

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΔΙΑΠΙΣΤΕΥΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ  
ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΟΥ SPLENTIR ΜΕ RP-HPLC**

**ΠΑΡΑΒΟΛΙΔΑΚΗ ΜΑΡΙΑ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2011**

## ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΧΑΝΙΩΤΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ (Επιβλέπων Καθηγητής)

Καθηγητής, Τομέας Περιβάλλοντος και Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας,  
Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΧΑΛΕΠΑΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τομέας Μοριακής Κυτταρικής και Αναπτυξιακής  
Βιολογίας και Βιοχημείας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΚΟΤΖΑΜΠΑΣΗΣ ΚΥΡΙΑΚΟΣ

Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Οργανισμών, Πληθυσμών, Περιβάλλοντος και  
Θαλάσσιας Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Στους γονείς μου Μιχάλη και Αναστασία

και στο σύντροφό μου Γιώργο...

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Νίκο Χανιωτάκη που με δέχτηκε στην ομάδα του καθώς και για την βοήθεια και καθοδήγηση του κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Επίσης, ευχαριστώ τον Τζετζαϊλίδη Σταύρο, διαχειριστή συστημάτων και δικτύων του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, για την σημαντική βοήθειά του όσον αφορά τα τεχνικά και υπολογιστικά θέματα που προέκυπταν.

Ακόμα ευχαριστώ την Raluca Buiculescu, διδακτορική φοιτήτρια στο τμήμα της αναλυτικής χημείας, για την παρέα της κατά τη διάρκεια του μεταπτυχιακού μου προγράμματος.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την στήριξη και την αγάπη που μου δείχνουν σε όλα μου τα 'βήματα'.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### I. ABSTRACT

### II. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### III. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

#### 1. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΣΤΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ

1.1 Ανάλυση των φαρμακευτικών σκευασμάτων	3
1.2 Ανάπτυξη της μεθόδου ανάλυσης ενός φαρμακευτικού σκευάσματος	4
1.3 Ο ρόλος του Εθνικού Οργανισμού Φαρμάκων (ΕΟΦ)	5
1.4 Ανάλυση των φαρμακευτικών σκευασμάτων χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)	6

#### 2. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΣΗΣ (RP-HPLC)

2.1 Εισαγωγή στην υγρή χρωματογραφία	7
2.2 Οργανολογία της HPLC	8
2.3 Βασικές παράμετροι υγρής χρωματογραφίας	10
2.3.1 Συντελεστής κατακράτησης	10
2.3.2 Θεωρητικές πλάκες	11
2.3.3 Επιλεκτικότητα	12
2.3.4 Διαχωριστικότητα	13
2.4 Αποτελεσματικότητα της στήλης	14

#### 3. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΝΑΛΥΣΗΣ (METHOD DEVELOPMENT)

3.1 Κινητή και σταθερή φάση	16
3.2 Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων	17
3.3 Τιμή του pH της κινητής φάσης	17
3.4 Βασικές παράμετροι ανάλυσης της μεθόδου που εξαρτώνται από τις ενώσεις	18
3.4.1 Οι έννοιες $Pk_a$ και $LogP$	18
3.4.2 Φάσματα απορρόφησης UV	20
3.4.3 Προσδιορισμός των ουσιών του SPLENTIR	25

4. ΦΑΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	
4.1 Η επίδραση του pH	29
4.2 Η επίδραση της αναλογίας της σύστασης της κινητής φάσης	30
4.3 Οι χρόνοι κατακράτησης των τριών ουσιών του SPLENTIR	32
4.4 Φάσμα χρωματογραφίας του SPLENTIR	35
4.5 Υπολογισμός των βασικών παραμέτρων της χρωματογραφίας	36
5. ΔΙΑΠΙΣΤΕΥΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	
5.1 Η διαπίστευση μιας μεθόδου ανάλυσης	41
5.2 Γραμμικότητα (Linearity)	41
5.2.1 Η καμπύλη βαθμονόμησης της παρακεταμόλης	43
5.2.2 Η καμπύλη βαθμονόμησης της καφεΐνης	44
5.2.3 Η καμπύλη βαθμονόμησης του ακετυλοσαλικυλικού οξέος	45
5.3 Ακρίβεια (Accuracy)	48
5.4 Πιστότητα (Precision)	49
5.5 Περιοχή εργασίας (Working range)	51
5.6 Ανιχνευσιμότητα (Detectability)	52
5.6.1 Όριο ανιχνεύσεως (Detection Limit-LOD)	52
5.6.2 Όριο ποσοτικοποίησης (Quantitation Limit-LOQ)	54
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	55
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	57
ΛΙΣΤΑ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	58
ΛΙΣΤΑ ΠΙΝΑΚΩΝ	59
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	60

## I. ABSTRACT

The aim of the present dissertation is the development and the validation of a method for the analysis of the formulation SPLENTIR. The drug SPLENTIR is an analgesic-painkiller which is widely used in the pharmaceutical market. Despite its widespread use, there is no published validated analytical method capable to provide quantitative information on the composition of the commercial formulation. Initially the development of the analytical protocol is described, and which is based on reversed phase chromatography (HPLC). Subsequently the analytical data is statistically analyzed for the completion of the method validation.

The developed methodology is based on the optimization of three basic sets of parameters. The first one deals with the rational choice of the mobile phase for optimum chromatographic separation. The second optimized parameter is the pH of the mobile phase. The third set includes the optimization of the physical parameters and includes the pressure the temperature and the flow rate of the mobile phase. Finally the wavelength of the detector is optimized in order to obtain the best detection sensitivity for all three analytes.

The implementation of the optimized experimental conditions provides a highly consistent and accurate chromatographic method for the analysis of the pharmaceutical formulation. The use of this method is of paramount importance for the facile, accurate and expedient drug screening for market release. The total time required for the completion of the analysis of the specific formulation requires just 7 minutes. The three major chromatography peaks observed were successfully assigned to the corresponding three active compounds of the SPLENTIR formulation. More specifically it was found that the retention times for acetylsalicylic acid, the paracetamol and the caffeine are 7.0, 3.5 and 4.0 minutes respectively under the specific experimental conditions used during the developed method.

The analytical parameters that are required for the validation of the method development are i) the linearity of the method, for which calibration curves of the active compounds are calculated, ii) the accuracy of the method, iii) the precision of the method, iv) the working range, and finally v) the detection limit. The method developed for the analysis of SPLENTIR in this work was successfully validated

based on the excellent results obtained from the statistical analysis of the chromatographic data for all the validation parameters required.

## **II. ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη και διαπίστευση μεθόδου ανάλυσης του SPLENTIR. Το SPLENTIR είναι ένα παυσίπονο-αναλγητικό σκεύασμα με ευρεία κυκλοφορία στην αγορά. Στην βιβλιογραφία δεν αναφέρεται αναλυτικά κάποια πιστοποιημένη μέθοδος η οποία μπορεί να παρέχει ποσοτικές πληροφορίες για όλα τα συστατικά του σκευάσματος. Στην αρχή αναπτύσσεται η μέθοδος ανάλυσης η οποία βασίζεται στην χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Στην συνέχεια, τα πειραματικά δεδομένα και αποτελέσματα χρησιμοποιούνται για να ολοκληρωθεί η διαπίστευση της μεθόδου.

Η ανάλυση του φαρμακευτικού σκευάσματος SPLENTIR πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC). Στη συνέχεια, από τα ληφθέντα πειραματικά δεδομένα υπολογίζονται οι απαραίτητες παράμετροι που απαιτούνται για τη διαπίστευση της μεθόδου. Οι παράμετροι αυτές υπολογίζονται χρησιμοποιώντας μαθηματικούς τύπους. Η αναπτυχθείσα μεθοδολογία περιλαμβάνει δύο βασικά στάδια. Το αρχικό στάδιο αφορά επιλογή των κατάλληλων διαλυτών που χρησιμοποιούνται ως κινητή φάση στο χρωματογραφικό σύστημα. Στο δεύτερο στάδιο μελετώνται οι κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας, πίεσης και ταχύτητας ροής. Στις συνθήκες αυτές τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από τη χρωματογραφική ανάλυση πρέπει να βρίσκονται στο κατάλληλο εύρος τιμών, όπως απαιτούν οι βασικές παράμετροι της χρωματογραφίας.

Στις συγκεκριμένες αυτές συνθήκες που εφαρμόστηκαν για την ανάλυση του φαρμάκου, τα πειραματικά δεδομένα που προκύπτουν από την κάθε χρωματογραφική ανάλυση παρουσιάζουν επαναληψιμότητα και ακρίβεια. Η συνολική πειραματική διαδικασία που δημιουργήθηκε διαρκεί 7 λεπτά, κατά τη διάρκεια των οποίων εξάγονται οι κορυφές στα χρωματογραφήματα που αντιστοιχούν στις τρεις βασικές ενώσεις του φαρμάκου. Οι τρεις δραστικές ουσίες του φαρμάκου με τους αντίστοιχους χρόνους κατακράτησής τους είναι:



Το ακετυλοσαλικυλικό οξύ (σε ποσότητα 400 mg ανά δισκίο) με χρόνο κατακράτησης 7,0 λεπτά, η παρακεταμόλη (σε ποσότητα 200 mg ανά δισκίο) με χρόνο κατακράτησης 3,5 λεπτά και η καφεΐνη (σε ποσότητα 50 mg ανά δισκίο) με χρόνο κατακράτησης 4,0 λεπτά.

Τέλος, η αναλυτική διαδικασία της μεθόδου που δημιουργήθηκε διαπιστεύεται μέσω υπολογισμών των κατάλληλων παραμέτρων. Οι παράμετροι που απαιτούνται για να καταστεί ορθή η διαπίστευση είναι η γραμμικότητα, κατά την οποία υπολογίζονται οι καμπύλες βαθμονόμησης των δραστικών ουσιών του SPLENTIR, η ακρίβεια, η πιστότητα, η περιοχή εργασίας και η ανιχνευσιμότητα που υπολογίζεται μέσω των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης.

### III. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο ρόλος της ανάπτυξης μιας μεθόδου ανάλυσης ενός φαρμακευτικού σκευάσματος είναι άκρως σημαντικός για το στάδιο παραγωγής του φαρμάκου σε βιομηχανική και μη κλίμακα. Επίσης, κατά τη διαδικασία διαπίστευσης της μεθόδου συμπεριλαμβάνονται οι παράμετροι που αφορούν τη μέθοδο ανάλυσης και ελέγχονται κατά τη συνολική παραγωγή του φαρμάκου. Ένα σημαντικό στάδιο για τη διαδικασία της μεθόδου είναι η τεχνική η οποία θα χρησιμοποιηθεί για να γίνει η ανάλυση. Οι τεχνικές ανάλυσης που εφαρμόζονται για τον σκοπό αυτόν είναι πολλές, όμως η συνηθέστερη είναι αυτή της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC).

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι πολύ αποτελεσματική και χρησιμοποιείται ευρέως, ακόμα και σε βιομηχανική κλίμακα. Η τεχνική αυτή παρέχει μια άριστη ποιοτική και ποσοτική ανάλυση και είναι διαδεδομένη σε πολλούς τομείς εκ των οποίων είναι η ιατρική, η φαρμακευτική, η χημεία, η φυσική κ.α. Έχει πολλά προτερήματα σε σχέση με άλλες τεχνικές που εφαρμόζονται, ορισμένα από τα οποία είναι ο ταχύς χρόνος της πειραματικής διαδικασίας που μπορεί να επιτευχθεί, η δυνατότητα επιλογής πολλών και διαφορετικών συστατικών τα οποία χρησιμοποιούνται ως αναλύτες και η επιλογή διάφορων παραμέτρων, όπως για παράδειγμα η θερμοκρασία.

Για την ορθή ανάπτυξη της αναλυτικής διαδικασίας η οποία θα εφαρμοστεί πρέπει να ληφθούν υπόψη αρκετές παράμετροι που απαιτούνται στη χρωματογραφική ανάλυση. Οι σημαντικότερες παράμετροι είναι ο συντελεστής κατακράτησης, οι θεωρητικές πλάκες, η επιλεκτικότητα και η διαχωριστικότητα. Για μια ορθή μέθοδο ανάλυσης οι τιμές των παραμέτρων αυτών θα πρέπει να βρίσκονται σε ένα συγκεκριμένο εύρος το οποίο χαρακτηρίζει τη συνολική πειραματική διαδικασία και άμεσα καθορίζει την ακρίβεια και την ποιότητα της εκάστοτε μεθόδου.

Έπειτα, με λεπτομερή παρατήρηση και μελέτη των φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών όλων των δραστικών ουσιών του φαρμακευτικού σκευάσματος SPLENTIR θα δημιουργηθεί η πειραματική διαδικασία ανάλυσης του. Η πειραματική αυτή διαδικασία θα έχει τη δυνατότητα να αναλύει αποτελεσματικά τις ενώσεις του

φαρμακευτικού σκευάσματος, λαμβάνοντας τα κατάλληλα χρωματογραφήματα και το σύνολο της διαδικασίας αυτής θα αποτελεί τη μέθοδο ανάπτυξης του φαρμάκου.

Συνθήκες μέγιστης σημασίας για την πειραματική διαδικασία της μεθόδου αποτελούν η τιμή του pH, η θερμοκρασία, η σύσταση της κινητής φάσης η οποία καθορίζει το χρόνο της πειραματικής διαδικασίας, και το μήκος κύματος στο οποίο θα λειτουργεί ο UV-Vis ανιχνευτής. Η αναλυτική μέθοδος ολοκληρώνεται αφού καθοριστούν όλοι οι παραπάνω παράγοντες οι οποίοι είναι απαραίτητοι να οριστούν στη συνολική πειραματική διαδικασία, και εν συνεχεία η μέθοδος ανάλυσης πρέπει να διαπιστευτεί για να θεωρηθεί αξιόπιστη.

Η διαδικασία της διαπίστευσης μιας μεθόδου αποτελείται από διάφορες μετρήσεις οι οποίες προκύπτουν από μαθηματικούς-στατιστικούς τρόπους ανάλυσης. Σημαντικότερες από αυτές είναι η γραμμικότητα, η οποία εκφράζεται ως την ικανότητα να εξαχθούν τα αποτελέσματα μέσω μαθηματικών μετατροπών ανάλογα των συγκεντρώσεων σε ένα ορισμένο εύρος.

Η γραμμικότητα ορίζεται συνήθως με τη χρήση της καμπύλης βαθμονόμησης για την κάθε δραστική ουσία.

Η ακρίβεια αποτελεί το μέτρο εγγύτητας της πειραματικής τιμής προς την πραγματική/αληθινή τιμή. Καθορίζεται από την ορθότητα μεταξύ της μέσης τιμής (η οποία λαμβάνεται από τα πειραματικά αποτελέσματα) και της θεωρητικής τιμής.

Η πιστότητα εκφράζει την εγγύτητα μεταξύ των μετρήσεων μέσω της επαναληψιμότητας που παρατηρήθηκε στην πειραματική διαδικασία.

Η ανιχνευσιμότητα μιας μεθόδου εκφράζει την ικανότητά της να ποσοτικοποιεί χαμηλές συγκεντρώσεις μιας ουσίας που περιέχονται στο φαρμακευτικό σκεύασμα.

Έχοντας ολοκληρώσει τα παραπάνω μπορούμε να έχουμε μια ολοκληρωμένη αναλυτική πειραματική μέθοδο η οποία θα είναι ακριβής και κατάλληλη για τις συγκεκριμένες δραστικές ουσίες οι οποίες περιέχονται στο φαρμακευτικό σκεύασμα το οποίο αναλύεται.

## **1. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΣΤΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ**

### **1.1 Ανάλυση των φαρμακευτικών σκευασμάτων**

Ως φάρμακα ορίζονται τα έτοιμα προϊόντα, δηλαδή οι τελικές φαρμακοτεχνικές μορφές, οι οποίες προορίζονται για άμεση χορήγηση στον ασθενή. Ένας μεγάλος αριθμός φαρμάκων εισέρχεται κάθε έτος στην αγορά, όπου τα φάρμακα αυτά είτε αποτελούν βελτιστοποίηση παλαιότερων φαρμάκων είτε είναι νέα φάρμακα. Σε κάθε περίπτωση όμως είναι απαραίτητη η ανάπτυξη μιας μεθόδου ανάλυσης για το κάθε σκεύασμα και η διαπίστευση της για κάθε ένα από αυτά. [1]

Οι θεραπευτικές ιδιότητες των φαρμακευτικών προϊόντων οφείλονται κυρίως στα δραστικά συστατικά που περιέχουν. Οι δραστικές ουσίες σε συνδυασμό με τα συνυπάρχοντα έκδοχα αποτελούν τις πρώτες ύλες για την παρασκευή του εκάστοτε σκευάσματος. Μέσω της φαρμακευτικής χημείας, η οποία αναφέρεται τόσο στη διαδικασία συνθέσεως όσο και στην ανάλυση των δραστικών ενώσεων, μπορεί να καταστεί δυνατή μια πλήρης μελέτη για κάθε φαρμακευτικό σκεύασμα.

Η μέθοδος ανάλυσης του φαρμάκου διαδραματίζει τον σημαντικότερο ρόλο που αφορά στην ανακάλυψη, την ανάπτυξη και την κατασκευή του φαρμακευτικού προϊόντος. Εν συνεχεία, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο για τον ποιοτικό έλεγχο που αφορά το φαρμακευτικό σκεύασμα. Ο ποιοτικός έλεγχος θα εξασφαλίσει την ποιότητα και την απόδοση του κάθε σκευάσματος και θα το καταστήσει ασφαλές ως φαρμακευτικό προϊόν για να κυκλοφορήσει στην αγορά. Η Φαρμακευτική ανάλυση η οποία ασχολείται με τον έλεγχο της ταυτότητας, της καθαρότητας και της περιεκτικότητας των δραστικών συστατικών, τόσο στις πρώτες ύλες, όσο και στα έτοιμα προϊόντα, τείνει σήμερα να διαφοροποιηθεί σε έναν ιδιαίτερο κλάδο της φαρμακευτικής επιστήμης.[1, 2]

Η φαρμακευτική βιομηχανία, αποτελεί έναν από τους περισσότερο ενεργούς τομείς που χρησιμοποιούν ως μέσο ανάπτυξης τον κλάδο της αναλυτικής χημείας και πιο συγκεκριμένα την εφαρμογή αναλυτικών μεθόδων.[3] Αυτό παρατηρείται γιατί μέσω των αναλυτικών αυτών τεχνικών μπορεί να επιλεγεί ο καταλληλότερος τρόπος επεξεργασίας για κάθε φάρμακο. Μελετώντας τις φυσικές και χημικές ιδιότητες των

εκάστοτε δραστικών ουσιών επιλέγεται ανάλογα και η τεχνική η οποία θα χρησιμοποιηθεί για την διαδικασία της ανάλυσης.

## **1.2 Ανάπτυξη της μεθόδου ανάλυσης ενός φαρμακευτικού σκευάσματος**

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω σε κάθε νέο φαρμακευτικό σκεύασμα ή σε μια βελτιστοποιημένη έκδοση ενός προϋπάρχοντος φαρμάκου είναι απαραίτητη η ανάπτυξη της μεθόδου ανάλυσης.[4, 5] Μια επιτυχής μέθοδος ενόργανης ανάλυσης ενός φαρμάκου είναι άκρως σημαντική εφόσον αποτελεί σημαντικό παράγοντα για να διεξαχθούν οι ιατρικές και βιοχημικές ερευνητικές μελέτες, οι οποίες σχετίζονται με τις δραστικές ουσίες που περιέχονται στο φαρμακευτικό σκεύασμα.

