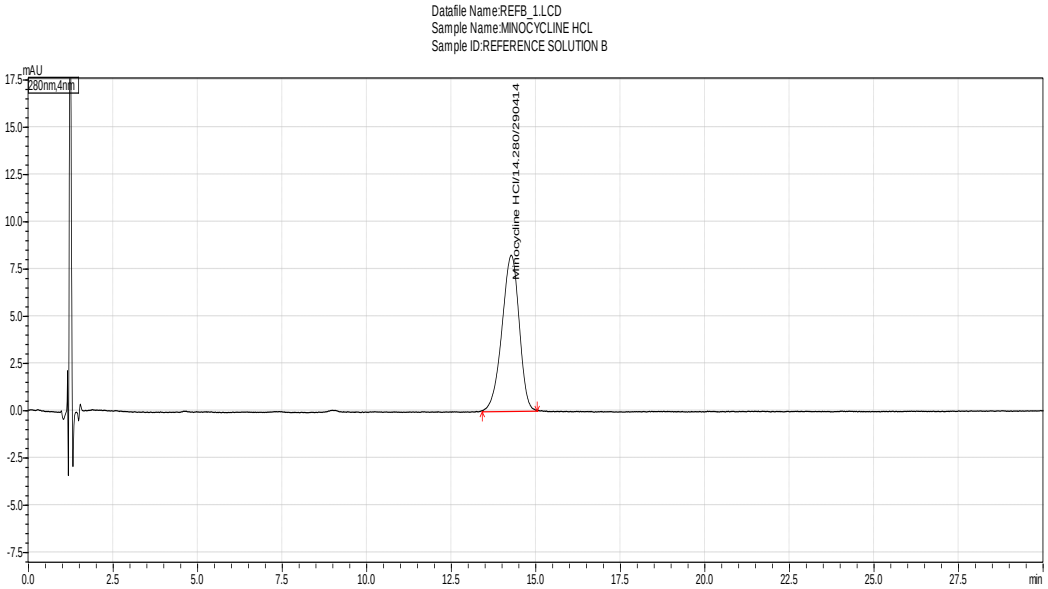
Τα αποτελέσματα είναι αποδεκτά καθώς είναι εντός των ορίων 95,0-105 %.

8.8. Συγγενείς ουσίες (Related Substances)