Οι βασικοί λόγοι για τους οποίους αναπτύσσεται μια νέα μέθοδος ανάλυσης ενός φαρμάκου είναι οι παρακάτω:

1. Η δραστική ουσία του φαρμάκου ή ο συνδυασμός των δραστικών ουσιών που χρησιμοποιούνται στο φαρμακευτικό σκεύασμα μπορεί να μην είναι διαθέσιμο σε καμία πιστοποιημένη βιβλιοθήκη φαρμάκων (φαρμακοποιία).[6]
2. Η μέθοδος κάποιου φαρμάκου ενώ είναι δημοσιευμένη σε κάποια φαρμακοποιία, να έχει δηλωθεί ως ευρεσιτεχνία και κανονισμοί που υπάρχουν να μην επιτρέπουν τη χρησιμοποίησή της από άλλους επιστήμονες.
3. Η πηγή από την οποία εξήχθη μια μέθοδος μπορεί να μη θεωρείται αξιόπιστη.
4. Η πειραματική διαδικασία της μεθόδου να είναι αρκετά χρονοβόρα, γεγονός που αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα σε μια μέθοδο ανάπτυξης.
5. Η υπάρχουσα μέθοδος ίσως απαιτεί ακριβά αντιδραστήρια και γενικότερα να απαιτεί συνολικά μια ακριβή μέθοδο ανάλυσης.

Απαραίτητο χαρακτηριστικό μιας μεθόδου είναι να είναι ταχεία, δηλαδή ο συνολικός χρόνος που απαιτείται για να ολοκληρωθεί η ανάλυση να είναι μικρός. Το κόστος των αντιδραστηρίων και όλης της διαδικασίας πρέπει να είναι μικρό. Επίσης, όλα αντιδραστήρια θα πρέπει να είναι εύκολα διαθέσιμα και το σημαντικότερο από όλα είναι να είναι η μέθοδος ακριβής, όσον αφορά παραμέτρους διαπίστευσης (γραμμικότητα, πιστότητα, ακρίβεια, ανιχνευσιμότητα).

Για την διαπίστευση της κάθε μεθόδου ανάπτυξης είναι αρμόδιοι συγκεκριμένοι οργανισμοί. Οι οργανισμοί αυτοί εξετάζουν τις συνολικές παραμέτρους της

διαδικασίας μέσω ειδικών στατιστικών και άλλων μετρήσεων οι οποίες χρησιμοποιούνται για την διεκπεραίωση της διαπίστευσης.

### **1.3 Ο ρόλος του Εθνικού Οργανισμού Φαρμάκων (ΕΟΦ)**

Στην Ελλάδα για την τήρηση της σωστής ανάπτυξης και λειτουργίας των ανωτέρω αρμόδιος οργανισμός είναι ο Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων.[7] Αποστολή του ΕΟΦ είναι η προστασία των πολιτών σε σχέση με τη χρήση και την κυκλοφορία φαρμακευτικών προϊόντων. Οι βασικές αρμοδιότητες του ΕΟΦ είναι να:

1. Αξιολογεί και εγκρίνει νέα ασφαλή και αποτελεσματικά προϊόντα.
2. Παρακολουθεί την ποιότητα και την αποτελεσματικότητα των προϊόντων κατά την κυκλοφορία τους στη χώρα.
3. Ελέγχει την παραγωγή και τις κλινικές μελέτες στην αγορά προκειμένου να τηρούνται οι κανόνες ορθής παραγωγής, εργαστηριακής και κλινικής πρακτικής.
4. Αναπτύσσει την ιατρική και φαρμακευτική έρευνα.
5. Ενημερώνει τους αρμόδιους φορείς με χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τα φαρμακευτικά προϊόντα.

Όσον αφορά ερευνητικά θέματα που περιλαμβάνουν την ανάπτυξη φαρμακευτικών σκευασμάτων ο ΕΟΦ επικουρείται στο έργο του από την θυγατρική του εταιρεία ΙΦΕΤ (Ινστιτούτο Φαρμακευτικής Έρευνας και Τεχνολογίας).[8] Ο βασικός σκοπός της εταιρείας είναι η ανάπτυξη τεχνογνωσίας και η παροχή εξειδικευμένων υπηρεσιών στον τομέα των φαρμάκων. Για το λόγο αυτό οποιαδήποτε διαπίστευση που αφορά φαρμακευτική ανάλυση πρέπει να πληρεί ορισμένα κριτήρια σύμφωνα με τις μονογραφίες της ισχύουσας έκδοσης Ευρωπαϊκής (ΕΡ), Ελληνικής (ΕΦ), Βρετανικής (ΒΡ) και Αμερικανικής (USP) Φαρμακοποιίας.

#### **1.4 Ανάλυση των φαρμακευτικών σκευασμάτων χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (HPLC)**

Η ανίχνευση και ο προσδιορισμός διαφόρων ουσιών σε φαρμακευτικά σκευάσματα κατά την παραγωγική διαδικασία γίνεται με χρήση διαφόρων τεχνικών. Οι διαδικασίες αυτές πραγματοποιούνται συνήθως με τη μέθοδο της χρωματογραφίας [9-16], με φασματομετρία υπεριώθρου [17, 18], με φασματοσκοπία NMR [19, 20], με φασματομετρία ατομικής απορρόφησης και ατομικού φθορισμού κ.α. [21, 22]

Για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των δραστικών συστατικών και συγγενών ουσιών τους χρησιμοποιείται η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)-(UV-Vis). Η μέθοδος αυτή προβλέπεται από το Ινστιτούτο Φαρμακευτικής Έρευνας και Τεχνολογίας, και χρησιμοποιείται επίσης και για τον έλεγχο της ομοιομορφίας του φαρμάκου.

Τα πλεονεκτήματα της HPLC [23] έναντι άλλων τεχνικών ανάλυσης είναι κυρίως:

- Η ταχύτητα, όπου η πειραματική διαδικασία της περισσότερες φορές ολοκληρώνεται σε λιγότερο από 20 λεπτά.
- Η ευαισθησία της διότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλοί διαφορετικοί ανιχνευτές.
- Η μεγάλη επιλογή που υπάρχει σε αναλύτες της κινητής και της στατικής φάσης.
- Ο εύκολος χειρισμός και η εύκολη συντήρηση των εκάστοτε δειγμάτων.
- Η αυτοματοποίηση που υπάρχει στο όργανο και μειώνει στο ελάχιστο τον ανθρώπινο απαιτούμενο χρόνο.
- Η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα που παρέχει.
- Η χρήση της τεχνικής αυτής σε μεγάλη κλίμακα, ακόμα και βιομηχανική κλίμακα.
- Οι στήλες ανάλυσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλές φορές, δεν απαιτούν γρήγορη αντικατάσταση.
- Είναι ιδανική για εφαρμογές σε ουσίες με υψηλή αστάθεια.

Οι λόγοι αυτοί καθιστούν την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές για μελέτες ανάλυσης φαρμακευτικών σκευασμάτων.

## **2. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (RP-HPLC)**

### **2.1 Εισαγωγή στην υγρή χρωματογραφία**

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι μια από τις περισσότερο διαδεδομένες τεχνικές ανάλυσης και διαχωρισμού ουσιών. Οι λόγοι που καθιστούν την τεχνική αυτή γενικά αποδεκτή είναι κυρίως η ευαισθησία της, η δυνατότητα προσαρμογής της σε ακριβείς προσδιορισμούς καθώς και το ευρύ φάσμα εφαρμογής της σε διάφορους κλάδους της επιστήμης όπως είναι η βιολογία, η χημεία και η φυσική.[24-30]

Η βασική αρχή της διαδικασίας της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αποτελείται από ένα βασικό σύστημα ανάλυσης κατά το οποίο ο αναλύτης εξαρτάται άμεσα από τις υπάρχουσες μοριακές συμπεριφορές και αλληλεπιδράσεις των εκάστοτε δειγμάτων. Δύο είναι οι βασικές πτυχές από αποτελούν τη θεωρία της τεχνικής αυτής, η κινητική θεωρία και η θερμοδυναμική θεωρία. Η κινητική θεώρηση χαρακτηρίζει το εύρος της ανάλυσης και τον ποσοτικό προσδιορισμό αυτού. Η θερμοδυναμική θεώρηση έχει σχέση με το χρόνο κατακράτησης της ουσίας μέσα στη στήλη. Από αναλυτική σκοπιά, το χρωματογράφημα εξαρτάται άμεσα από τους δυο αυτούς παράγοντες. Πρακτικά η κινητική θεώρηση καθορίζει το πλάτος του χρωματογραφήματος, ενώ η θερμοδυναμική θεώρηση καθορίζει τη μέγιστη θέση του διαγράμματος της χρωματογραφικής ανάλυσης.[31]

Γενικότερα, μια ανάλυση υγρής χρωματογραφίας επηρεάζεται από τους παρακάτω παράγοντες:

- Στήλες
- Θερμοκρασία
- Ταχύτητες ροής της κινητής φάσης

Κάθε μια από τις παραπάνω παραμέτρους συσχετίζεται με:

- Το συνολικό χρόνο ανάλυσης
- Την πίεση στα άκρα της στήλης
- Την απόδοση της στήλης

Η αποτελεσματικότητα της υγρής χρωματογραφίας εξαρτάται επίσης και από τη γεωμετρία του μορίου-αναλύτη. Αφετέρου ο χρόνος κατακράτησης της ουσίας όπως και η επιλεκτικότητα της στήλης εξαρτώνται κυρίως από τις εκάστοτε



αλληλεπιδράσεις των ουσιών που πραγματοποιούνται στο σύστημα. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές εξαρτώνται άμεσα από τη χημική σύσταση των ουσιών, τη θερμοκρασία κατά την οποία λαμβάνει χώρα η πειραματική διαδικασία και τη φύση της κινητής φάσης.

## 2.2 Οργανολογία της HPLC

Η διάταξη ενός συστήματος υγρής χρωματογραφίας, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 1 αποτελείται συνήθως από τα παρακάτω βασικά στοιχεία [32]

1. Δοχεία της κινητής φάσης συνδεδεμένα με συστήματα επεξεργασίας των διαλυτών. Το σύστημα αποτελείται από δύο γυάλινα δοχεία που περιέχουν 200 ως 1000 ml διαλύτη. Τα δοχεία είναι συνδεδεμένα με ένα σύστημα απομάκρυνσης των διαλυμένων αερίων έτσι ώστε να παρεμποδίζεται ο σχηματισμός φυσαλίδων. Οι φυσαλίδες εμποδίζουν τη σωστή λειτουργία του ανιχνευτή και προκαλούν διεύρυνση των κορυφών του χρωματογραφήματος, επομένως δημιουργούν πρόβλημα στην πειραματική ανάλυση οπότε πρέπει να αφαιρούνται.

2. Σύστημα άντλησης, το οποίο αποτελείται από παλινδρομικές αντλίες. Οι παλινδρομικές αντλίες είναι αυτές που χρησιμοποιούνται συχνότερα σε εφαρμογές χρωματογραφίας. Αποτελούνται από ένα μικρό θαλαμίσκο στον οποίο ο διαλύτης αντλείται παλινδρομικά από ένα κινούμενο έμβολο μέσω δύο βαλβίδων οι οποίες ανοιγοκλείνουν, ελέγχοντας έτσι τη ροή του διαλύτη. Η αντλία είναι το μέσο εκείνο το οποίο προσδίδει κίνηση στην κινητή φάση διαμέσου της χρωματογραφικής στήλης. Στις σύγχρονες αναλυτικές μεθόδους απαιτείται ο προσδιορισμός ολοένα και μικρότερων ποσοτήτων των ουσιών. Το γεγονός αυτό καθιστά την αντλία σημαντικό παράγοντα, ο οποίος θα πρέπει να είναι σταθερός (να μην υπάρχουν μεταβολές στη ροή της κινητής φάσης), γιατί αυτό δημιουργεί προβλήματα ασυμμετρίας στις κορυφές που υπάρχουν στα χρωματογραφήματα. Τα βασικά χαρακτηριστικά που πρέπει να διαθέτει μια αντλία είναι να μπορεί να αναπτύσσει υψηλές πιέσεις, να έχει σταθερότητα στην ταχύτητα ροής και να είναι ανθεκτική.

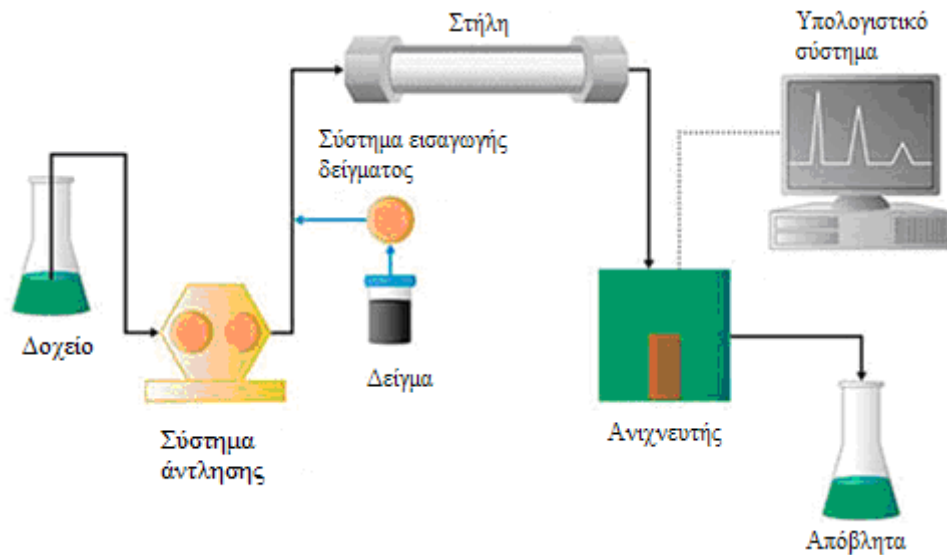
3. Συστήματα εισαγωγής των δειγμάτων, τα οποία είναι ρυθμισμένα κατάλληλα για να ελέγχουν την ποσότητα του διαλύτη ο οποίος θα εισέλθει στη στήλη. Τα πιο σημαντικά προβλήματα στη χρωματογραφία δημιουργούνται από τον τρόπο εισαγωγής του δείγματος στις στήλες. Στα σύγχρονα χρωματογραφικά συστήματα

HPLC υπάρχει αυτοματοποιημένο σύστημα έγχυσης με το οποίο εισέρχεται μικρός όγκος διαλύτη, συνήθως είναι μερικές δεκάδες  $\mu\text{l}$ , οπότε αποφεύγεται η διεύρυνση των κορυφών του χρωματογραφήματος που λαμβάνεται στο πέρας της ανάλυσης.

4. Οι στήλες χρωματογραφίας αποτελούν το κατεξοχήν τμήμα της χρωματογραφικής διάταξης, είναι κυρίως σωληνοειδούς μορφής με μικρή διάμετρο και συνηθέστερα είναι κατασκευασμένες από ανοξείδωτο χάλυβα. Η ορθή επιλογή της αναλυτικής στήλης αποτελεί τον βασικότερο παράγοντα για έναν σωστό διαχωρισμό. Το εσωτερικό μέρος της αναλυτικής στήλης θα πρέπει να είναι λείο γιατί οι τραχείς επιφάνειες μειώνουν τον αριθμό των θεωρητικών πλακών και τα αποτελέσματα της ανάλυσης δεν είναι σε αποδεκτά όρια-τιμές. Η ταχύτητα, η διαχωριστικότητα και η χωρητικότητα της στήλης είναι οι τρεις βασικές παράμετροι που εξετάζονται για τον σχεδιασμό μιας χρωματογραφικής στήλης όπου καθορίζουν τα χαρακτηριστικά ποιότητας και την απόδοση της στήλης. Το είδος της στήλης εξαρτάται από το εκάστοτε υλικό πλήρωσης είτε από τις διαστάσεις της στήλης

5. Ανιχνευτές, οι οποίοι είναι διαφόρων ειδών όπως ανιχνευτές ορατού-υπεριώδους, παράταξης φωτοδιόδων, αγωγιμομετρικοί, ηλεκτροχημικοί, φθορισμομετρικοί κ.ά. Στους ανιχνευτές ορατού-υπεριώδους η απορρόφηση ακτινοβολίας από μια χημική ένωση εξαρτάται από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας και τις ομάδες της χημικής ένωσης. Το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο, ανάλογα με την ενέργεια (συχνότητα) που αλληλεπιδρά με τα ηλεκτρόνια, προκαλεί τη διέγερση και μεταφορά τους σε υψηλότερα ενεργειακά επίπεδα, ή ακόμα προκαλεί δόνηση ή περιστροφή μοριακών δεσμών ορισμένων ομάδων της ένωσης. Στην παρούσα μελέτη το σύστημα περιλαμβάνει ανιχνευτή απορρόφησης με φίλτρο στην υπεριώδη περιοχή (ανιχνευτής UV).

6. Συστήματα λήψεως και επεξεργασίας δεδομένων, όπου συνήθως αποτελούνται από έναν καταγραφέα, στον οποίο λαμβάνεται το τελικό διάγραμμα και συνδέεται με ένα υπολογιστικό σύστημα μέσω του οποίου γίνεται η επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Ο ρόλος του καταγραφέα είναι να παρουσιάζει και να ποσοτικοποιεί τις λαμβανόμενες χρωματογραφικές κορυφές.



Σχήμα 1: Τυπική διάταξη οργανολογίας της υγρής χρωματογραφίας.

### 2.3 Βασικές παράμετροι υγρής χρωματογραφίας

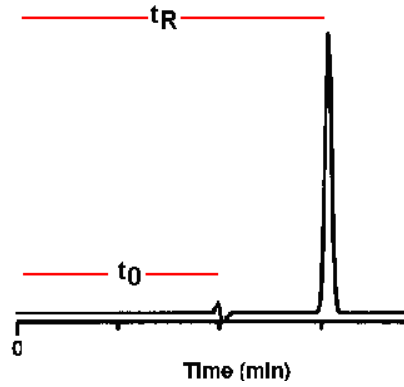
Για να θεωρηθεί κατάλληλο ένα χρωματογραφικό σύστημα ανάλυσης τα βασικά χαρακτηριστικά που πρέπει να εξεταστούν είναι: ο συντελεστής κατακράτησης ( $k'$ ), οι θεωρητικές πλάκες ( $N$ ), η επιλεκτικότητα ( $\alpha$ ) και ο διαχωρισμός των κορυφών ( $R$ ).

#### 2.3.1 Συντελεστής κατακράτησης

Ο συντελεστής κατακράτησης είναι μια παράμετρος η οποία εκφράζει τον λόγο του χρόνου κατακράτησης μιας ουσίας σε ένα χρωματογραφικό σύστημα κάτω υπό συγκεκριμένες συνθήκες.[39]

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

Ο συντελεστής κατακράτησης υπολογίζεται από το χρόνο καθυστέρησης της ουσίας  $t_r$  και το χρόνο του συστήματος  $t_0$  (dead time) του χρωματογραφήματος, όπως παρατηρείται στο Σχήμα 2.



Σχήμα 2: Ο συντελεστής κατακράτησης ( $k'$ )

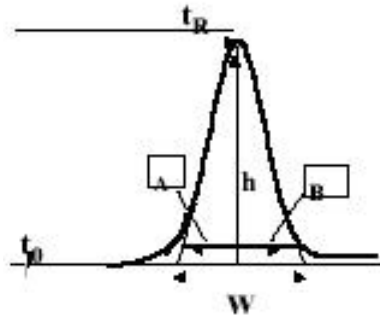
Η μέτρηση της παραμέτρου του συντελεστή κατακράτησης δίνει το πλεονέκτημα ότι και ο χρόνος κατακράτησης της ουσίας και ο χρόνος κατακράτησης του αναλύτη επηρεάζονται ταυτόχρονα και με τον ίδιο τρόπο από πιθανές αλλαγές οι οποίες πραγματοποιούνται στην ταχύτητα ροής.

### 2.3.2 Θεωρητικές πλάκες

Οι θεωρητικές πλάκες ορίζουν την αποδοτικότητα της κάθε στήλης ( $N$ ) και είναι ουσιαστικά το μέτρο του βαθμού της μέγιστης διασποράς της στήλης. Ορίζει το εύρος της διασποράς και η αποδοτικότητα εκφράζεται με τον αριθμό των θεωρητικών αυτών πλατών ως:[40]

$$N = 16 \times \left( \frac{t_r}{w} \right)^2$$

Όπως φαίνεται στον παραπάνω μαθηματικό τύπο χρειαζόμαστε το εύρος της κορυφής και την τιμή του χρόνου κατακράτησης. Σε ένα διάγραμμα χρωματογραφίας για τον υπολογισμό της τιμής των θεωρητικών πλακών χρησιμοποιούνται τα χαρακτηριστικά της κορυφής που εξήχθη από την ανάλυση, Σχήμα 3.



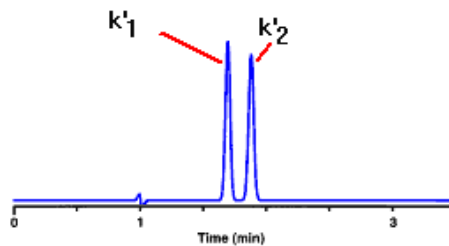
Σχήμα 3: το εύρος της κορυφής και ο χρόνος κατακράτησης για τον υπολογισμό των θεωρητικών πλακών

Όπου  $t_r$ : χρόνος κατακράτησης της ουσίας και  $w$ : το εύρος της κορυφής

Οι στήλες που θεωρούνται κατάλληλες στην υγρή χρωματογραφία έχουν αριθμό θεωρητικών πλακών (αποδοτικότητα), ο οποίος κυμαίνεται από 5.000 έως 100.000 θεωρητικές πλάκες/μέτρο.

### 2.3.3 Επιλεκτικότητα

Η επιλεκτικότητα έγκειται στο γεγονός ότι ένα δείγμα που αναλύεται μπορεί να εμφανίζει περισσότερες από μία κορυφές που η κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε μια δραστική ουσία. Για την παράμετρο της επιλεκτικότητας υπολογίζουμε τον λόγο των συντελεστών κατακράτησης των κορυφών, Σχήμα 4.[39]



Σχήμα 4: Η επιλεκτικότητα υπολογίζεται από τους συντελεστές κατακράτησης των κορυφών.

Βάση αυτού του διαγράμματος υπολογίζουμε το συντελεστή κατακράτησης της κάθε ουσίας και η επιλεκτικότητα εκφράζεται ως τον λόγο των συντελεστών αυτών.

$$a = \frac{k_2'}{k_1'}$$

Όπως συμβαίνει με τον συντελεστή κατακράτησης έτσι και η επιλεκτικότητα εξαρτάται αποκλειστικά από τη θερμοκρασία και από τα χαρακτηριστικά της στατικής και κινητής φάσης.

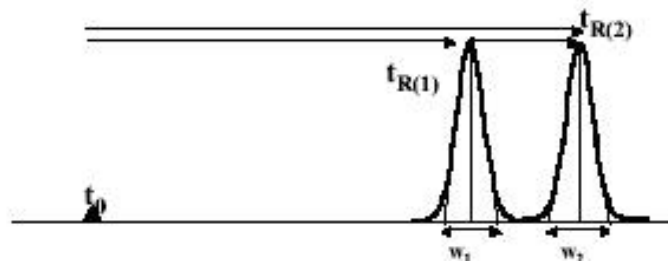
### 2.3.4 Διαχωριστικότητα

Για το διαχωρισμό των κορυφών που υπάρχουν σε ένα υπό ανάλυση δείγμα, χρησιμοποιείται ο παρακάτω μαθηματικός τύπος:

$$R = 2 \times \frac{t_2 - t_1}{w_2 + w_1}$$

Όπου,  $t_1$ : ο χρόνος κατακράτησης της πρώτης κορυφής,  $t_2$ : ο χρόνος κατακράτησης της δεύτερης κορυφής,  $w_1$ : το εύρος της πρώτης κορυφής,  $w_2$ : το εύρος της δεύτερης κορυφής.

Σχηματικά, το διάγραμμα που εξετάζεται για την μέτρηση της διαχωριστικότητας παρατίθεται παρακάτω στο Σχήμα 5.



Σχήμα 5: Χρωματογράφημα με τους αριθμητικούς συντελεστές που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της διαχωριστικότητας.

## 2.4 Αποτελεσματικότητα της στήλης

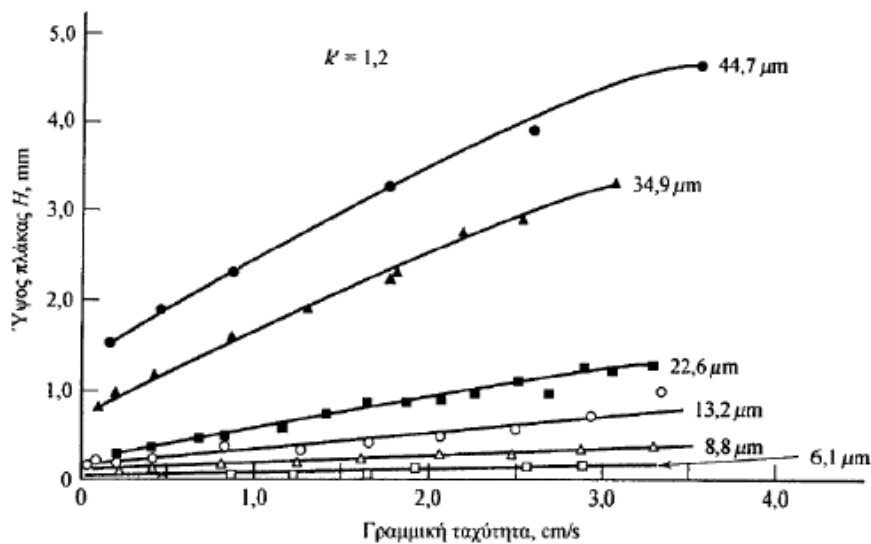
Εξαιρετικής σημασίας παράγοντα αποτελεί το μέγεθος των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης της στήλης. Για το λόγο αυτό έχει διατυπωθεί μαθηματικά η εξίσωση Van Deemter [33] η οποία προσεγγίζει τη συμπεριφορά των στηλών που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία.

Η εξίσωση είναι η εξής:

$$H = \frac{A + B}{u} + C \times u = \frac{A + B}{u} + (C_s + C_m) \times u$$

Όπου H είναι το ύψος της πλάκας, u η ταχύτητα της κινητής φάσης και A, B, C είναι συντελεστές πολλαπλότητας διαδρομών ροής, διαμήκους διάχυσης και μεταφοράς μάζας μεταξύ φάσεων αντίστοιχα.

Το παρακάτω διάγραμμα στο Σχήμα 6 αναπαριστά την επίδραση του μεγέθους των σωματιδίων της στήλης και της ροής πάνω στο ύψος H της θεωρητικής πλάκας.



Σχήμα 6: Διάγραμμα βασισμένο στην εξίσωση Van Deemter.

Γενικότερα, αποτελεί γεγονός ότι η χρήση μιας στήλης μικρού μήκους ελαττώνει το χρόνο διαχωρισμού των ουσιών ενώ ταυτόχρονα μειώνεται η διαχωριστικότητα λόγω της μείωσης του αριθμού των θεωρητικών πλακών. Η πρώτη κατηγορία είναι η χρωματογραφία κανονικής φάσης (normal phase chromatography) [34], όπου κατά κύριο λόγο οι στατικές φάσεις είναι υψηλής πολικότητας και κατακρατούνται σε σωματίδια πυριτίου, ενώ ως κινητή φάση χρησιμοποιείται μη πολικός διαλύτης. Η δεύτερη κατηγορία είναι αυτή της χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης (reversed phase chromatography) [35] κατά την οποία η στατική φάση περιέχει συνήθως υδρογονάνθρακες, που είναι μη πολική φάση και η κινητή φάση είναι ένας πολικός διαλύτης.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιούμε υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, κατά την οποία η στήλη που χρησιμοποιείται περιέχει υλικό πλήρωσης αντίστροφης φάσης και είναι μια αλυσίδα C<sub>18</sub> (δεκαοκτύλιο), η οποία είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη στήλη σε χρωματογραφικές αναλύσεις.[36-38] Το μήκος της αλυσίδας του υλικού πλήρωσης που περιέχεται σε κάθε στήλη επιδρά άμεσα στο χρωματογράφημα. Το αποτέλεσμα είναι να έχουμε μεγαλύτερη ικανότητα κατακράτησης κατά συνέπεια ο χρόνος περάτωσης της χρωματογραφικής ανάλυσης μειώνεται σημαντικά με την αύξηση του μήκους της αλυσίδας της στήλης.



### 3. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΝΑΛΥΣΗΣ (METHOD DEVELOPMENT)

Για την ανάπτυξη μιας χρωματογραφικής μεθόδου ανάλυσης ενός φαρμακευτικού σκευάσματος απαιτείται η εύρεση των κατάλληλων χρωματογραφικών συνθηκών. Οι κατάλληλες συνθήκες επιτρέπουν να επιτευχθεί ο βέλτιστος διαχωρισμός των δραστικών ουσιών του φαρμάκου για το οποίο εφαρμόζεται η μέθοδος ανάλυσης. Για να είναι ακριβής ο ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός των κορυφών των χρωματογραφημάτων, όπου η κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε μία δραστική ουσία, ελέγχονται το ύψος και το εμβαδόν της κάθε κορυφής αντίστοιχα. Μια σημαντική παράμετρος είναι η θερμοκρασία που εφαρμόζεται στο σύστημα. Τα πειράματα γίνονται σε θερμοκρασία 30 °C, όπου έχει ρυθμιστεί στο όργανο .

Οι βασικότερες συνθήκες που ελέγχονται είναι τρεις, η κινητή και στατική φάση της χρωματογραφικής ανάλυσης, η παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων και η τιμή του pH της κινητής φάσης.

#### 3.1 Κινητή και στατική φάση

Για τη στατική φάση της χρωματογραφικής ανάλυσης επιλέχθηκε η στατική φάση τύπου C<sub>18</sub> . Η στατική αυτή φάση έχει ένα μεγάλο εύρος εφαρμογών τόσο σε βιομηχανική κλίμακα όσο και σε εργαστήρια χημικών αναλύσεων. Ο λόγος που η στήλη αυτή χρησιμοποιείται τόσο ευρέως είναι επειδή περιέχει τόσο άπολα όσο και πολικά τμήματα και μπορεί να αναλύσει ουσίες με μεγάλα μοριακά βάρη. Χαρακτηριστικό της επίσης είναι ότι είναι αρκετά ανθεκτική και έχει μεγάλο χρόνο ζωής.

Για την επιλογή της κινητής φάσης έγιναν αρκετά πειράματα ανάλυσης τα οποία ελέχθησαν για την ποιότητα των λαμβανόμενων κορυφών. Τελικά επιλέχθηκε η σύσταση της κινητής φάσης να είναι ακετονιτρίλιο-νερό σε αναλογία 25:75. Στις διάφορες αναλύσεις που έγιναν για την επιλογή της σύστασης της κινητής φάσης παρατηρήθηκαν μη αποδεκτές μορφές κορυφών, οι οποίες ήταν ογκώδεις και ασύμμετρες. Επίσης εμφανίστηκαν φαινόμενα συνέκλουσης κατά τα οποία δύο κορυφές εμφανίζονται ταυτόχρονα. Τέλος, σε αρκετά πειράματα οι κορυφές καθυστερούσαν πολύ να εμφανιστούν.

Ένας ακόμα σημαντικός παράγοντας για τη σωστή επιλογή της μεθόδου ανάλυσης είναι το κόστος των διαλυτών που χρησιμοποιούνται ως κινητή φάση στην πειραματική διαδικασία. Μια οικονομική επιλογή είναι διαλύτες όπως το νερό ή η αιθανόλη. Με την επιλογή της σύστασης 25:75 ακετονιτρίλιο-νερό, επειδή ως διαλύτες το νερό και το ακετονιτρίλιο είναι αρκετά οικονομικοί, το οικονομικό κόστος που θα χρειαστεί στην κινητή φάση είναι μικρό. Η σύσταση και η αναλογία της κινητής και στατικής φάσης καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τον συνολικό χρόνο της πειραματικής διαδικασίας. Ο χρόνος στις φαρμακευτικές αναλύσεις φαρμάκων δραστικών ουσιών θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν ελάχιστος. Με την επιλογή της συγκεκριμένης αναλογίας κινητής φάσης ακετονιτριλίου-νερού και με τη στήλη C<sub>18</sub> ως στατική φάση, η συνολική πειραματική διαδικασία χρωματογραφικής ανάλυσης ανέρχεται στα 7 λεπτά. Στο χρονικό αυτό διάστημα εμφανίζονται όλες οι κορυφές των δραστικών ουσιών, γεγονός εξαιρετικής σημασίας εφόσον οι περισσότερες χρωματογραφικές αναλύσεις σε μείγματα φαρμάκων χρειάζονται κατά μέσο όρο 20 με 30 λεπτά.

### **3.2 Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων**

Οι τρεις δραστικές ουσίες του φαρμακευτικού σκευάσματος (παρακεταμόλη, ακετυλοσαλικυλικό οξύ, καφεΐνη) είναι διαλυτές στο νερό και κατά συνέπεια δεν εμφανίζουν δυσκολία που αφορά την εύρεση αντίστοιχου διαλύτη. Ο διαλύτης που επιλέχθηκε για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων είναι η ίδια η κινητή φάση, γεγονός που απλοποιεί σε μεγάλο βαθμό την αναλυτική μέθοδο επειδή δεν απαιτείται περαιτέρω χρόνος και κόστος.

### **3.3 Τιμή του pH της κινητής φάσης**

Η τιμή του pH της κινητής φάσης σε συνδυασμό με τη σύστασή της επηρεάζει σημαντικά την αναλυτική πειραματική διαδικασία και κατά συνέπεια τη μορφή των κορυφών του χρωματογραφήματος. Το μη σταθερό pH το οποίο δεν έχει ρυθμιστικό διάλυμα συνήθως έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση πλατιών κορυφών ή κορυφών με ουρές στα χρωματογραφήματα. Η κατάλληλη ρύθμιση του pH αποτελεί καίριο

παράγοντα για την εξαγωγή κορυφών ορθής μορφής οι οποίες λαμβάνονται στο χρωματογράφημα.

Μετά από αρκετές αναλύσεις χρησιμοποιώντας διάφορες τιμές pH επιλέχθηκε η τιμή κατά την οποία εξάγονται εξαιρετικής ποιότητας κορυφές όσον αφορά το εύρος τους και τη γενικότερη μορφή τους. Η τιμή αυτή αντιστοιχεί σε τιμή  $\text{pH}=2,46$ .

### 3.4 Βασικές παράμετροι ανάλυσης της μεθόδου που εξαρτώνται από τις ενώσεις

Για την ορθή ανάπτυξη μιας μεθόδου που προκύπτει μέσω της χρωματογραφικής ανάλυσης ενός φαρμάκου πρέπει να καθοριστούν και να ληφθούν υπόψην αρκετοί παράγοντες.[3, 41-43]

Οι βασικοί αυτοί παράγοντες του φαρμάκου που θα αναλυθεί είναι:

- το  $\text{pK}_a$  των δραστικών ουσιών.
- το  $\log P$  των δραστικών ουσιών.
- το μήκος κύματος το οποίο είναι κατάλληλο έτσι ώστε να ανιχνεύονται οι ενώσεις του φαρμάκου στον UV-Vis ανιχνευτή.
- τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ουσιών.

#### 3.4.1 Οι έννοιες $\text{pK}_a$ και $\log P$

Ο Bronsted ήταν ο πρώτος που πρότεινε το πλεονέκτημα της έκφρασης ιονισμού των οξέων και των βάσεων σε ταυτόχρονη κλίμακα.[44] Έκανε μια σημαντική διάκριση μεταξύ ισχυρών και ασθενών οξέων και βάσεων όπου τα χαρακτήρισε ως εξής: Ισχυρά οξέα και βάσεις χαρακτηρίζονται αυτά που είναι εντελώς ιονισμένα σε κλίμακα pH από 0 έως 14, ενώ ασθενή οξέα και βάσεις χαρακτηρίζονται αυτά που δεν είναι ιονισμένα εντελώς στην κλίμακα pH από 0 έως 14.

Το  $\text{pK}_a$  είναι ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος της σταθεράς διάσπασης ενός οξέος. Έτσι μπορούμε να υπολογίσουμε την αναλογία των φορτισμένων καθώς και των ουδέτερων τμημάτων μιας ένωσης σε οποιοδήποτε pH. Οι τιμές  $\text{pK}_a$  είναι ανεξάρτητες από τη συγκέντρωση της ουσίας. Παρακάτω παρατίθεται ο Πίνακας 1 με τις τιμές  $\text{pK}_a$  των ενώσεων που περιέχει το υπό μελέτη φαρμακευτικό σκεύασμα.

Το  $\log P$  είναι ο δεκαδικός λογάριθμος του συντελεστή κατανομής και ορίζεται ως τον λόγο της συγκέντρωσης της ουσίας μεταξύ οκτανόλης και νερού. Η τιμή του  $\log P$  θα

είναι διαφορετική ανάλογα με τον διαλύτη και όσο πιο λιπόφιλη είναι η ουσία τόσο μεγαλύτερη θα είναι η τιμή του LogP.

Για το ακετυλοσαλικυλικό οξύ βρέθηκε από τη βιβλιογραφία ότι είναι  $pK_a=3,5$  [45, 46], για την παρακεταμόλη είναι  $pK_a=9,7$  [47] και για την καφεΐνη δεν προσδιορίζεται επειδή δεν υπάρχει όξινο πρωτόνιο.[48, 49]

Δραστικές ουσίες	$pK_a$
Ακετυλοσαλικυλικό οξύ	3,5
Παρακεταμόλη	9,7
Καφεΐνη	–

Πίνακας 1: Το  $pK_a$  των δραστικών ουσιών.

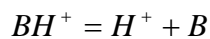
Για τα οξέα ισχύουν τα παρακάτω:



$$K_a = \frac{[H^+] \times [A^-]}{[HA]}$$

$$pK_a = -\log_{10}(K_a)$$

Για τις βάσεις ισχύουν τα παρακάτω:



$$K_a = \frac{[H^+] \times [B]}{[BH^+]}$$

$$pK_a = -\log_{10}(K_a)$$

Για τις δραστικές ουσίες του υπό μελέτη φαρμάκου βρέθηκαν οι τιμές του logP που καταγράφονται παρακάτω στον Πίνακα 2.[50]

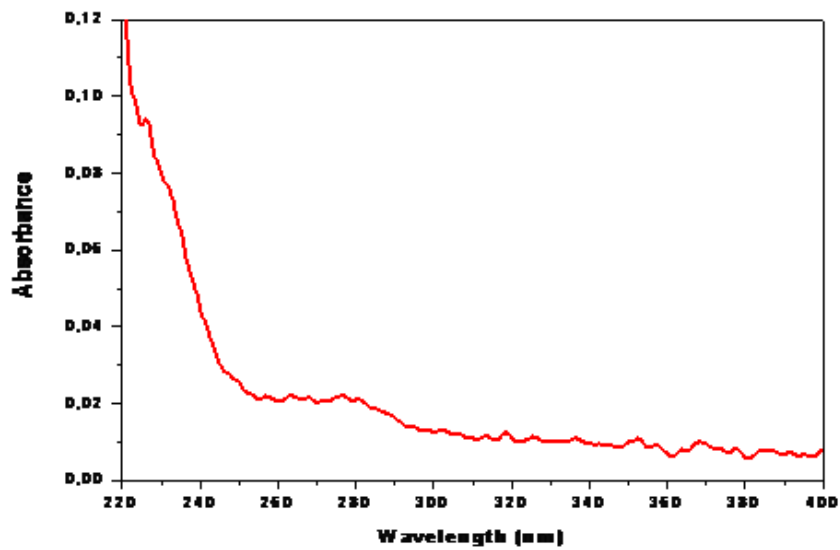
<b>Δραστικές ουσίες</b>	<b>logP</b>
Ακετυλοσαλικυλικό οξύ	1,434
Παρακεταμόλη	0,677
Καφεΐνη	0,063

Πίνακας 2: Το logP των δραστικών ουσιών.