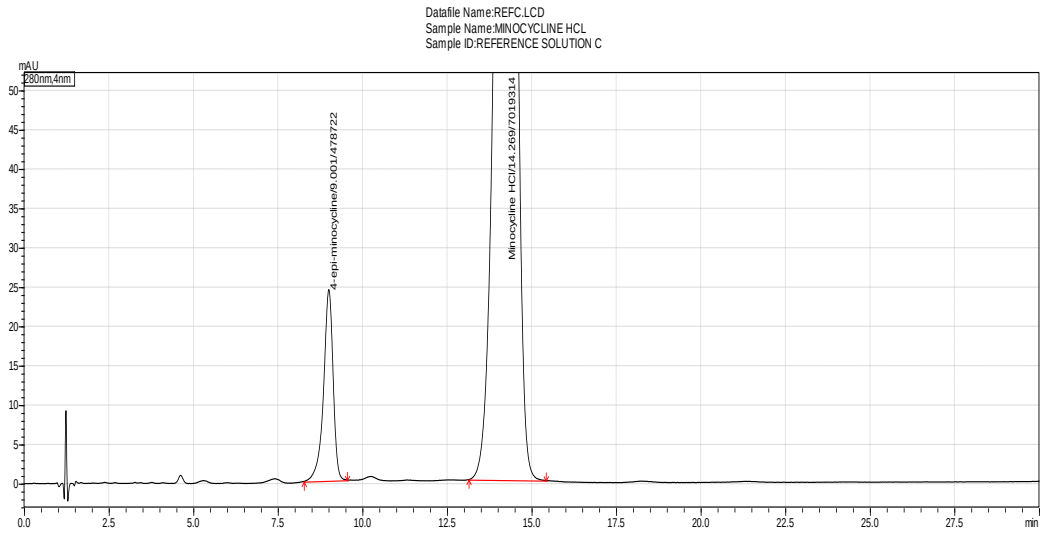
8.8.1 Δισκία των 100 mg/tab

Για την 4-επι-μινοκυκλίνη (4-epi-minocycline) : 1,363 %

Το αποτέλεσμα είναι εντός προδιαγραφών, γεγονός που το καθιστά ως αποδεκτό, καθώς το επί τοις εκατό ποσοστό της 4-επι-μινοκυκλίνης, είναι μικρότερο από 2,0%.



Σχήμα 8.2. Ενδεικτικό Χρωματογράφημα διαλύματος Αναφοράς B (Reference B).



Σχήμα 8.3. Ενδεικτικό Χρωματογράφημα διαλύματος Αναφοράς C (Reference C).

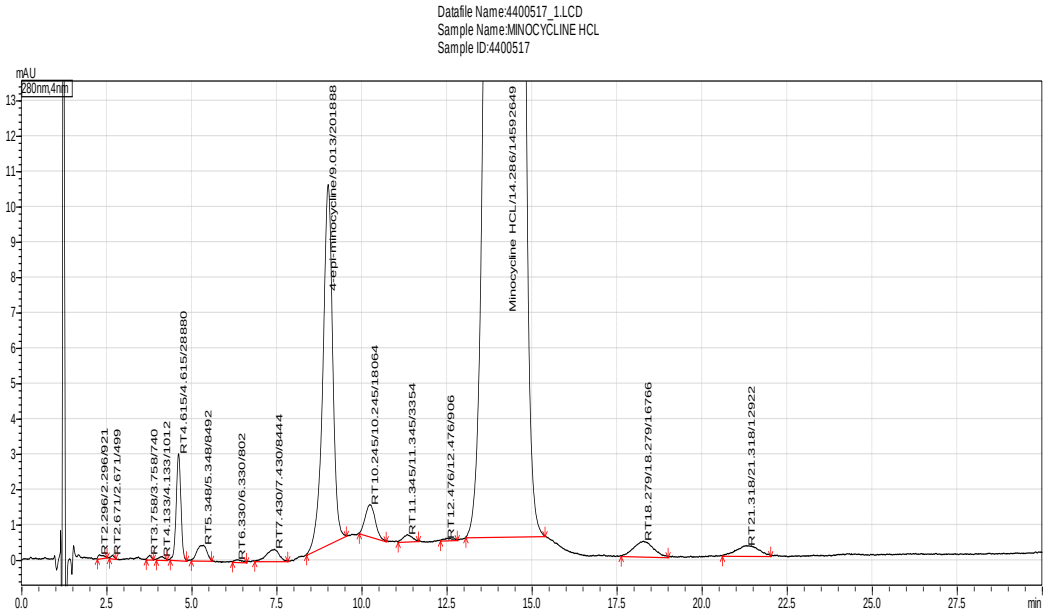
Άλλες μεμονωμένες, συγγενείς ουσίες :

NAME RT (min)	%
2,296	0,006
2,671	0,003
3,758	0,005
4,133	0,007
4,615	0,195
5,348	0,057
6,330	0,005
7,430	0,057
10,245	0,122
11,345	0,023
12,476	0,006
18,279	0,113
21,318	0,087

Τα αποτελέσματα είναι εντός προδιαγραφών, γεγονός που τα καθιστά ως αποδεκτά, καθώς το επί τοις εκατό ποσοστό κάθε ένωσης, μεμονωμένα, είναι μικρότερο από 1.2%.