### **3.4.2 Φάσματα απορρόφησης UV**

Χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία UV-Vis για να καταγραφεί το φάσμα απορρόφησης των τριών δραστικών ουσιών του SPLENTIR. Με μελέτη των φασμάτων αυτών θα μπορεί να επιλέγει το κατάλληλο μήκος κύματος για τα πειράματα της χρωματογραφικής ανάλυσης. Το μήκος κύματος που θα επιλεγεί θα πρέπει να είναι κατάλληλο και για τις τρεις ουσίες, έτσι ώστε να εμφανίζονται διακριτά στο χρωματογράφημα. Οι δραστικές ουσίες είναι τρεις: το ακετυλοσαλικυλικό οξύ, η παρακεταμόλη και η καφεΐνη. Επειδή οι μεγάλες συγκεντρώσεις δεν μπορούν να αναλυθούν με ακρίβεια οι ποσότητες των ουσιών πρέπει να είναι μικρές ώστε ο UV αναλυτής να μπορεί να τις ανιχνεύσει. Οι ποσότητες των δραστικών ουσιών σε σχέση με το διάλυμα κινητής φάσης το οποίο είναι 10 ml έχει ως εξής: ακετυλοσαλικυλικό οξύ 4,92 mg, παρακεταμόλη 4,84 mg, καφεΐνη 4,86 mg. Έπειτα, και από τα τρία διαλύματα των δραστικών ουσιών αφαιρέθηκαν 30 μl και διαλύθηκαν σε 10 ml κινητής φάσης.

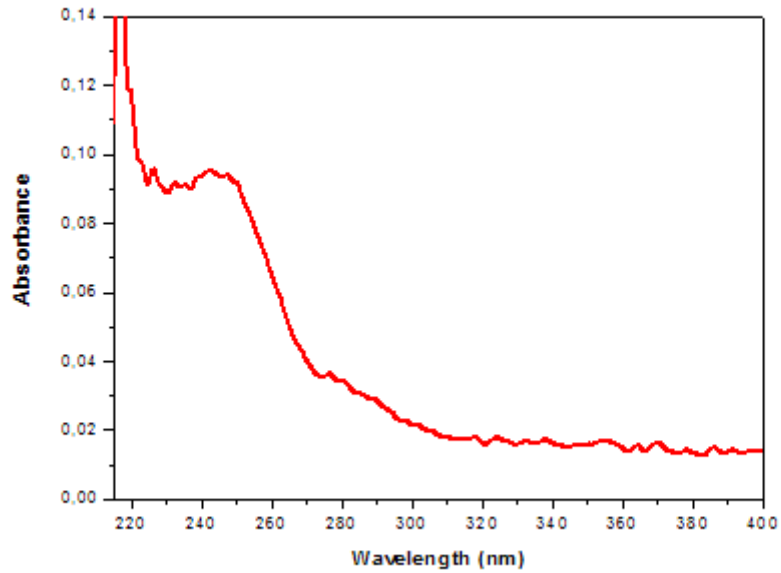
Για το ακετυλοσαλικυλικό οξύ το φάσμα απορρόφησης βρίσκεται παρακάτω στο Σχήμα 7.



Σχήμα 7: Φάσμα απορρόφησης του ακετυλοσαλικυλικού οξέος.

Παρατηρείται από το φάσμα ότι δεν είναι πολύ διακριτό σε ποιο εύρος τιμών μηκών κύματος είναι κατάλληλο να εφαρμοστεί η πειραματική ανάλυση, επειδή δεν υπάρχει εμφανής κορυφή, αλλά οι τιμές που είναι από τα 260 nm έως τα 285 nm εμφανίζουν τις υψηλότερες τιμές απορρόφησης και είναι οι περισσότερο κατάλληλες.

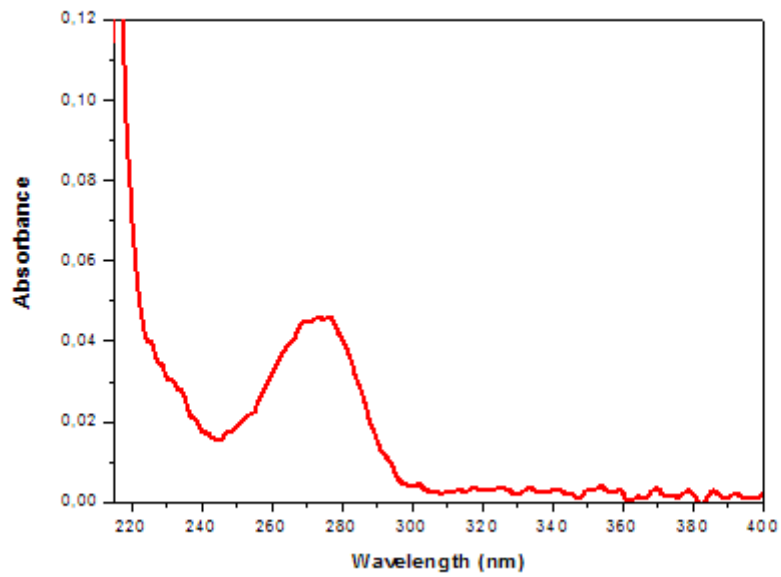
Για την παρακεταμόλη το φάσμα UV ανάλυσης βρίσκεται στο παρακάτω Σχήμα 8.



Σχήμα 8: Φάσμα απορρόφησης της παρακεταμόλης.

Όπως φαίνεται και στο φάσμα το προτιμητέο εύρος τιμών είναι από 240 nm ως τα 280 nm όπου σε αυτό το εύρος παρατηρούνται υψηλές τιμές απορρόφησης.

Για την καφεΐνη παρατηρείται το φάσμα UV που βρίσκεται στο παρακάτω Σχήμα 9.



Σχήμα 9: Φάσμα απορρόφησης της καφεΐνης.

Παρατηρείται από το φάσμα ότι το καταλληλότερο εύρος τιμών για την ουσία καφεΐνη βρίσκεται από τα 250 nm έως τα 290 nm.



Εφόσον βρέθηκαν τα μήκη κύματος στα οποία οι ουσίες μας απορροφούν, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3 , μπορεί να επιλεγεί το κατάλληλο μήκος κύματος το οποίο να είναι ιδανικό για την ταυτόχρονη παρατήρηση και των τριών ουσιών.

<b>Δραστική ουσία</b>	<b>Μήκος κύματος (nm)</b>
Ακετυλοσαλικυλικό οξύ	260-285
Παρακεταμόλη	240-280
Καφεΐνη	250-290

Πίνακας 3: Μήκη κύματος της απορρόφησης των δραστικών ουσιών

Τα 275 nm είναι μια τιμή στην οποία η ανάλυση μας όσον αφορά την απορρόφηση σε UV είναι ικανοποιητική για την ανάπτυξη της μεθόδου εφόσον αποτελεί τον μέσο όρο των τριών μηκών κύματος.

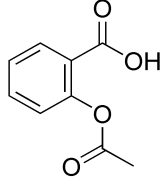
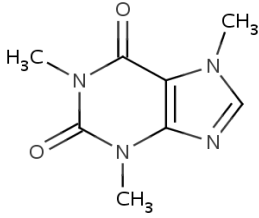
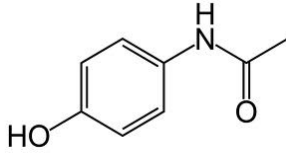
### 3.4.3 Προσδιορισμός των ουσιών του SPLENTIR

Το SPLENTIR είναι ένα φαρμακευτικό σκεύασμα που παράγεται από την εταιρεία Unipharma και έχει δράση παυσίπνου-αντιπυρετικού. Κάθε δισκίο σύμφωνα με την ετικέτα του φαρμακευτικού σκευάσματος περιέχει:

400 mg Ακετυλοσαλικυλικό οξύ, 200 mg Παρακεταμόλη, 50 mg Καφεΐνη. Οι τρεις αυτές δραστικές ουσίες χρησιμοποιούνται ευρέως στα αναλγητικά και αντιπυρετικά φάρμακα είτε μόνες τους είτε σε συνδυασμό μεταξύ τους και η μοριακή δομή τους παρατηρείται παρακάτω στον Πίνακα 4.

Η συνηθέστερη ένωση που παρατηρείται σε παυσίπωνα φάρμακα είναι το ακετυλοσαλικυλικό οξύ το οποίο είναι ευρύτερα γνωστό ως Ασπιρίνη.[52, 53]. Χρησιμοποιείται στα συνήθη ιδιοσκευάσματα Aspirin, Salospir και Upsalgin. Οι μέχρι σήμερα κλινικές ενδείξεις της ασπιρίνης είναι κυρίως η μείωση του πυρετού μέσω της καταστολής της παραγωγής των προσταγλανδινών που είναι υπεύθυνες για την αύξηση της θερμοκρασίας του ανθρώπινου σώματος, η καταστολή του πόνου (κεφαλόπονος, ημικρανίες), η μείωση των φλεγμονών και η μείωση του κινδύνου καρδιακής προσβολής και εγκεφαλικών επεισοδίων.

Η ασπιρίνη έχει χαρακτηριστεί ως το ‘φανταστικό φάρμακο’ ανά τον κόσμο, ενώ υπολογίζεται ότι η παγκόσμια ετήσια κατανάλωση ασπιρίνης φτάνει τους 40.000 τόνους, οι οποίοι αντιστοιχούν σε 120 δισεκατομμύρια φαρμάκου σε μορφή ταμπλέτας. Η παρακεταμόλη χρησιμοποιείται συχνά σε φαρμακευτικά σκεύασμα, κυρίως αναλγητικά και αντιπυρετικά μαζί με διάφορες άλλες δραστικές ουσίες.[9, 10, 54-56], Έχει δράση συγκρίσιμη με αυτήν του ακετυλοσαλικυλικού οξέος, αλλά στερείται της αντιφλεγμονώδους δράσης [51]. Τα πιο κοινά ιδιοσκευάσματα που χρησιμοποιούν την παρακεταμόλη είναι τα Depon, Panadol, και Apotel. Η καφεΐνη παρατηρείται κυρίως ως συμπληρωματική δραστική ουσία.[57, 58] Το Splentir είναι ένα νέο σχετικά εμπορικά διαθέσιμο φάρμακο το οποίο περιέχει αναλογίες από τις ουσίες αυτές.

Δραστική ουσία	Μοριακή δομή
Ακετυλοσαλικυλικό οξύ	
Καφεΐνη	
Παρακεταμόλη	

Πίνακας 4: Η μοριακή δομή των τριών δραστικών ουσιών του splentir.

Τα βασικά χημικά και φυσικά χαρακτηριστικά του ακετυλοσαλικυλικού οξέος παρατίθενται παρακάτω στον Πίνακα 5:

Μοριακός τύπος	$C_9H_8O_4$
Σχετική μοριακή μάζα	180,16 g/mol
Σημείο τήξης	135 °C
Πυκνότητα	1,40 g/cm <sup>3</sup>
Διαλυτότητα στο νερό	3 mg/mL (20 °C)

Πίνακας 5: Τα χαρακτηριστικά του ακετυλοσαλικυλικού οξέος.

Τα βασικά χημικά και φυσικά χαρακτηριστικά της καφεΐνης βρίσκονται παρακάτω στον Πίνακα 6:

<b>Μοριακός τύπος</b>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>
<b>Σχετική μοριακή μάζα</b>	194,19 g/mol
<b>Σημείο τήξης</b>	227 °C
<b>Πυκνότητα</b>	1,23 g/cm <sup>3</sup>
<b>Διαλυτότητα στο νερό</b>	22 mg/mL (25°C)

Πίνακας 6: Τα χαρακτηριστικά της καφεΐνης.

Τα βασικά χημικά και φυσικά χαρακτηριστικά της παρακεταμόλης βρίσκονται παρακάτω στον Πίνακα 7:

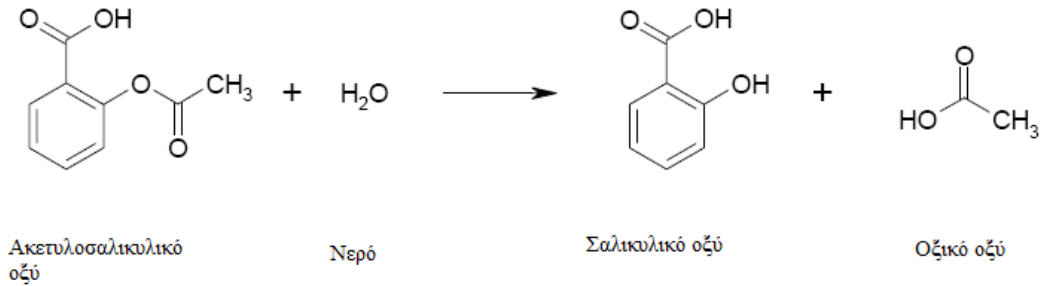
<b>Μοριακός τύπος</b>	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>
<b>Σχετική μοριακή μάζα</b>	151.17 g/mol
<b>Σημείο τήξης</b>	168 °C
<b>Πυκνότητα</b>	1.263 g/cm <sup>3</sup>
<b>Διαλυτότητα στο νερό</b>	12.78 mg/mL (20 °C)

Πίνακας 7: Τα χαρακτηριστικά της παρακεταμόλης.

Ένα σημαντικό στάδιο που μελετάται στην ανάπτυξη της μεθόδου ενός φαρμάκου είναι η ανίχνευση παρα-προϊόντων. Αυτές οι πιθανές αντιδράσεις μετατροπής των δραστικών ουσιών που παράγουν άλλα προϊόντα συμβαίνουν κυρίως λόγω της ταυτόχρονης παρουσίας της κινητής και της στατικής φάσης, κατά την οποία συμβαίνουν οι αντιδράσεις μετατροπής.

Στην παρούσα μελέτη του φαρμάκου η δραστική ουσία που διασπάται είναι το ακετυλοσαλικυλικό οξύ. Όταν το ακετυλοσαλικυλικό οξύ αναμειγνύεται με την κινητή φάση τότε υδρολύεται και παράγεται σαλικυλικό οξύ και οξικό οξύ.

Ο μηχανισμός αυτός της αντίδρασης παρουσιάζεται στο παρακάτω Σχήμα 10.



Σχήμα 10: Υδρόλυση του ακετυλοσαλικυλικού οξέος

Αφετέρου, για τη σωστή ανάπτυξη της μεθόδου ανάλυσης του φαρμακευτικού προϊόντος θα πρέπει να αναλυθούν κατ' επανάληψη αρκετές διαφορετικές συγκεντρώσεις και από τις τρεις δραστικές ουσίες του φαρμάκου. Αναλύονται ακόμα και συγκεντρώσεις οι οποίες ταυτίζονται με τις συγκεντρώσεις των δραστικών ουσιών που περιέχει το κάθε δισκίο και αναγράφονται στο σκεύασμα.[3, 59, 60]

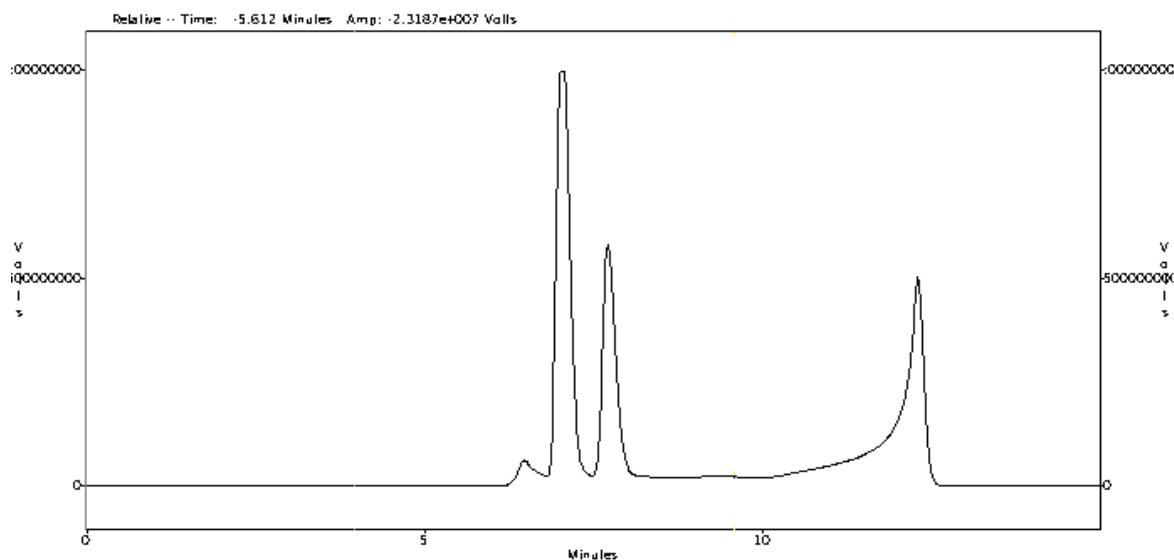
#### 4. ΦΑΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Τα φάσματα που λαμβάνονται από τη χρωματογραφική ανάλυση εξαρτώνται από το pH, από την επίδραση της αναλογίας της κινητής φάσης, από φάσματα των πρότυπων διαλυμάτων (από τα οποία και εξάγονται οι χρόνοι κατακράτησης των δραστικών ουσιών) και τα φάσματα του εμπορικού σκευάσματος Splentir.

##### 4.1 Η επίδραση του pH

Οι περισσότερες φαρμακευτικές ουσίες περιέχουν αμινο-ομάδες ή καρβοξυλο-ομάδες γεγονός που καθιστά την εκάστοτε ουσία να απαιτεί συγκεκριμένη τιμή pH για την καλύτερη δυνατή ανάλυσής της. Η τιμή του pH είναι μια από τις σημαντικότερες παραμέτρους οι οποίες θα πρέπει να ελέγχονται. Επειδή το pH της κινητής φάσης έχει ισχυρή επιρροή στις προς ανάλυση ουσίες θα πρέπει να είναι σταθερό και κατάλληλο για τα συγκεκριμένα συστατικά. Εφαρμόζεται μια χρωματογραφική διαδικασία ανάλυσης η οποία δεν έχει συγκεκριμένη τιμή pH, δηλαδή δε χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα.

Το χρωματογράφημα που εξάχθηκε βρίσκεται στο παρακάτω στο Σχήμα 11.



Σχήμα 11: Χρωματογράφημα των δραστικών ουσιών με pH χωρίς ρυθμιστικό.

Η ρύθμιση του pH είναι απαραίτητη σε πειράματα χρωματογραφίας που αναλύουν φαρμακευτικές ενώσεις, επειδή συνήθως σε μη σταθερό pH εμφανίζονται μη διακριτές κορυφές, ή υπερβολικά πλατιές ή με ουρές.

Σε τέτοιες περιπτώσεις απαιτείται ρυθμιστικό διάλυμα για να μην υπάρχουν διαφορές ανάμεσα στο pH της κινητής και της στατικής φάσης.

Σε πειράματα που έγιναν έτσι ώστε να βρεθεί η κατάλληλη τιμή pH δοκιμάστηκαν τιμές pH που κυμαίνονταν  $4 < \text{pH} < 7$ . Ανάμεσα στις τιμές αυτές pH παρουσιάζονται πλατιά χρωματογραφήματα με ουρές .

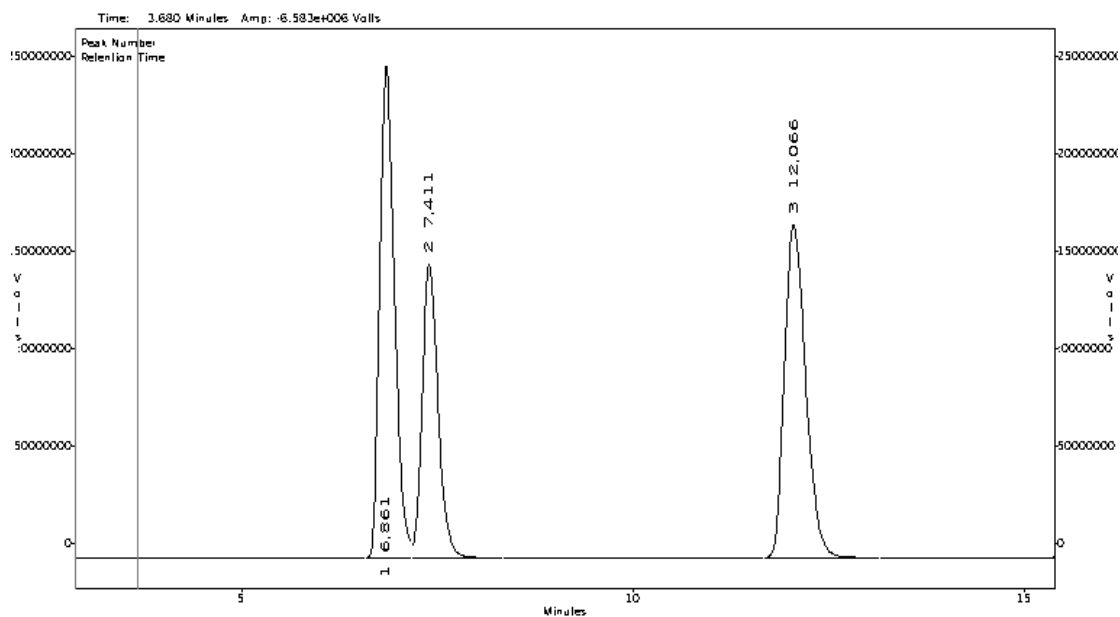
Βρέθηκε ότι η τιμή του pH θα πρέπει να είναι σταθερή σε τιμή  $\text{pH}=2,46$ , κατά την οποία οι κορυφές έχουν άριστη μορφή.

#### **4.2 Η επίδραση της αναλογίας της σύστασης της κινητής φάσης**

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η σύσταση της κινητής φάσης επηρεάζει σημαντικά το χρόνο κατακράτησης των ουσιών και κατά συνέπεια καθορίζει και το συνολικό χρόνο ανάλυσης που απαιτείται για να ολοκληρωθεί η μέθοδος ανάπτυξης του φαρμάκου. Είναι γνωστό ότι όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του πολικού διαλύτη σε σχέση με τον οργανικό διαλύτη, στην περίπτωσή μας πολικός διαλύτης είναι το νερό, τόσο γρηγορότερη καθίσταται η διαδικασία.

Για την ανάλυση δραστικών ουσιών των φαρμάκων χρησιμοποιούνται διάφοροι συνδυασμοί αναλογιών και αναλυτών ανάλογα με την εκάστοτε μέθοδο ανάπτυξης που ακολουθείται.[61-64] Αρχικά, διαμορφώνεται μια πειραματική διαδικασία στην οποία η αναλογία της κινητής φάσης 40:60 ακετονιτρίλιο:νερό και το χρωματογράφημα παρατηρείται παρακάτω.

Το διάγραμμα παρατίθεται παρακάτω στο Σχήμα 12.



Σχήμα 12: Διάγραμμα χρωματογραφίας των δραστικών ουσιών με αναλογία κινητής φάσης 40:60 ακετονιτρίλιο:νερό.

Οι χρόνοι κατακράτησης των ουσιών του διαγράμματος βρίσκονται καταγεγραμμένοι στον Πίνακα 8.

Δραστική ουσία	Χρόνος κατακράτησης (min)
Παρακεταμόλη	6,861
Καφεΐνη	7,411
Ακετυλοσαλικυλικό οξύ	12,066

Πίνακας 8: Οι χρόνοι κατακράτησης των ουσιών σε αναλογία κινητής φάσης 40:60 ακετονιτρίλιο:νερό.

Παρατηρείται μια αλληλοεπικάλυψη των κορυφών της παρακεταμόλης και της καφεΐνης (πρώτη και δεύτερη κορυφή) γεγονός το οποίο δεν είναι αποδεκτό σε μια σωστή αναλυτική μέθοδο χρωματογραφίας μιας φαρμακευτικής ουσίας. Η αλληλοεπικάλυψη των κορυφών είναι ανασταλτικός παράγοντας σε πειράματα ανάλυσης διότι οι παράμετροι της υγρής χρωματογραφίας (πχ διαχωριστικότητα και επιλεκτικότητα) δεν έχουν αποδεκτές τιμές σε αυτές τις περιπτώσεις.

Για τον λόγο αυτό, μετά από μελέτη διαφόρων αναλογιών της σύστασης της κινητής φάσης, βρέθηκε ότι η καταλληλότερη αναλογία ακετονιτρίλιου:νερού είναι 25:75. Στην αναλογία αυτή τα αποτελέσματά έχουν αποδεκτές τιμές των παραμέτρων και

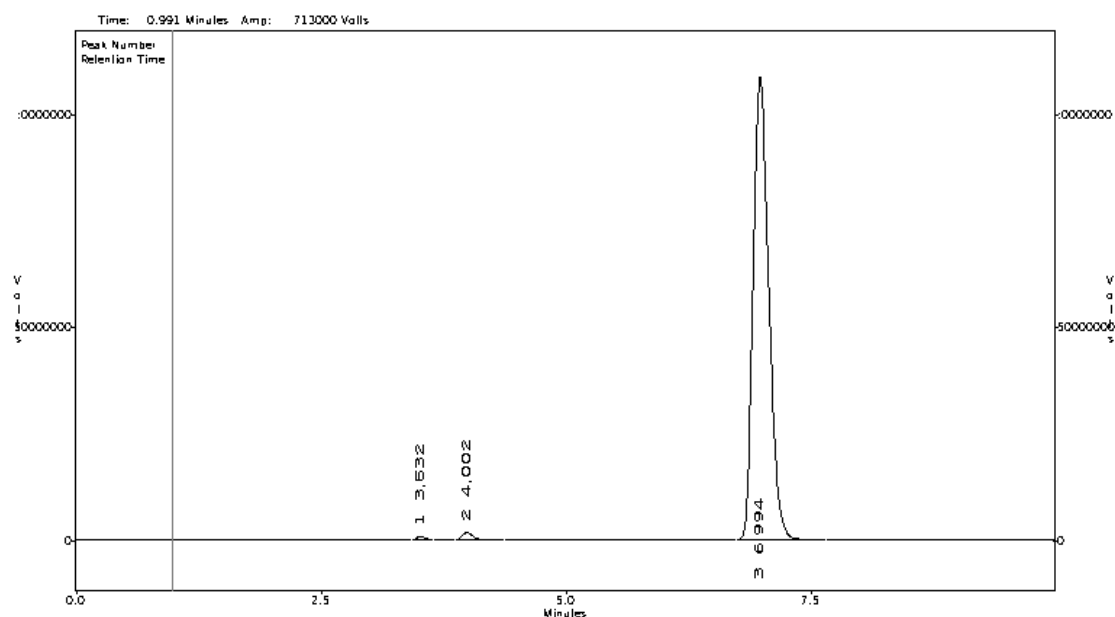


επιτυγχάνεται μείωση της συνολικής πειραματικής διαδικασίας γύρω στα 5 λεπτά. Όλες οι αναλύσεις που ακολουθούν έχουν τη συγκεκριμένη αναλογία στο διάλυμα της κινητής φάσης.

### 4.3 Οι χρόνοι κατακράτησης των τριών ουσιών του SPLENTIR

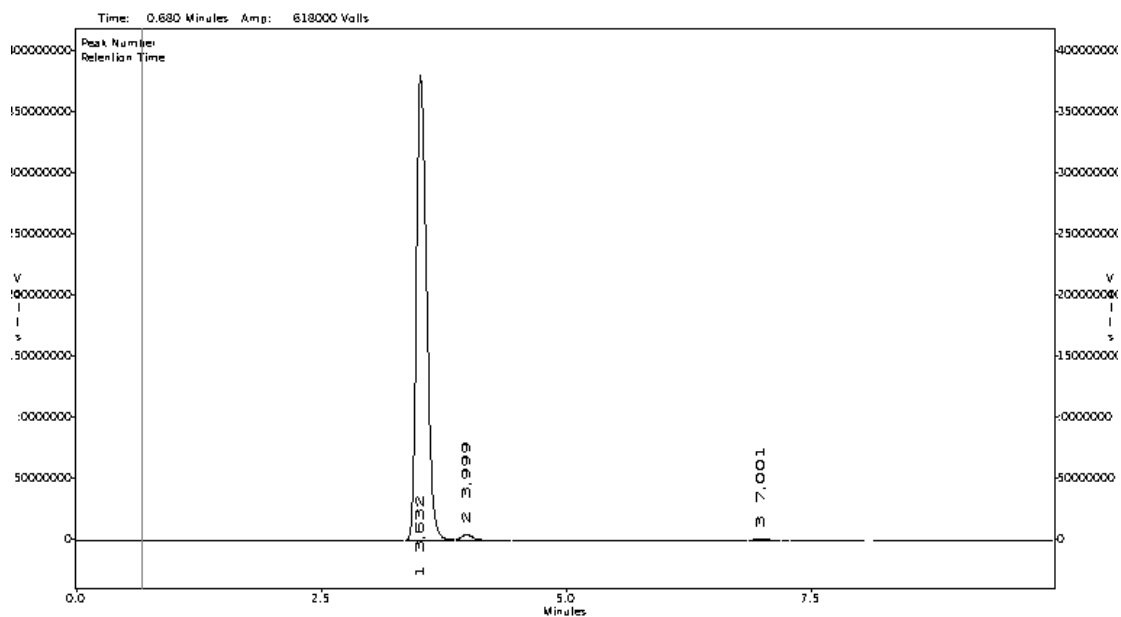
Για την ανάπτυξη της μεθόδου θα πρέπει αρχικά να είναι γνωστός ο χρόνος κατακράτησης της κάθε ουσίας. Έτσι θα είναι γνωστό με ποια σειρά εμφανίζονται οι κορυφές και σε ποια κορυφή αντιστοιχεί η κάθε δραστική ουσία. Για το λόγο αυτό αναλύεται η κάθε ουσία μόνη της σε ένα διάλυμα και κατόπιν ελέγχονται τα χρωματογραφήματα έτσι ώστε να βρεθεί ακριβώς ποιος είναι ο χρόνος κατακράτησης της κάθε ένωσης. Η αναλογία της κινητής φάσης είναι 25:75 ακετονιτρίλιο:νερό και το pH=2,46.

Όπως παρατηρείται και στο Σχήμα 13 ο χρόνος κατακράτησης του ακετυλοσαλικυλικού οξέος είναι  $t=6,994$  λεπτά.



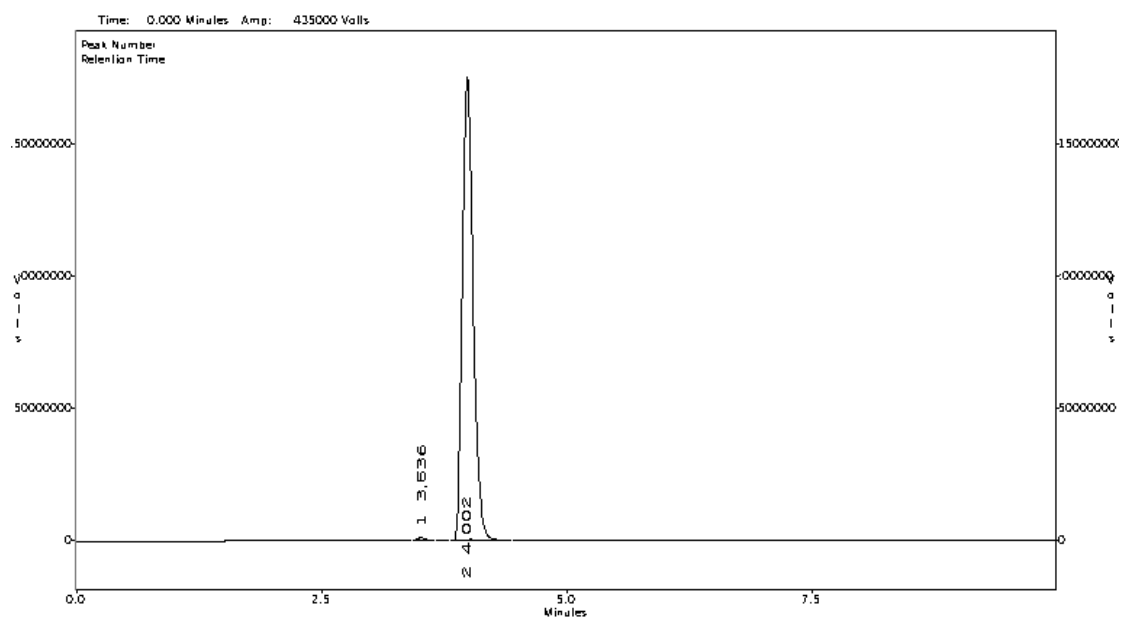
Σχήμα 13: Ο χρόνος κατακράτησης του ακετυλοσαλικυλικού οξέος παρατηρείται στα 6,994 λεπτά.

Το χρωματογράφημα της παρακεταμόλης είναι το παρακάτω στο Σχήμα 14 όπου παρατηρείται ότι ο χρόνος κατακράτησης είναι  $t=3,532$  λεπτά.



Σχήμα 14: Ο χρόνος κατακράτησης της παρακεταμόλης είναι 3,532 λεπτά.

Το διάγραμμα της καφεΐνης είναι το παρακάτω στο Σχήμα 15 όπου παρατηρείται ότι ο χρόνος κατακράτησης είναι  $t=4,002$  λεπτά.

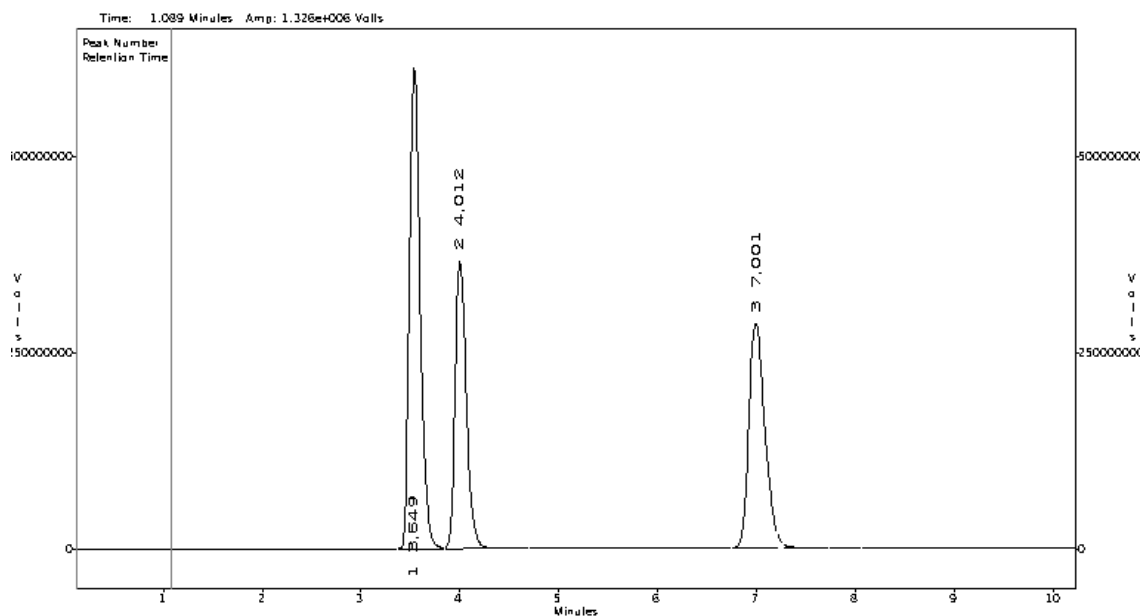


Σχήμα 15: Ο χρόνος κατακράτησης της παρακεταμόλης είναι 4,002 λεπτά.

Εφόσον βρέθηκαν οι χρόνοι κατακράτησης της κάθε δραστικής ουσίας, κατασκευάζεται ένα μείγμα συγκεντρώσεων με τις τρεις δραστικές ουσίες στις ακόλουθες αναλογίες: σε 10 ml κινητής φάσης (ακετονιτρίλιο/νερό) προστίθενται 12,58 mg ακετυλοσαλικυλικό οξύ, 4,09 mg παρακεταμόλη και 1,25 mg καφεΐνη.

Από το χρωματογράφημα που θα εξαχθεί καθίσταται γνωστή η σειρά καθώς και ο ακριβής χρόνος κατακράτησης των ενώσεων μας που λαμβάνονται από το μείγμα των δραστικών ουσιών.

Το χρωματογράφημα των τριών ουσιών βρίσκεται παρακάτω στο Σχήμα 16.



Σχήμα 16: Το χρωματογράφημα των τριών ουσιών

Από το διάγραμμα αυτό συμπεραίνεται από τα παραπάνω ότι πρώτη εμφανίζεται η κορυφή της παρακεταμόλης, δεύτερη της καφεΐνης και τρίτη είναι η κορυφή του ακετυλοσαλικυλικού οξέος. Οι χρόνοι κατακράτησης των δραστικών ουσιών βρίσκονται στον Πίνακα 9.

Δραστική ουσία	Χρόνος κατακράτησης (min)
Παρακεταμόλη	3,549
Καφεΐνη	4,012
Ακετυλοσαλικυλικό οξύ	7,001

Πίνακας 9: Οι χρόνοι κατακράτησης των δραστικών ουσιών

#### 4.4 Φάσμα χρωματογραφίας του SPLENTIR

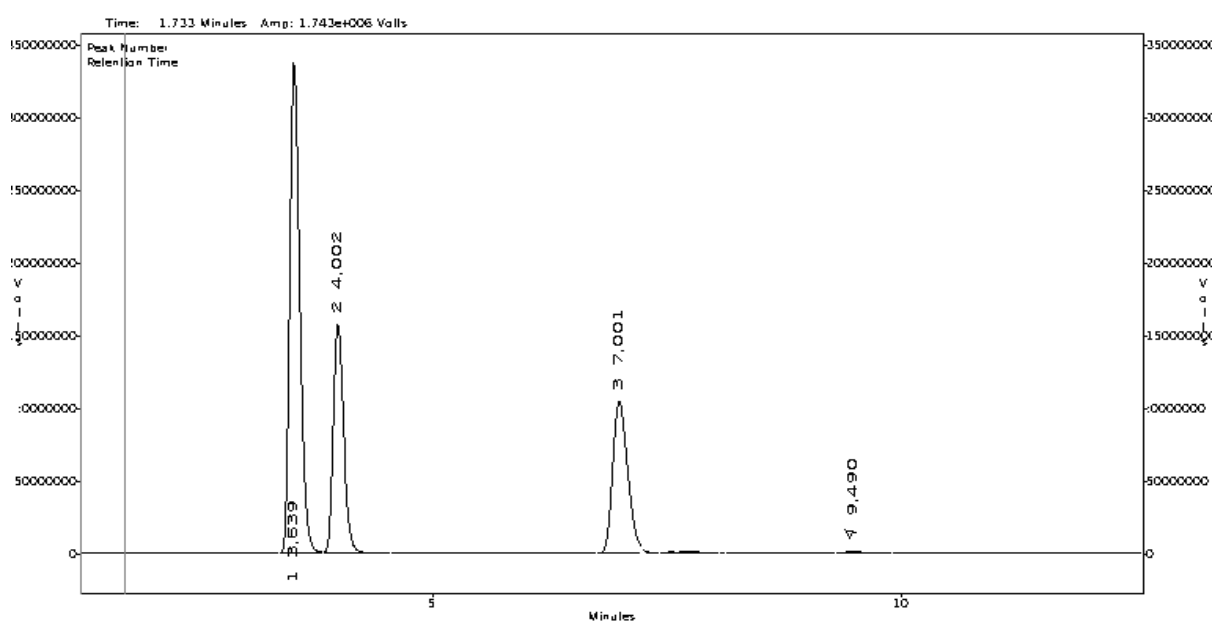
Το κάθε δισκίο περιέχει όπως αναγράφεται στη συσκευασία του σκευάσματος 400 mg ακετυλοσαλικυλικού οξέος, 200 mg παρακεταμόλης και 50 mg καφεΐνης. Οι συγκεντρώσεις της κάθε ένωσης βρίσκονται στον Πίνακα 10.

Δραστική ουσία	Ποσότητα/δισκίο (mg)	Συγκέντρωση (mg/ml)
Ακετυλοσαλικυλικό οξύ	400	0,4
Παρακεταμόλη	200	0,2
Καφεΐνη	50	0,05

Πίνακας 10: Ποσότητες και συγκεντρώσεις των ουσιών του splentir

Η διαδικασία ανάλυσης που ακολουθείται για το φαρμακευτικό σκεύασμα έχει ως εξής: ένα δισκίο ζυγίζεται 801,91 mg, το χάπι διαλύεται σε 100 ml κινητής φάσης (25:75, ακετονιτρίλιο:νερό) και το τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων για 25-30 λεπτά περίπου έως ότου διαλυθεί εντελώς. Από αυτό το διάλυμα 1 ml προστίθεται σε 9 ml κινητής φάσης. Έπειτα διέρχεται το διάλυμα από φίλτρο 0,2 μm και γίνεται ένεση στο όργανο για να αρχίσει η ανάλυση.