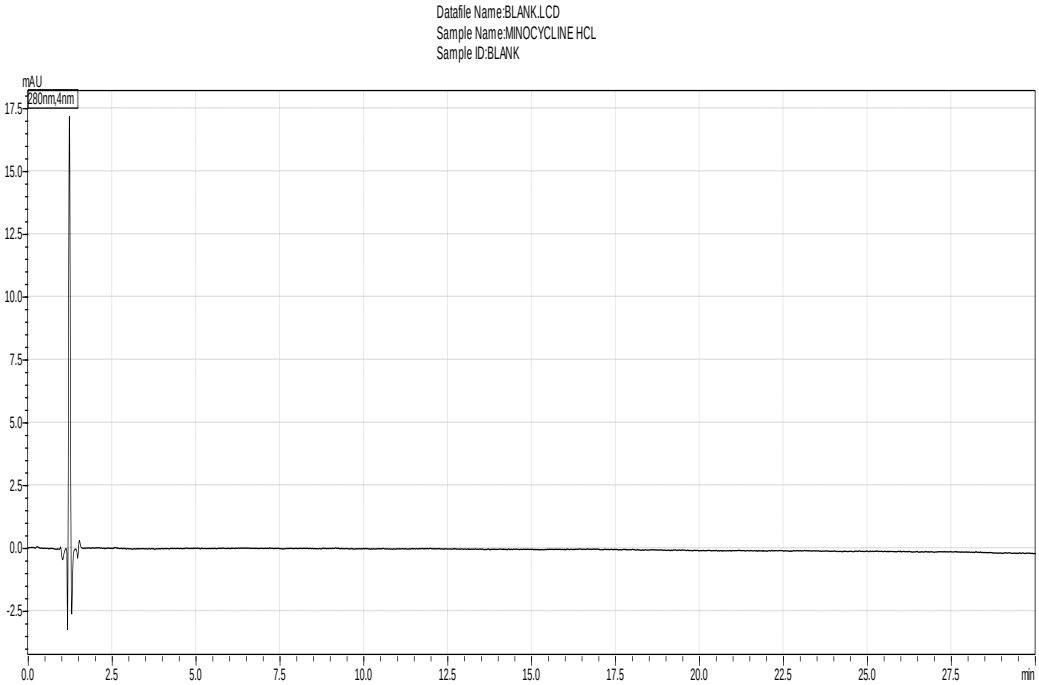
Άθροισμα άλλων συγγενών ουσιών: 0.687 %

Το αποτέλεσμα είναι εντός προδιαγραφών, γεγονός που το καθιστά ως αποδεκτό, καθώς το επί τοις εκατό ποσοστό του αθροίσματος των άλλων σχετικών ενώσεων, είναι μικρότερο από 2,0%.



Σχήμα 8.4. Ενδεικτικό Χρωματογράφημα άλλων συγγενών ουσιών.

Για το λευκό διάλυμα:



Σχήμα 8.5. Ενδεικτικό Χρωματογράφημα λευκού διαλύματος.

8.9.Διαλυτότητα (Dissolution)

8.9.1 Δισκία των 100 mg/tab

DR= $(W_{RSD}*C_{RSD}*A_{TSD})/(A_{RSD}x50)$

% Διαλυτότητα= 95,8

Τα αποτελέσματα είναι αποδεκτά καθώς η επί τοις εκατό διαλυτότητα είναι μεγαλύτερη από 75%.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
Acceptance value	Τιμή αποδοχής
Assay	Ποσοτικός προσδιορισμός κύριου συστατικού δείγματος
Blank solution	Λευκό διάλυμα
Composition	Σύσταση
Content Uniformity	Ομοιομορφία Περιεχομένου
Electrochemical detectors	Ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές
Detector	Ανιχνευτής
Equivalent	Ισοδύναμο
Formulations	Φαρμακευτικά σκευάσματα
Guidelines	Οδηγίες
Minocycline	Μινοκυκλίνη
High Performance Liquid Chromatography	Υγροχρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
Identification threshold	Όριο ταυτοποίησης
GC	Αεριοχρωματογραφία
Mass variation	Διακύμανση μάζας
Qualification threshold	Όριο αξιολόγησης
Refractive index detector	Ανιχνευτής δείκτη διάθλασης
Reporting threshold	Όριο αναφοράς
Response Factor	Συντελεστής απόκρισης
Specifications	Προδιαγραφές
Specified (impurity)	(Πρόσμιξη) Με προδιαγραφές
SEC	Χρωματογραφία Αποκλεισμού μεγεθών
Stability	Σταθερότητα
Stability-indicating	Ενδεικτική σταθερότητας
Standard solution	Πρότυπο διάλυμα
System suitability	Καταλληλότητα συστήματος
Test solution	Διάλυμα ελέγχου
Uniformity of dosage units	Ομοιομορφία δόσης
Unspecified (impurity)	(Πρόσμιξη) Χωρίς προδιαγραφές
Validation	Επικύρωση
Working concentration	Συγκέντρωση εργασίας