Από το δείγμα αυτό το φάσμα που προέκυψε βρίσκεται παρακάτω στο Σχήμα 17.



Σχήμα 17: Χρωματογράφημα του φαρμακευτικού σκευάσματος.

Από το φάσμα αυτό εξάγονται οι χρόνοι κατακράτησης των ουσιών του φαρμάκου και καταγράφονται στον παρακάτω Πίνακα 11.

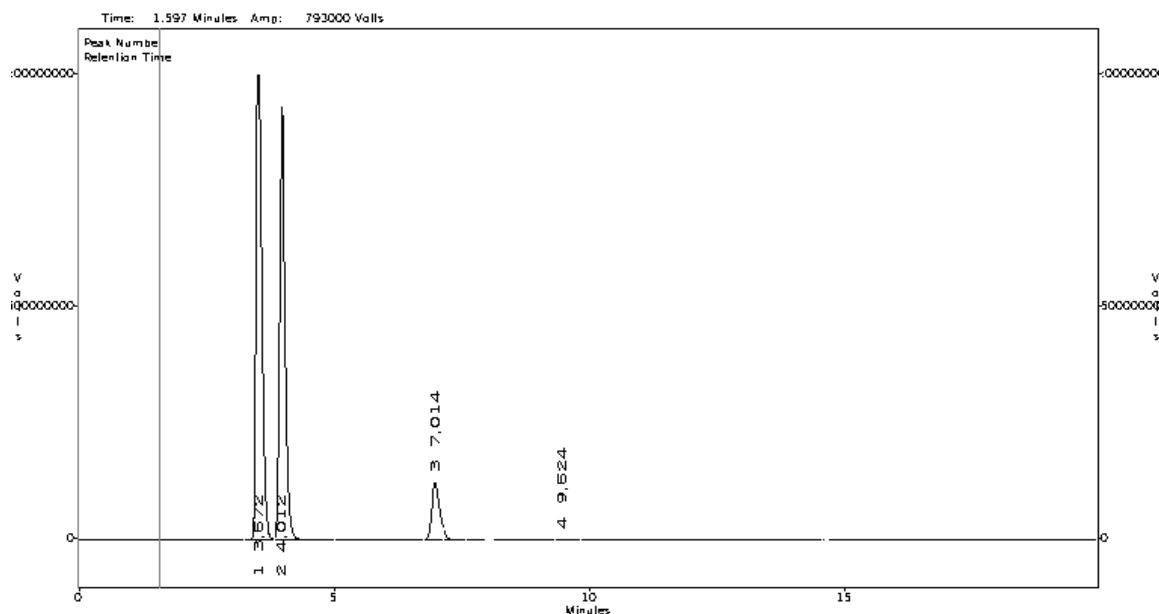
Αριθμός κορυφών	Χρόνος κατακράτησης
1	3,539
2	4,002
3	7,001
4	9,490

Πίνακας 11:Χρόνοι κατακράτησης των ουσιών του φαρμάκου

Παρατηρείται ότι στο χρωματογράφημα υπάρχουν 4 κορυφές από τις οποίες οι 3 ταυτοποιούνται μέσω των παραπάνω πειραμάτων ότι είναι οι βασικές τρεις δραστικές ουσίες του φαρμάκου. Πιο συγκεκριμένα, η κορυφή 1 αντιστοιχεί στην παρακεταμόλη, η κορυφή 2 αντιστοιχεί στην καφεΐνη και η κορυφή 3 αντιστοιχεί στο ακετυλοσαλικυλικό οξύ. Οι τρεις αυτές ουσίες έχουν και τις μεγαλύτερες κορυφές, η ύπαρξη της άλλης κορυφής είναι μικρής έντασης.

Υποθέτοντας ότι στο φαρμακευτικό σκεύασμά μας το ακετυλοσαλικυλικό οξύ έχει υποστεί υδρόλυση, τότε μπορεί να εξεταστεί αν η κορυφή με τον αριθμό 4 ανήκει στο σαλικυλικό οξύ, εφόσον συμπίπτει ο χρόνος κατακράτησης με τον χρόνο κατακράτησης του σαλικυλικού οξέος που θα λαμβάνεται από την πειραματική διαδικασία. Αυτό μπορεί να γίνει αν παραμείνει το μείγμα των ουσιών διαλυμένο στην κινητή φάση για μια μέρα τουλάχιστον και κατόπιν αναλυθεί.

Έτσι λοιπόν το χρωματογράφημα που έχουμε είναι το παρακάτω στο Σχήμα 18.



Σχήμα 18: Φάσμα στο οποίο παρατηρείται το σαλικυλικό οξύ.

Η ένδειξη στο χρωματογράφημα στον χρόνο  $t=9,524$  αντιστοιχεί στο σαλικυλικό οξύ. Επειδή είναι σε μικρή συγκέντρωση, το ύψος της κορυφής είναι μικρό σε σχέση με τις άλλες 3 δραστικές ουσίες που βρίσκονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Το σαλικυλικό οξύ εμφανίζεται ως παραπροϊόν του δείγματος λόγω της υδρόλυσης του ακετυλοσαλικυλικού οξέος.

Έπειτα παρασκευάζεται ένα μείγμα από τις τρεις δραστικές ουσίες του φαρμάκου στις ίδιες περίπου συγκεντρώσεις με αυτές που αναλογούν σε κάθε δισκίο έτσι ώστε να μπορεί να εξεταστεί αν οι κορυφές του χρωματογραφήματος του φαρμάκου έχουν την ίδια ένταση (ύψος και εμβαδόν κορυφής) με αυτές του μείγματος ουσιών.

Οι συγκεντρώσεις του φαρμάκου και οι ανάλογες που κατασκευάστηκαν αντίστοιχα βρίσκονται στον παρακάτω Πίνακα 12.

Δραστική ουσία	Για το φάρμακο mg/10ml	Για το μείγμα ουσιών mg/10ml
Παρακεταμόλη	4	4,14
Καφεΐνη	2	2,15
Ακετυλοσαλικυλικό οξύ	0,5	0,52

Πίνακας 12: Συγκεντρώσεις φαρμάκου και μείγματος.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων και από τα δύο χρωματογραφήματα που λήφθηκαν από το όργανο είναι καταγεγραμμένα στους Πίνακες 13 και 14 αντίστοιχα.

<b>Δραστική ουσία</b>	<b>Χρόνος κατακράτησης</b>	<b>Area</b>	<b>% Area</b>	<b>Height</b>	<b>%Height</b>
Παρακεταμόλη	3,539	2481331	50,40	337035	56,048
Καφεΐνη	4,002	1237920	25,14	157323	26,162
Ακετυλοσαλικυλικό οξύ	7,001	1157059	23,50	104135	17,31

Πίνακας 13:Αποτελέσματα του χρωματογραφήματος του φαρμάκου.

<b>Δραστική ουσία</b>	<b>Χρόνος κατακράτησης</b>	<b>Area</b>	<b>% Area</b>	<b>Height</b>	<b>%Height</b>
Παρακεταμόλη	3,536	2729757	51,10	341845	56,326
Καφεΐνη	3,999	1294619	26,197	164036	27,028
Ακετυλοσαλικυλικό οξύ	6,998	1117487	22,613	101022	16,645

Πίνακας 14:Αποτελέσματα του χρωματογραφήματος του μείγματος.

Από τα παραπάνω στοιχεία, συμπεραίνεται με βεβαιότητα ότι οι ποσότητες των δραστικών ουσιών που αναγράφονται στο φαρμακευτικό σκεύασμα είναι όντως αληθείς, εφόσον η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές στο κάθε δείγμα, και τα ποσοστά είναι σχεδόν ταυτόσημα (υπάρχει και το αντίστοιχο σφάλμα κατά τη διαδικασία ζύγισης και αραίωσης).

#### 4.5 Υπολογισμός των βασικών παραμέτρων της χρωματογραφίας

Όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω, για να θεωρηθεί μια χρωματογραφική μέθοδος ανάλυσης επιτυχής θα πρέπει να υπολογιστούν ορισμένες βασικές παράμετροι και να πληρούνται τα απαραίτητα κριτήρια που απαιτούνται κατά την διαδικασία ανάλυσης.

Οι βασικές αυτές παράμετροι είναι ο συντελεστής κατακράτησης (capacity factor), η τιμή των θεωρητικών πλακών (column efficiency), η επιλεκτικότητα (selectivity) και η διαχωριστικότητα (resolution). Οι παράμετροι αυτές είναι καθοριστικές για μια χρωματογραφική ανάλυση, εξαρτώνται άμεσα από τη στήλη και τη σύσταση της κινητής φάσης και χρησιμοποιούνται ως ενδείξεις για μια επιτυχή ανάλυση.

Για τις δραστικές ουσίες του φαρμάκου που αναλύθηκε τα αποτελέσματα που αφορούν τον συντελεστή κατακράτησης και τον αριθμό των θεωρητικών πλακών για την κάθε ουσία βρίσκονται στον παρακάτω Πίνακα 15:

<b>Δραστική ουσία</b>	<b>Συντελεστής κατακράτησης (k')</b>	<b>Θεωρητικές πλάκες (N)</b>
Παρακεταμόλη	3,539	3311
Καφεΐνη	4,002	4640
Ακετυλοσαλικυλικό οξύ	7,001	6988

Πίνακας 15: Ο συντελεστής κατακράτησης και ο αριθμός των θεωρητικών πλακών των τριών ουσιών.

Για τους υπολογισμούς των δύο αυτών παραμέτρων χρησιμοποιήθηκαν οι μαθηματικοί τύποι που βρίσκονται σε προηγούμενο κεφάλαιο. Για τον υπολογισμό της επιλεκτικότητας και της διαχωριστικότητας πρέπει τα δεδομένα να είναι χωρισμένα ανάλογα με τα ζεύγη των ενώσεων που παρατηρούνται στο χρωματογράφημα και είναι γειτονικά μεταξύ τους. Αναλύοντας το χρωματογράφημα του φαρμακευτικού σκευάσματος ως προς τα ζεύγη παρακεταμόλη-καφεΐνη, καφεΐνη-ακετυλοσαλικυλικό οξύ και παρακεταμόλη-ακετυλοσαλικυλικό οξύ, προέκυψε ο παρακάτω Πίνακας 16.



Τα δεδομένα εξήχθησαν από το χρωματογράφημα στο Σχήμα 17 και υπολογίστηκε ότι το εύρος των κορυφών ήταν για κάθε ουσία είναι:

Παρακεταμόλη,  $w=0,246$  min

Καφεΐνη,  $w=0,235$  min

Ακετυλοσαλικυλικό οξύ,  $w=0,335$  min

<b>Ζεύγη ουσιών</b>	<b>Επιλεκτικότητα (<math>\alpha</math>)</b>	<b>Διαχωριστικότητα (R)</b>
Παρακεταμόλη-Καφεΐνη	1,131	1,925
Καφεΐνη-Ακετυλοσαλικυλικό οξύ	1,750	11,92
Παρακεταμόλη-Ακετυλοσαλικυλικό οξύ	1,978	10,52

Πίνακας 16: Η επιλεκτικότητα και η διαχωριστικότητα των τριών δραστικών ουσιών.

## **5. ΔΙΑΠΙΣΤΕΥΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΝΑΛΥΣΗΣ**

### **5.1 Η διαπίστευση μιας μεθόδου ανάλυσης**

Διαπίστευση μιας μεθόδου είναι η διαδικασία κατά την οποία αξιολογούνται τα συνολικά χαρακτηριστικά της μεθόδου έτσι ώστε να αποδειχτεί ότι είναι κατάλληλη μέθοδος για τον σκοπό τον οποίο προορίζεται.[65, 66]

Τα χαρακτηριστικά της ποιότητας μιας μεθόδου αφορούν κυρίως ιδιότητες, παραμέτρους, κριτήρια και συμπεριφορές που εμφανίζονται στη μέθοδο κατά την εφαρμογή της στην ανάλυση ενός δείγματος. Τα χαρακτηριστικά αυτά κατά κανόνα ορίζουν και ποσοτικοποιούν την ποιότητα της μεθόδου και μέσω αυτών μπορεί να γίνει:

- Βελτιστοποίηση στο στάδιο της ανάπτυξης
- Σύγκριση μεθόδων
- Διαπίστευση της μεθόδου

Αρχικά θα πρέπει να προσδιοριστεί η πειραματική διαδικασία, όπως έγινε παραπάνω στο κεφάλαιο της ανάπτυξης της μεθόδου ώστε να μπορούν να εξεταστούν τα χαρακτηριστικά της μεθόδου και να υπάρχει μια αναλυτική πορεία όλων των σταδίων τα οποία ορίζουν τη μέθοδο. Οι απαιτούμενοι παράγοντες όπου εξετάζονται συνήθως κατά την διαπίστευση είναι οι παρακάτω:

### **5.2 Γραμμικότητα (LINEARITY)**

Η γραμμικότητα μια αναλυτικής μεθόδου εκφράζεται ως την ικανότητα να εξαχθούν τα αποτελέσματα μέσω μαθηματικών μετατροπών ανάλογα των συγκεντρώσεων σε ένα ορισμένο εύρος. Η γραμμικότητα μιας μεθόδου υπολογίζεται απευθείας στην προσδιοριζόμενη ουσία κατά την εφαρμογή της αναλυτικής μεθόδου.

Χρησιμοποιούνται στατιστικές μέθοδοι όπως η ανάλυση παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων (least squares regression analysis) και μέσω αυτών υπολογίζεται η εξίσωση της ευθείας. Ο συντελεστής συσχέτισης (correlation coefficient), η τομή στον άξονα  $y$  ( $y$ -intercept), η κλίση (slope) της ευθείας παλινδρόμησης και η τυπική απόκλιση είναι ορισμένες παράμετροι της γραμμικότητας.

Για τον προσδιορισμό της γραμμικότητας ακολουθούνται τα παρακάτω:

Αρχικά κατασκευάζεται η περιοχή των προτύπων δειγμάτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις, έτσι ώστε να καλύπτεται ένα μεγάλο εύρος της αναμενόμενης περιοχής (50%-150%).

Επαναλαμβάνονται οι μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση, τα αποτελέσματα αναλύονται όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, υπολογίζονται οι στατιστικές παράμετροι, κατασκευάζεται το διάγραμμα μέσης απόκρισης (y-άξονας) ως προς τη συγκέντρωση (x-άξονας) και υπολογίζεται τελικά η εξίσωση παλινδρόμησης, ο συντελεστής προσδιορισμού ( $r^2$ ) και ο συντελεστής συσχέτισης  $r$ . Έπειτα, κατασκευάζεται και το διάγραμμα του λόγου, απόκριση προς συγκέντρωση (y-άξονας) ως προς τη συγκέντρωση (x-άξονας) και ελέγχεται αν είναι ευθεία γραμμή. Αν στο διάγραμμα απόκρισης-συγκέντρωσης, η τομή (intercept, a) είναι μεγάλη σχετικά με το μηδέν τότε αφαιρείται αυτή η τιμή από κάθε απόκριση και στη συνέχεια πραγματοποιείται η διαίρεση με τη συγκέντρωση.

Η γραμμικότητα απαιτεί κάποια κριτήρια αποδοχής τα οποία είναι:

- Το διάγραμμα απόκρισης-συγκέντρωσης πρέπει να είναι ευθεία γραμμή με συντελεστή προσδιορισμού  $r^2 > 0,97$
- Οι αποκλίσεις των σημείων που βρίσκονται μακρύτερα από το μηδέν επηρεάζουν περισσότερο την κλίση από ότι οι αποκλίσεις των σημείων που βρίσκονται κοντά στο μηδέν.
- Εάν η καμπύλη δεν είναι γραμμική, τότε περιορίζεται η περιοχή της καμπύλης έως ότου η απόκριση ως προς την συγκέντρωση να είναι γραμμική.
- Στο διάγραμμα που κατασκευάστηκε, το οποίο περιέχει τους λόγους των αποκρίσεων, το εύρος των τιμών πρέπει να είναι σε μία στενή ζώνη.

Για τον υπολογισμό της γραμμικότητας των δραστικών ουσιών του φαρμάκου που εξετάζουμε σε αυτήν τη μελέτη χρησιμοποιούμε τη μέθοδο παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων έτσι ώστε να μπορεί να εξαχθεί η εξίσωση της ευθείας για κάθε δραστική ουσία χωριστά.

Κατασκευάστηκαν διαλύματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις από την κάθε ουσία και έτσι μπορούν να κατασκευαστούν διαγράμματα και για τις τρεις ουσίες.

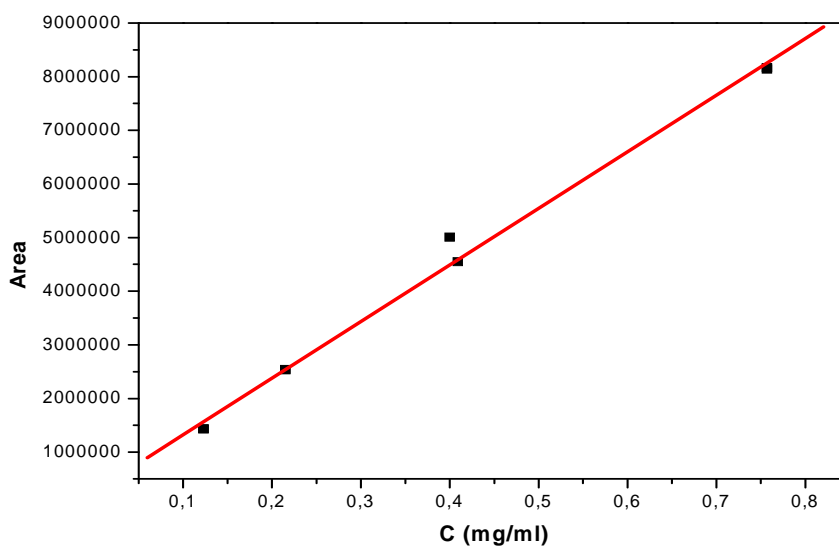
### 5.2.1 Η καμπύλη βαθμονόμησης της παρακεταμόλης

Ο Πίνακας 17 έχει συγκεντρωμένες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν και την αντίστοιχη απόκριση που έχει το κάθε δείγμα στο διάγραμμα της υγρής χρωματογραφίας, όπου ως απόκριση ορίζεται το εμβαδόν της κορυφής που αντιστοιχεί στην παρακεταμόλη.

Συγκέντρωση Παρακεταμόλης (mg/ml)	Εμβαδόν στο διάγραμμα (Area)
0,757	8139711
0,757	8167881
0,409	4547870
0,215	2529757
0,215	2539251
0,123	1432282
0,123	1433539
0,4	5005865

Πίνακας 17: Συγκέντρωση και εμβαδόν της καμπύλης της παρακεταμόλης.

Από τα δεδομένα αυτά μπορεί να κατασκευαστεί η καμπύλη βαθμονόμησης της παρακεταμόλης, η οποία φαίνεται παρακάτω στο Σχήμα 19.



Σχήμα 19: Καμπύλη βαθμονόμησης της παρακεταμόλης.

Η εξίσωση της ευθείας της παρακαταμόλης είναι η:  $y = 1E + 07x + 267688$   
 με συντελεστή προσδιορισμού  $r^2=0,9938$  και συντελεστή συσχέτισης  $r=0,9968$ .