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Ακρωνύμια και η ανάπτυξή τους

API	Active Pharmaceutical Ingredient
AV	Acceptance Value
CD	Circular Dichronism
CU	Content Uniformity
DAD	Diode Array Detector
ECD	Electro Chemical Detector
EP	European Pharmacopoeia
GC	Gas Chromatography
GE	Gradient Elution
GMP	Good Manufactoring practice
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICH	International Conference on Harmonisation
IE	Isocratic Elution
IEC	Ion Exchange Chromatography
IPC	Ion Pair Chromatography
IS	Internal Standard
ISO	International Organization of Standarization
LC	Liquid Chromatography
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantitation
MS	Mass Spectrometry
MV	Mass Variation
MDD	Maximum Daily Dose
NP / NPC	Normal Phase Chromatography
NMT	No more than
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PDA	Photo Diode Array
QC	Quality Control
RP / RPC	Reversed-Phase Chromatography
Rs	Resolution
RSD	Relative Standard Deviation
RRF	Relative Response Factor
RRT	Relative Retention Time
RT	Retention Time
SD	Standard Deviation
SPME	Solid Phase Microextraction
SEC	Size Exclusion Chromatography

TCs	Tetracyclines
WHO	World Health Organization
SPE	Solid Phase Extraction
SFE	Supercritical Fluid Chromatography
TLC	Thin-layer Chromatography
USP	United States Parmacopeia
UV	Ultra Violet
Vis	Visible
ΕΚΠΑ	Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
ΕΦ	Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία

ΑΝΑΦΟΡΕΣ-ΒΙΒΛΟΓΡΑΦΙΑ

1. Brown M, Top of the form, Drug Discovery Today, 2002
2. Μ.Μαρσέλος, "Συνοπτική Φαρμακολογία – Τόμος 1", Κεφάλαιο 1. Φαρμακοκινητική, σελ.8-10, 2006
3. Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO.) http://www.who.int/en/
4. A.Kar, Pharmaceutical Drug Analysis, 2nd ed., 2007, New Age International Publishers
5. S.Hansen, S.P.Bjergaard, K.Rasmussen, "Introduction to pharmaceutical chemical analysis, 1st ed., 2011
6. Μ. Κουππάρης «Έλεγχος Ποιότητας Φαρμάκων» (σημειώσεις μαθήματος)
7. S.Ahuja and M. W. Dong, Eds., Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC, Volume 6 of separation science and technology, Elsevier, 2005
8. Y. Kazakevich and R. Lobrutto, Eds., HPLC for pharmaceutical scientists, Wiley, 2007
9. History of HPLC, (www.pharm.uky.edu)
10. Factsheet for experts, Ευρωπαϊκό Κέντρο για την πρόληψη και τον έλεγχο των λοιμώξεων
11. Χαράλαμπος Γκούβας: "Αντιμικροβιακά Φάρμακα και Λοιμώξεις", Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης, Αθήνα 1986
12. Ελένη Γιαμαρέλου: "Αρχές αντιμικροβιακής χημειοθεραπείας των λοιμώξεων". Περιοδικό Ιατρική,1988,53:631-636
13. J. Mycek, R. A. Harvey, P.C. Champe, Φαρμακολογία, εκδ. Παρισιανού, 2ηέκδ., Αθήνα 1997
14. www.sitemaker.umich (July 2017)
15. www.EOF.gr (July 2017)
16. http://www.galinos.gr/web/drugs/main/substances/tetracycline (July 2017)