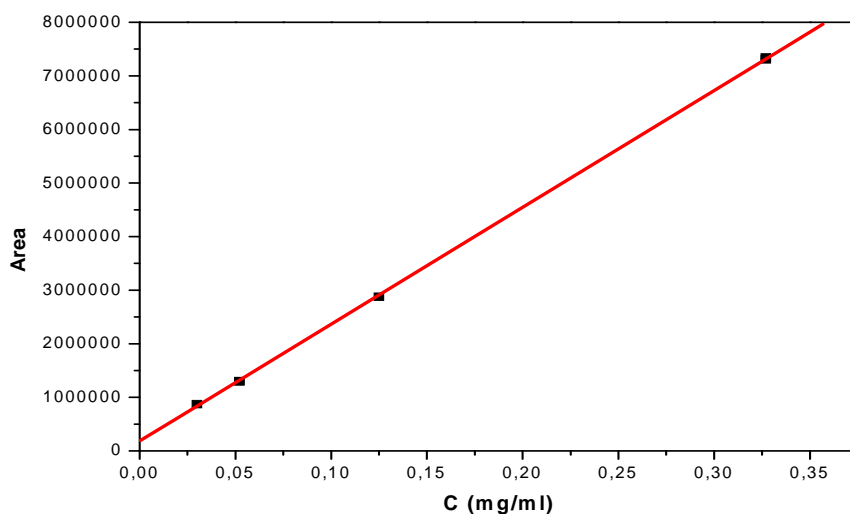
### 5.2.2 Η καμπύλη βαθμονόμησης της καφεΐνης

Ο Πίνακας 18 έχει συγκεντρωμένες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στο δείγμα που έγινε ένεση στο όργανο και την αντίστοιχη απόκριση που έχει το κάθε δείγμα στο διάγραμμα της υγρής χρωματογραφίας, όπου ως απόκριση ορίζεται το εμβαδόν της κορυφής που αντιστοιχεί στην καφεΐνη.

Συγκέντρωση Καφεΐνης (mg/ml)	Εμβαδόν στο διάγραμμα (Area)
0,327	7307326
0,327	7342423
0,125	2877274
0,052	1296619
0,052	1299686
0,030	868712
0,030	869992

Πίνακας 18: Συγκέντρωση και εμβαδόν της καμπύλης της καφεΐνης.

Από τα δεδομένα αυτά μπορεί να κατασκευαστεί η καμπύλη βαθμονόμησης της καφεΐνης, η οποία φαίνεται παρακάτω στο Σχήμα 20.



Σχήμα 20: Καμπύλη βαθμονόμησης της καφεΐνης.

Η εξίσωση της καφεΐνης είναι η:  $y = 2E + 07x + 184312$

με συντελεστή προσδιορισμού  $r^2 = 0,9999$  και συντελεστή συσχέτισης  $r = 0,9999$ .

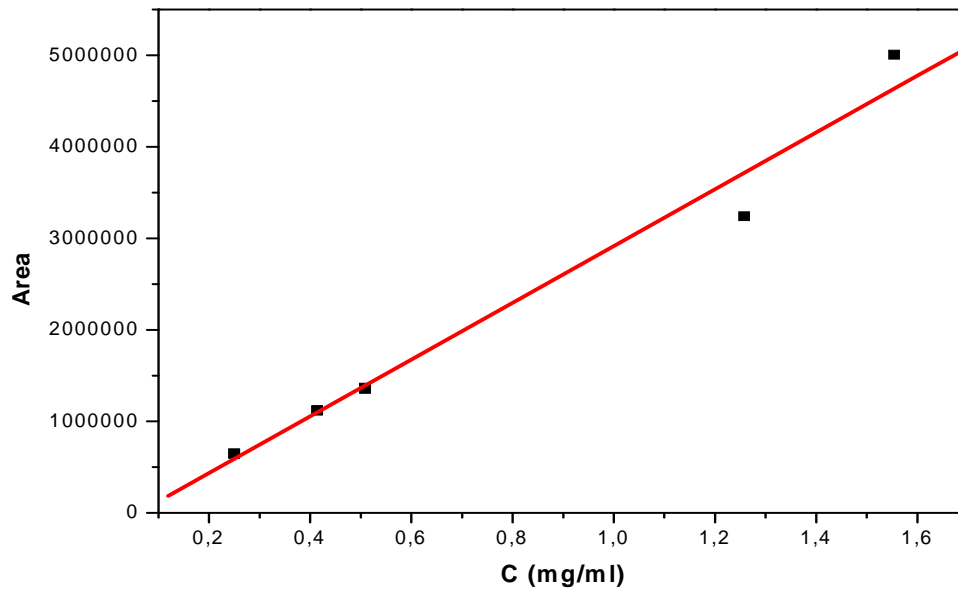
### 5.2.3 Η καμπύλη βαθμονόμησης του ακετυλοσαλικυλικού οξέος

Ο Πίνακας 19 έχει συγκεντρωμένες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τα δείγματα της καφεΐνης και την αντίστοιχη απόκριση που έχει το κάθε δείγμα στο διάγραμμα της υγρής χρωματογραφίας, όπου ως απόκριση ορίζεται το εμβαδόν της κορυφής που αντιστοιχεί στο ακετυλοσαλικυλικό οξύ.

Συγκέντρωση Ακετυλοσαλικυλικού οξέος (mg/ml)	Εμβαδόν στο διάγραμμα (Area)
0,508	1353658
0,508	1367843
1,258	3241884
0,414	1117487
0,414	1124147
0,250	644602
0,250	649759
1,554	5005865

Πίνακας 19: Συγκέντρωση και εμβαδόν της καμπύλης του ακετυλοσαλικυλικού οξέος.

Από τα δεδομένα αυτά μπορεί να κατασκευαστεί η καμπύλη βαθμονόμησης, η οποία φαίνεται παρακάτω στο Σχήμα 21.



Σχήμα 21: Καμπύλη βαθμονόμησης του ακετυλοσαλικυλικού οξέος.

Η εξίσωση της ευθείας του ακετυλοσαλικυλικού οξέος είναι  $y = 3E + 06x - 185577$ , με συντελεστή προσδιορισμού  $r^2 = 0,9772$  και συντελεστή συσχέτισης  $r = 0,9885$ .

Συγκεντρωτικά, οι εξισώσεις των ευθειών των τριών δραστικών συστατικών του φαρμάκου είναι:

Η εξίσωση της παρακεταμόλης είναι:

$$y = 1E + 07x + 267688$$

Η εξίσωση της καφεΐνης είναι:

$$y = 2E + 07x + 184312$$

Η εξίσωση του ακετυλοσαλικυλικού οξέος είναι:

$$y = 3E + 06x - 185577$$

Παρατηρείται ότι ο συντελεστής προσδιορισμού της εξίσωσης του ακετυλοσαλικυλικού οξέος που είναι 0,9772 δεν είναι αρκετά ικανοποιητικός σε σχέση με τους άλλους συντελεστές. Αυτό συμβαίνει γιατί υπάρχει μεγάλο εύρος στην τιμή της συγκέντρωσης του ακετυλοσαλικυλικού οξέος που χρησιμοποιήθηκε και έτσι το σφάλμα αυξάνεται. Αν αφαιρεθούν οι δύο μεγάλες συγκεντρώσεις 1,554 mg/ml και 1,258 mg/ml τότε η εξίσωση που λαμβάνεται είναι η εξής:

$$y = 3E + 06x - 42940$$

με συντελεστή προσδιορισμού  $r^2 = 0,9988$ .



### 5.3 Ακρίβεια (Accuracy)

Η ακρίβεια αποτελεί το μέτρο εγγύτητας της πειραματικής τιμής προς την πραγματική/αληθινή τιμή. Καθορίζεται κατά κύριο λόγο από την ορθότητα μεταξύ της μέσης τιμής η οποία λαμβάνεται από πλήθος αποτελεσμάτων μιας δοκιμής και της αποδεκτής τιμής. Για τον προσδιορισμό της ορθότητας αρχικά αναλύονται ορισμένα δείγματα σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία της μεθόδου, προσδιορίζεται η συγκέντρωση της προς ανάλυση ουσίας, υπολογίζεται ο μέσος όρος και ως αποτέλεσμα των παραπάνω η ορθότητα ακολουθεί τον παρακάτω μαθηματικό τύπο:

$$\text{Ορθότητα (\%)} = \frac{\text{Μέση προσδιοριζόμενη τιμή}}{\text{πιστοποιημένη τιμή}} \times 100$$

Όπου η ορθότητα υπολογίζεται διαιρώντας την προσδιοριζόμενη μέση τιμή με την πιστοποιημένη τιμή και πολλαπλασιάζεται με το 100, έτσι ώστε να εκφραστεί ως ποσοστό επί τις εκατό. Αν θεωρηθεί ότι η πιστοποιημένη τιμή είναι αυτή που αναγράφεται στο φαρμακευτικό σκεύασμα και η προσδιοριζόμενη τιμή είναι αυτή που προήλθε από αναγωγή των συγκεντρώσεων των ουσιών που αναγράφονται που στο φάρμακο, τότε η ακρίβεια θα προέρχεται από τα αποτελέσματα των μετρήσεων της χρωματογραφικής ανάλυσης για την κάθε ανωτέρω περίπτωση. Τα δεδομένα από την ανάλυση του φαρμάκου, όπως αναφέρθηκαν παραπάνω κατά τη διαδικασία της μεθόδου ανάπτυξης βρίσκονται στον Πίνακα 16 και οι μέσες προσδιοριζόμενες τιμές της κάθε δραστικής ουσίας προκύπτουν από τις εξισώσεις των ευθειών, Σχήματα 19, 20 και 21.

Έτσι προκύπτει ο παρακάτω Πίνακας 20 όπου παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές τιμές που απαιτούνται για τον υπολογισμό της ορθότητας.

<b>Δραστική ουσία</b>	<b>Πιστοποιημένη τιμή</b>	<b>Προσδιοριζόμενη τιμή</b>
Παρακεταμόλη	0,2	0,2
Καφεΐνη	0,05	0,05
Ακετυλοσαλικυλικό οξύ	0,4	0,4

Πίνακας 20: Χαρακτηριστικές τιμές για τον υπολογισμό της ορθότητας

Έτσι, χρησιμοποιώντας τον μαθηματικό τύπο της ακρίβειας, εξάγονται τα αποτελέσματα της ακρίβειας για την κάθε ουσία.

- Για την παρακεταμόλη:

$$\text{ορθότητα(\%)} = \frac{0,2}{0,2} \times 100 = 100\%$$

- Για την καφεΐνη:

$$\text{ορθότητα(\%)} = \frac{0,05}{0,05} \times 100 = 100\%$$

- Για το ακετυλοσαλικυλικό οξύ:

$$\text{ορθότητα(\%)} = \frac{0,4}{0,4} \times 100 = 100\%$$

#### **5.4 Πιστότητα (Precision)**

Η πιστότητα εκφράζει την εγγύτητα μεταξύ των μετρήσεων μέσω της επαναληψιμότητας που παρατηρηθήκαν από συγκεκριμένη αναλυτική μέθοδο και είναι ανεξάρτητη με την εγγύτητα η οποία αφορά την πραγματική τιμή. Σχετίζεται άμεσα με τη διασπορά των αριθμητικών δεδομένων και για τον υπολογισμό της η κύρια μαθηματική παράμετρος που χρησιμοποιείται είναι η τυπική απόκλιση (SD, standard deviation) και ο συντελεστής μεταβλητότητας (CV). Η επαναληψιμότητα ορίζεται ως το μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων στο υπό ανάλυση δείγμα, όπου η πειραματική διαδικασία διεξάγεται κάτω από τις ίδιες συνθήκες της μεθόδου.

Για τον υπολογισμό της επαναληψιμότητας διαιρείται το δείγμα σε υποδείγματα, αναλύουμε το κάθε δείγμα σύμφωνα με τη μέθοδο, προσδιορίζεται η συγκέντρωση της προς ανάλυση ουσίας, υπολογίζεται τη μέση τιμή, την τυπική απόκλιση και ο συντελεστής μεταβλητότητας και επαναλαμβάνοντας τα στάδια αυτά τελικά υπολογίζεται η συνολική μέση τιμή. Για την ανάλυση του φαρμάκου χρησιμοποιείται το ίδιο δείγμα τέσσερις φορές, Πίνακας 21, για να μπορεί να εξεταστεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων.

<b>Δραστική ουσία</b>	<b>1<sup>η</sup> μέτρηση</b>	<b>2<sup>η</sup> μέτρηση</b>	<b>3<sup>η</sup> μέτρηση</b>	<b>4<sup>η</sup> μέτρηση</b>
Παρακεταμόλη	2481331	2527548	2537102	2517230
Καφεΐνη	1237920	1244556	1248498	1241556
Ακετυλοσαλικυλικό οξύ	1157059	1181330	1181479	1180105

Πίνακας 21: Πειραματικά δεδομένα τεσσάρων μετρήσεων.

Από τις μετρήσεις του παραπάνω πίνακα, με στατιστική ανάλυση προκύπτουν τα παρακάτω αποτελέσματα των μέσων τιμών και της τυπικής απόκλισης της κάθε ουσίας, Πίνακας 22.

<b>Δραστική ουσία</b>	<b>Μέση τιμή (MV)</b>	<b>Τυπική απόκλιση (SD)</b>	<b>Συντελεστής μεταβλητότητας%(CV%)</b>
Παρακεταμόλη	2515800	24371	0,96
Καφεΐνη	1243100	4489	0,36
Ακετυλοσαλικυλικό οξύ	1174990	11972	1,01

Πίνακας 22: Υπολογισμοί για μέση τιμή, τυπική απόκλιση και συντελεστή μεταβλητότητας.

Ο συντελεστής μεταβλητότητας είναι το πηλίκο της τυπικής απόκλισης δια τη μέση τιμή:

$$\text{Συντελεστής μεταβλητότητας} = \frac{\text{τυπική απόκλιση}}{\text{μέση τιμή}}$$

Ο συντελεστής μεταβολής υπολογίζεται επί τοις εκατό και είναι ανεξάρτητος από τις μονάδες μέτρησης καθώς εκφράζει ένα μέτρο σχετικής διασποράς των τιμών της μεταβλητής. Ένα δείγμα τιμών μιας μεταβλητής χαρακτηρίζεται ομοιογενές όταν ο CV είναι μικρότερος ή ίσος από το 10%. Στην παρούσα μέθοδο ανάπτυξης η πιστότητα είναι εξαιρετική εφόσον ο συντελεστής μεταβλητότητας έχει τόσο χαμηλή τιμή.

### **5.5 Περιοχή εργασίας (Working range)**

Η περιοχή εργασίας μιας αναλυτικής μεθόδου ορίζεται ως το εύρος μεταξύ του μέγιστου και του ελάχιστου επιπέδου συγκέντρωσης της εκάστοτε προσδιοριζόμενης ουσίας. Το εύρος αυτό είναι συνήθως εκείνο στο οποίο ανήκουν τα παραπάνω αναφερθέντα χαρακτηριστικά (ακρίβεια, πιστότητα, γραμμικότητα). Η περιοχή εργασίας καθορίζεται χρησιμοποιώντας τα δεδομένα (εύρος τιμών) από τους προηγούμενους υπολογισμούς όπως αυτά έχουν αναφερθεί προηγουμένως στη μέθοδο ανάπτυξης.

Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου οι αρχικές και οι τελικές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τις τρεις δραστικές ουσίες είναι:

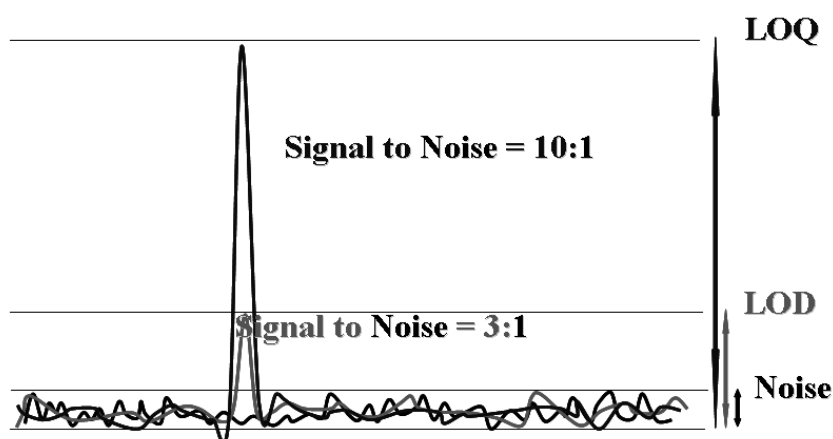
- Παρακεταμόλη: από 0,123 mg/ml μέχρι 0,757mg/ml
- Καφεΐνη: από 0,030 mg/ml μέχρι 0,327 mg/ml
- Ακετυλοσαλικυλικό οξύ: από 0,250 mg/ml μέχρι 1,554 mg/ml

Οι αρχικές, οι τελικές καθώς και ενδιάμεσες συγκεντρώσεις των ουσιών αυτών χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των παραπάνω παραμέτρων για τη διαπίστευση της μεθόδου.

## 5.6 Ανιχνευσιμότητα (Detectability)

Η ανιχνευσιμότητα μιας μεθόδου εκφράζει την ικανότητά της να ποσοτικοποιεί χαμηλές συγκεντρώσεις του αναλύτη. Συνήθως η ανιχνευσιμότητα χρησιμοποιείται ως μέτρηση βάση του υπολογισμού δύο άλλων παραμέτρων οι οποίες είναι το όριο ανιχνεύσεως (detection of limit) και το όριο ποσοτικοποίησης (quantitation of limit).

Σχηματικά (Σχήμα 22) απεικονίζεται η αναλογία του θορύβου ως προς το όριο ανίχνευσης (LOD) και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ).



Σχήμα 22: Διάγραμμα της αναλογίας μεταξύ θορύβου-ορίου ανίχνευσης- ορίου ποσοτικοποίησης.

Όπως παρατηρείται στο Σχήμα 22, η ποσοτική αναλογία του ορίου ποσοτικοποίησης ως προς τον θόρυβο του χρωματογραφήματος που προκύπτει από τα διαγράμματα υπό ανάλυση ουσιών θα είναι 3 προς 1 και η ποσοτική αναλογία του ορίου ποσοτικοποίησης ως προς τον θόρυβο θα είναι 10 προς 1.

### 5.6.1 Όριο ανιχνεύσεως (Detection Limit-LOD)

Το όριο ανιχνεύσεως είναι η συγκέντρωση του δείγματος στην οποία το αναλυτικό σήμα διαφέρει από το σήμα των ενώσεων της κινητής φάσης κατά 3,3 φορές την τυπική απόκλιση του δεύτερου σήματος. Από την καμπύλη αναφοράς που προκύπτει για κάθε δραστική ουσία, μπορεί να υπολογιστεί το όριο ανίχνευσης των ουσιών βάση της τυπικής απόκλισης (SD) που παρατηρήθηκε από το χρωματογράφημα και

την κλίση της καμπύλης απόκρισης (slope,b). Η ευθείες που βρέθηκαν για την κάθε ένωση είναι της μορφής  $y = b \times x + a$  , όπου b είναι η κλίση της ευθείας.

Πιο συγκεκριμένα ο μαθηματικός τύπος που χρησιμοποιείται είναι:

$$LOD = \frac{3,3 \times SD}{b}$$

Η εξίσωση της ευθείας της παρακεταμόλης είναι η:

$$y = 1E + 07x + 267688$$

με τυπική απόκλιση της SD=232842.

Από την εξίσωση αυτή προκύπτει ότι το όριο ανίχνευσης για την παρακεταμόλη είναι LOD=76,8 μg.

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς της καφεΐνης είναι η:

$$y = 2E + 07x + 184312$$

με τυπική απόκλιση SD=30286.

Από την εξίσωση αυτή προκύπτει ότι το όριο ανίχνευσης για την καφεΐνη είναι LOD=4,99 μg.

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς για το ακετυλοσαλικυλικό οξύ είναι η:

$$y = 3E + 06x - 185577$$

με τυπική απόκλιση της SD=249162.

Από την εξίσωση αυτή προκύπτει ότι το όριο ανίχνευσης για το ακετυλοσαλικυλικό οξύ είναι LOD=274 μg. Συγκεντρωτικά παρουσιάζεται ο Πίνακας 23 που παρουσιάζει τα όρια ανίχνευσης των δραστικών ουσιών .

<b>Δραστική ουσία</b>	<b>Όριο ανίχνευσης (LOD) σε μg</b>
Παρακεταμόλη	76,8
Καφεΐνη	4,99
Ακετυλοσαλικυλικό οξύ	274

Πίνακας 23: Τα όρια ανίχνευσης των δραστικών ουσιών.