17. www.chm.bris.ac.uk (July 2017)

18. I. Chopra, M. Roberts, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2001, 65, 232-260

19. Y. Liang, M. Centron, R. Bates, J. Chromatogr. A. 1998, 827, 45-55

20. www.thedoctorslounge.net (July 2017)

21. DrugBank: DB01017 (Minocycline)

22. Fischer, Janos; Ganellin, C. Robin (2006). *Analogue-based Drug Discovery*. John Wiley & Sons. p. 489. ISBN 9783527607495

23. Redin, G. S. (1966). Antibacterial activity in mice of minocycline, a new tetracycline. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 6, 371

24. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/minocycline

25. Strauss; (2007). "Guidelines of care for acne vulgaris management." Journal of the American Academy of Dermatology. **56** (4): 651–63

26. *"Minocycline, Doxycycline and Acne Vulgaris"*. Science Of Acne.com. 07/11/2011.

27. Kircik LH, "Doxycycline and minocycline for the management of acne: a review of efficacy and safety with emphasis on clinical implications". *J Drugs Dermatol*. **9** (11): 1407–11

28. Hubbell; (1982). "Efficacy of minocycline compared with tetracycline in treatment of acne vulgaris.". *Archives of Dermatology*. **118** (12): 989–92

29. Eady; (2003). "Propionibacterium acnes resistance: a worldwide problem.". *Dermatology*. **206** (1): 54–6

30. Ross; (2003). "Antibiotic-resistant acne: lessons from Europe.". *British Journal of Dermatology*. **148** (3): 467–78

31. Bernier C, Dréno B (May 2001). "[Minocycline]". *Ann Dermatol Venereol* (in French). **128** (5): 627–37

32. Joks R, Durkin HG (December 2011). "Non-antibiotic properties of tetracyclines as anti-allergy and asthma drugs". *Pharmacol. Res*. **64** (6): 602-9

33. Greenwald RA, "The road forward: the scientific basis for tetracycline treatment of arthritic disorders". *Pharmacol. Res*. **64** (6): 610–3

34. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/776077, (July 2017)

35. https://myhealthbox.eu/el/view/804680/ba1324f1722091f3c48794294bb6a29/leaflet, (July 2017)

36. http://www.ifet.gr/drugs/ingredients/doxycyclin.htm, (July 2017)

37. http://library.njucm.edu.cn/yaodian/ep/EP501E/16_monographs/18_monographs_l-p/minocycline_hydrochloride/1030e.pdf, (July 2017)

38. http://www.tlcstandards.com/ProdDetail.aspx?ID=M-348&name=MINOCYCLINE, (July 2017)

39. D.Salom, C.Abad, Chromatographic purification and characterization of synthetic tryptophan-substituted minocycline analogues, Journal of Chromatography, Vol.725, Elsevier, 1996, p.315-322, (July 2017)

40. Χ. Παύλος, Διδακτορική διατριβή, «Ανάπτυξη και Επικύρωση μεθόδου για τον προσδιορισμό βιταμινών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης μετά από εκχύλιση στερεάς φάσης – υγρού, εφαρμογή σε φαρμακευτικά σκευάσματα και βιολογικά υγρά». Α.Π.Θ., 2004

41. Ε. Αρχοντάκη, Χημεία – Χρωματογραφικές Τεχνικές Ανάλυσης (σημειώσεις μαθήματος)

42. Σ.Ασσαριώτη, Α.Δραγάτη, Προσδιορισμός Υπολειμμάτων Φυτοφαρμάκων σε Δείγματα Νερού με Αεριοχρωματογραφία – Φασματομετρία Μαζών (GC-MS/MS), Πτυχιακή Εργασία, Ε.Κ.Π.Α., Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας, 2012-2013

43. ISOLUTE SPE Columns and 96-well Plates, For extra Purity and High Analyte Recovery
http://www.labicom.cz/administrace/ckfinder/userfiles/files/Biotage_Isolute HYPERLINK"http://www.labicom.cz/administrace/ckfinder/userfiles/files/Biotage_Isolute.pd".pdf, τελευταία επίσκεψη: July 2017)

44. Leonardo de Azevedo Calderon, “Chromatography – The Most Versatile Method of Chemical Analysis”, Chapter No. 5 - Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis, Paolo Lucci, Deborah Pacetti, Natale G. Frega and Oscar Núñez, October 24,2012

45. Waters Corporation: History of Chromatography (accessed July 11, 2017)

46. L. R. Snyder, J. J. Kirkland, and J. W. Dolan, Introduction to modern liquid chromatography, Y. Kazakevich and R. Lobrutto, Eds., HPLC for pharmaceutical scientists, Wiley, 2007 , 3rd ed., Wiley, 2010

47. EOI HPLC PROMINENCE SHIMADZU (Διαδικασία Εργαστηρίου- Παροχής Υπηρεσιών '' Χημική Ανάλυση – Έλεγχος Ποιότητας''

48. D.A. Skoog, F.J.Holler, T.A. Nieman, Principles of instrumental Analysis, 6th ed., Thomson Brooks, 2007

49. Ν. Θωμαϊδης, Ενόργανη Ανάλυση ΙΙ, σημειώσεις μαθήματος

50. Karger, Barry L. (1997). "HPLC: Early and Recent Perspectives". Journal of Chemical Education, ACS Publications

51. J. G. L.Snyder, J. Kirkland, Practical HPLC method development, 2nd ed.

52. Ζ.Δ. Τζουγανάκη, Διδακτορική διατριβή «Εφαρμογές χρωματογραφίας HPLC στον προσδιορισμό φαρμακευτικών ουσιών και συστατικών τροφίμων με εξατμιστικό ανιχνευτή σκέδασης ακτινοβολίας», Αθήνα, 2007.

53. Σημειώσεις μαθήματος '"Έλεγχος και Διασφάλιση Ποιότητας-Διαπίστευση'', Ενότητα 4 και 5: Επικύρωση/Επαλήθευση αναλυτικών μεθόδων, Κουππάρης Μιχαήλ.

54. https://elqa.teilar.gr/el/nea-anakoinwseis/item/257-i-akribeia-accuracy-kai-ta-sustimatika-lathi-bias (July 2017)

55. https://elqa.teilar.gr/el/nea-anakoinwseis/item/256-epanalipsimotita, (July 2017)

56. https://elqa.teilar.gr/el/nea-anakoinwseis/item/255-i-evaisthisia-sensitivity (July 2017)

57. IUPAC, *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book") (1997). Online corrected version: (2006)

58. MacDougall, Daniel; Crummett, Warren B.; et al. (1980), "Guidelines for Data Acquisition and Data Quality Evaluation in Environmental Chemistry", *Analytical Chemistry*, **52**: 2242–49

59. http://clinchem.aaccjnls.org/content/40/7/1233

60. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073170850000529X

61. https://elqa.teilar.gr/el/nea-anakoinwseis/item/254-i-eksidikeusi-i-eidikotita specificity-kai-eklektikotita-selectivity

62. https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/5388/1/02_Chapter_08.pdf

63. http://chimikoergastirio.blogspot.gr/2009/12/hplc.html

64. A-MD-038 v.01 Minocycline – Μέθοδος ελέγχου ποιότητας δισκίων Minocycline (Διαδικασία Εργαστηρίου Παροχής Υπηρεσιών, Χημική Ανάλυση - Έλεγχος Ποιότητας)