### 5.6.2 Όριο ποσοτικοποίησης (Quantitation Limit-LOQ)

Το όριο ποσοτικοποίησης είναι η συγκέντρωση του δείγματος στην οποία το αναλυτικό σήμα διαφέρει από αυτό της κινητής φάσης κατά 10 φορές την τυπική απόκλιση του δευτέρου. Από την καμπύλη αναφοράς που προέκυψε για κάθε δραστική ουσία, υπολογίζεται το όριο ποσοτικοποίησης των ουσιών βάση της τυπικής απόκλισης (SD) που παρατηρήθηκε από το χρωματογράφημα και την κλίση της καμπύλης απόκρισης (slope,b). Η ευθείες που εξήχθησαν για την κάθε ένωση είναι της μορφής

$$y = b \times x + a$$

όπου b είναι η κλίση της ευθείας.

Πιο συγκεκριμένα ο μαθηματικός τύπος που χρησιμοποιείται είναι:

$$LOQ = \frac{10 \times SD}{b}$$

Χρησιμοποιώντας τις εξισώσεις των δραστικών ουσιών όπως και παραπάνω, εφαρμόζοντας τον μαθηματικό τύπο του ορίου ποσοτικοποίησης προκύπτει ότι για την παρακεταμόλη το όριο ποσοτικοποίησης είναι LOQ=0,23 mg.

Για την καφεΐνη βρίσκουμε ότι LOQ=0,015 mg.

Για το ακετυλοσαλικυλικό οξύ βρίσκουμε ότι LOQ=0,618 mg. Συγκεντρωτικά παρουσιάζεται ο Πίνακας 24 με τα όρια ποσοτικοποίησης των δραστικών ουσιών.

Δραστική ουσία	Όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) σε mg
Παρακεταμόλη	0,23
Καφεΐνη	0,015
Ακετυλοσαλικυλικό οξύ	0,618

Πίνακας 24: Τα όρια ποσοτικοποίησης των δραστικών ουσιών.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανάπτυξη και διαπίστευση της μεθόδου ανάλυσης του παυσίπουνου-αναλγητικού SPLENTIR. Η ανάλυση έγινε τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Οι βασικές δραστικές ουσίες του φαρμακευτικού σκευάσματος ήταν τρεις: το ακετυλοσαλικυλικό οξύ, η παρακεταμόλη και η καφεΐνη. Τα στάδια της αναλυτικής πειραματικής διαδικασίας δημιουργήθηκαν έτσι ώστε να είναι κατάλληλα για την ορθή μελέτη των ενώσεων αυτών.

Αναλυτικότερα, για την ταυτόχρονη ανίχνευση των τριών βασικών ουσιών επιλέχθηκε αρχικά το κατάλληλο μήκος κύματος μέσω φασματογράφου UV. Στο μήκος κύματος που επιλέχθηκε είναι εφικτή η παρατήρηση των ουσιών αυτών, όπου εμφανίζονται ως κορυφές στο χρωματογράφημα. Το προσδιοριζόμενο μήκος κύματος που ήταν κατάλληλο για ταυτόχρονη παρατήρηση του ακετυλοσαλικυλικού οξέος, της παρακεταμόλης και της καφεΐνης βρέθηκε ότι είναι στα 275 nm. Στα 275 nm οι κορυφές ήταν πολύ διακριτές και αυτό ήταν πολύ σημαντικό για τη συνολική πειραματική διαδικασία.

Η επιλογή της σύστασης καθώς και της αναλογίας της κινητής φάσης αποτέλεσε σημαντικό παράγοντα και έγινε μέσω πολλαπλά επαναλαμβανόμενων πειραμάτων με διαφορετικές αναλογίες. Από τα πειράματα αυτά πολλά ήταν αυστηρώς ακατάλληλα για την ανάλυση μας, λόγω των έλλειψης των κορυφών (εμφανιζόντουσαν δύο κορυφές αντί για τρεις) και σε άλλα πειράματα οι κορυφές είχαν μέτρια εμφάνιση (μεγάλο εύρος). Τελικά από το σύνολο των πειραμάτων επιλέχθηκε η σύσταση κατά την οποία οι εμφανιζόμενες κορυφές είχαν άριστη μορφή όσον αφορά το εύρος τους.

Η επιλογή της αναλογίας της κινητής φάσης έγινε βάση του απαιτούμενου χρόνου της πειραματικής διαδικασίας, καθώς το ποσοστό πολικού και μη πολικού διαλύτη επηρεάζει άμεσα τη χρονική διάρκεια της ανάλυσης. Αφετέρου επιλέχθηκε βάση της μορφής του χρωματογραφήματος, καθώς η αναλογία της σύστασης της κινητής φάσης καθορίζει τον χρόνο κατακράτησης της κάθε ουσίας και κατά συνέπεια και τον χρόνο που εμφανίζονται οι κορυφές των δραστικών ουσιών στο χρωματογράφημα. Τελικά, επιλέχθηκε ως διάλυμα κινητής φάσης ακετονιτρίλιο/νερό σε αναλογία 25/75 γιατί σε αυτήν την αναλογία ο συνολικός χρόνος της πειραματικής διαδικασίας ανερχόταν στα 7 λεπτά. Το γεγονός αυτό είναι πολύ σημαντικό καθώς ο συνολικός



χρόνος της ανάλυσης είναι πολύ μικρός και δεν υπήρχε αλληλοεπικάλυψη των κορυφών των δραστικών ουσιών. Ο χρόνος ανάλυσης του SPLENTIR είναι από τους μικρότερους χρόνους ανάλυσης 3 δραστικών ουσιών που υπάρχει στη βιβλιογραφία. Η ταχύτητα ροής της πειραματικής διάταξης ήταν στο 1 ml/λεπτό. Το pH κατά το οποίο δεν παρατηρούνταν ουρές ή πλατιές κορυφές στο χρωματογράφημα βρέθηκε ότι ήταν στην τιμή 2,46, οπότε και ήταν σταθερό σε αυτήν τιμή, μέσω ρυθμιστικού διαλύματος, σε όλες τις αναλύσεις που διεκπεραιώθηκαν.

Με τις συνθήκες αυτές που περιγράφονται παραπάνω και ολοκληρώνουν τη μέθοδο ανάπτυξης, περατώθηκε η ανάπτυξη της μεθόδου ανάλυσης του φαρμάκου με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης και εν συνεχεία από τα πειραματικά δεδομένα που ελήφθησαν από την ανάλυση ακολούθησε η διαπίστευση της μεθόδου. Κατά τη διαπίστευση της μεθόδου προσδιορίστηκαν βασικές παράμετροι όπως: η γραμμικότητα, η ακρίβεια, η πιστότητα, η περιοχή εργασίας και η ανιχνευσιμότητα. Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων των παραμέτρων αυτών προκύπτει ότι η συγκεκριμένη μέθοδος ανάπτυξης είναι συνολικά ακριβής και ταχεία.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην συνολική πειραματική διαδικασία ήταν:

Ακετυλοσαλικυλικό οξύ-Acetylsalicylic acid (SIGMA)

Παρακεταμόλη-4-Acetamidophenol (FLUKA)

Καφεΐνη-Caffeine (SIGMA)

Acetonitrile PESTANAL (for HPLC analysis) Riedel-de Haen

Για το pH buffer: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Sulfuric Acid 95-98 % extra pure (MERCK)

Το νερό που χρησιμοποιήθηκε ήταν απιονισμένο ποιότητας, nanopure18ΜΩ (EASYpure model D7033, Barnsted) και διηθήθηκε με φίλτρο Barnsted διαμέτρου 0,2 μm.

Το χρωματογραφικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από τα εξής μέρη:

- Δύο αντλίες SHIMADZU τύπου LC-10AD Vp για την άντληση της κινητής φάσης.
- Έναν ρυθμιστή SHIMADZU τύπου SCL-10A Vp ο οποίος παρέχει τη δυνατότητα για βαθμιδωτή έκλουση.
- Βρόγχο δείγματος όγκου 20 μl, όπου εισέρχεται το δείγμα στο σύστημα χρωματογραφίας.
- Λογισμικό πρόγραμμα QP8000 έκδοση 1.21.

Για τη χρωματογραφική ανάλυση του φαρμάκου SPLENTIR χρησιμοποιήθηκε η στήλη GraceSmart RP 18 5u (Lot. No 43/138, 250 nm x 4,6 nm) της εταιρείας GRACE.

Τα σωληνάκια του χρωματογραφικού συστήματος αποτελούνται από υλικό PEEK (Polyether ether ketone).

Για τις φασματοσκοπικές μετρήσεις UV-Vis χρησιμοποιήθηκαν ειδικές κυψελίδες SUPRASIL.

## ΛΙΣΤΑ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

- Σχήμα 1:Μια τυπική διάταξη της υγρής χρωματογραφίας.
- Σχήμα 2:Ο συντελεστής κατακράτησης  $k'$ .
- Σχήμα 3:Το εύρος της κορυφής και ο χρόνος κατακράτησης για τον υπολογισμό των θεωρητικών πλακών.
- Σχήμα 4:Η επιλεκτικότητα υπολογίζεται από τους συντελεστές κατακράτησης των κορυφών.
- Σχήμα 5:Χρωματογράφημα με τους αριθμητικούς συντελεστές που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της διαχωριστικότητας.
- Σχήμα 6:Διάγραμμα βασισμένο στην εξίσωση Van Deemter.
- Σχήμα 7:Φάσμα απορρόφησης του ακετυλοσαλικυλικού οξέος.
- Σχήμα 8:Φάσμα απορρόφησης της παρακεταμόλης.
- Σχήμα 9:Φάσμα απορρόφησης της καφεΐνης.
- Σχήμα 10:Υδρόλυση του ακετυλοσαλικυλικού οξέος.
- Σχήμα 11:Χρωματογράφημα των δραστικών ουσιών χωρίς σταθερό pH.
- Σχήμα 12:Διάγραμμα χρωματογραφίας των δραστικών ουσιών με αναλογία κινητής φάσης 40/60 ακετονιτρίλιο/νερό.
- Σχήμα 13:Ο χρόνος κατακράτησης του ακετυλοσαλικυλικού οξέος.
- Σχήμα 14:Ο χρόνος κατακράτησης της παρακεταμόλης.
- Σχήμα 15:Ο χρόνος κατακράτησης της παρακεταμόλης.
- Σχήμα 16:Το χρωματογράφημα των τριών ουσιών.
- Σχήμα 17:Χρωματογράφημα του φαρμακευτικού σκευάσματος.
- Σχήμα 18:Διάγραμμα στο οποίο παρατηρείται το σαλικυλικό οξύ.
- Σχήμα 19:Καμπύλη βαθμονόμησης της παρακεταμόλης.
- Σχήμα 20:Καμπύλη βαθμονόμησης της καφεΐνης.
- Σχήμα 21:Καμπύλη βαθμονόμησης του ακετυλοσαλικυλικού οξέος.
- Σχήμα 22:Διάγραμμα της αναλογίας μεταξύ θορύβου-ορίου ανίχνευσης- ορίου ποσοτικοποίησης.

## ΛΙΣΤΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

- Πίνακας 1:Το  $pK_a$  των δραστικών ουσιών.
- Πίνακας 2:Το  $\log P$  των δραστικών ουσιών.
- Πίνακας 3:Μήκη κύματος της απορρόφησης των δραστικών ουσιών.
- Πίνακας 4:Η μοριακή δομή των τριών δραστικών ουσιών του splentir.
- Πίνακας 5:Τα χαρακτηριστικά του ακετυλοσαλικυλικού οξέος.
- Πίνακας 6:Τα χαρακτηριστικά της καφεΐνης.
- Πίνακας 7:Τα χαρακτηριστικά της παρακεταμόλης.
- Πίνακας 8:Οι χρόνοι κατακράτησης των ουσιών σε αναλογία κινητής φάσης 40/60 ακετονιτρίλιο/νερό.
- Πίνακας 9:Οι χρόνοι κατακράτησης των δραστικών ουσιών.
- Πίνακας 10:Ποσότητες και συγκεντρώσεις των ουσιών του splentir.
- Πίνακας 11 :Χρόνοι κατακράτησης των ουσιών του φαρμάκου.
- Πίνακας 12:Συγκεντρώσεις φαρμάκου και μείγματος.
- Πίνακας 13:Αποτελέσματα του χρωματογραφήματος του φαρμάκου.
- Πίνακας 14:Αποτελέσματα του χρωματογραφήματος του μείγματος.
- Πίνακας 15:Ο συντελεστής κατακράτησης και ο αριθμός των θεωρητικών πλακών των τριών ουσιών.
- Πίνακας 16:Η επιλεκτικότητα και η διαχωριστικότητα των τριών δραστικών ουσιών.
- Πίνακας 17:Συγκέντρωση και εμβαδόν της καμπύλης της παρακεταμόλης.
- Πίνακας 18:Συγκέντρωση και εμβαδόν της καμπύλης της καφεΐνης.
- Πίνακας 19:Συγκέντρωση και εμβαδόν της καμπύλης του ακετυλοσαλικυλικού οξέος.
- Πίνακας 20:Χαρακτηριστικές τιμές για τον υπολογισμό της ορθότητας.
- Πίνακας 21:Πειραματικά δεδομένα τεσσάρων μετρήσεων.
- Πίνακας 22:Υπολογισμοί για μέση τιμή, τυπική απόκλιση και συντελεστή μεταβλητότητας.
- Πίνακας 23:Τα όρια ανίχνευσης των δραστικών ουσιών.
- Πίνακας 24:Τα όρια ποσοτικοποίησης των δραστικών ουσιών.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Gilpin, R.K. and L.A. Pachla, *Pharmaceuticals and related drugs*. Analytical Chemistry, 1999. **71**(12): p. 217R-233R.
2. Bartos, D. and S. Görög, *Recent advances in the impurity profiling of drugs*. Current Pharmaceutical Analysis, 2008. **4**(4): p. 215-230.
3. Aboul-Enein, H.Y., M.M. Hefnawy, and K. Nakashima, *Chapter 2 Chromatographic methods for the analysis of drugs in biological fluids*. 2004. p. 15-75.
4. <http://www.intertek.com/pharmaceutical/analysis/>.
5. Oliva, A.M., J.B. Fariña, and M. Llabrés, *New trends in analysis of biopharmaceutical products*. Current Pharmaceutical Analysis, 2007. **3**(4): p. 230-248.
6. <http://www.usp.org/USPVerified/pharmaceuticalIngredients/>.
7. [www.eof.gr/](http://www.eof.gr/).
8. [www.ifet.gr/](http://www.ifet.gr/).
9. Hari Krishnan, N., et al., *Simultaneous estimation and validation of paracetamol, aceclofenac and chlorzoxazone by HPLC in pure and pharmaceutical dosage form*. Asian Journal of Chemistry, 2008. **20**(4): p. 2557-2562.
10. Harikrishnan, N., et al., *Simultaneous estimation of aceclofenac and paracetamol by HPTLC in pure and pharmaceutical dosage form*. Asian Journal of Chemistry, 2007. **19**(5): p. 3918-3922.
11. Wang, M.J., et al., *Comparison of three RP-HPLC methods for analysis of cefpodoxime proxetil and related substances*. Chromatographia, 2007. **65**(1-2): p. 69-75.
12. Saracino, M.A., et al., *Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of olanzapine and lamotrigine in plasma of bipolar patients*. Therapeutic Drug Monitoring, 2007. **29**(6): p. 773-780.
13. Bajerski, L., et al., *Stability-indicating LC determination of a new antihypertensive, olmesartan medoxomil in tablets*. Chromatographia, 2008. **68**(11-12): p. 991-996.
14. Kachhadia, P.K., et al., *Validated LC method for simultaneous analysis of tramadol hydrochloride and aceclofenac in a commercial tablet*. Chromatographia, 2008. **68**(11-12): p. 997-1001.
15. Rathinavel, G., et al., *A validated RP - HPLC method for simultaneous estimation of cefixime and cloxacillin in tablets*. E-Journal of Chemistry, 2008. **5**(3): p. 648-651.
16. Weich, A., et al., *Validation of UV spectrophotometric and HPLC methods for quantitative determination of atenolol in pharmaceutical preparations*. Latin American Journal of Pharmacy, 2007. **26**(5): p. 765-770.
17. Matkovic, S.R., et al., *Development and validation of the quantitative analysis of ibuprofen in tablets by IR spectroscopy*. Desarrollo y validación del análisis cuantitativo de ibuprofeno en comprimidos por espectroscopía infrarroja, 2004. **23**(4): p. 527-532.
18. Vivek, G. and C.G. Bonde, *Statistical assurance of process validation by analytical method development and validation for levofloxacin IR tablets and blend*. International Journal of PharmTech Research, 2009. **1**(3): p. 921-924.
19. Holzgrabe, U., *Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications*. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 2010. **57**(2): p. 229-240.

20. Wishart, D., *NMR spectroscopy and protein structure determination: Applications to drug discovery and development*. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2005. **6**(2): p. 105-120.
21. Zhao, Y., et al., *Rapid analysis of antiepileptic drugs in human plasma by micellar electrokinetic capillary chromatography*. Yaoxue Xuebao, 2006. **41**(3): p. 210-215.
22. Yang, X.J., et al., *Electromagnetic induction detector for capillary electrophoresis and its application in pharmaceutical analysis*. Talanta, 2010. **82**(5): p. 1935-1942.
23. <http://chromatographyonline.findanalytichem.com/lcgc/data/articlestandard//lcgeurope/162003/53701/article.pdf>.
24. Manna, L., L. Valvo, and P. Betto, *Determination of oxidized and reduced glutathione in pharmaceuticals by reversed-phase high-performance liquid chromatography with dual electrochemical detection*. Journal of Chromatography A, 1999. **846**(1-2): p. 59-64.
25. Shaikh, K.A., S.D. Patil, and A.B. Devkhile, *Development and validation of a reversed-phase HPLC method for simultaneous estimation of ambroxol hydrochloride and azithromycin in tablet dosage form*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008. **48**(5): p. 1481-1484.
26. Chaturvedi, P.K. and R. Sharma, *Development and validation of an RP-HPLC method for simultaneous analysis of a three-component tablet formulation containing metformin hydrochloride, pioglitazone hydrochloride, and glibenclamide*. Acta Chromatographica, 2008. **20**(3): p. 451-461.
27. Moreira, T.S., et al., *Development and validation of HPLC and UV spectrophotometry methods for the determination of lumiracoxib in tablets*. Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada, 2008. **29**(3): p. 267-275.
28. Junior, L.B., et al., *Development and validation of LC-MS/MS method for the simultaneous determination of quinine and doxycycline in pharmaceutical formulations*. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 2009. **32**(18): p. 2699-2711.
29. Ashfaq, M., I.U. Khan, and M.N. Asghar, *Development and validation of liquid chromatographic method for gemfibrozil and simvastatin in binary combination*. Journal of the Chilean Chemical Society, 2008. **53**(3): p. 1617-1619.
30. Manchón, N., et al., *Fast analysis of isoflavones by high-performance liquid chromatography using a column packed with fused-core particles*. Talanta, 2010. **82**(5): p. 1986-1994.
31. Αρχές της ενόργανης ανάλυσης Skoog, H., Nieman.
32. [http://www.comsol.com/stories/waters\\_corp\\_hplc\\_systems/full/](http://www.comsol.com/stories/waters_corp_hplc_systems/full/).
33. <http://www.chromatography-online.org/Dispersion/Van-Deemter-Equation/rs45.html>.
34. <http://www.analyticalventura.com/np-hplc.shtml>.
35. <http://www.analyticalventura.com/rp-hplc.shtml>.
36. Can, N.O. and G. Arli, *Reversed-phase HPLC analysis of levetiracetam in tablets using monolithic and conventional c18 silica column*. Journal of AOAC International, 2010. **93**(4): p. 1077-1085.

37. Baker, J.S., et al., *Physical characterization and evaluation of HPLC columns packed with superficially porous particles*. Journal of Separation Science, 2010. **33**(17-18): p. 2547-2557.
38. Zheng, J., et al., *Comparison study of porous, fused-core, and monolithic silica-based C18 HPLC columns for Celestoderm-V Ointment® analysis*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2009. **50**(5): p. 815-822.
39. Ahuja, S., *Chromatography and separation science*.
40. *Physical biochemistry: principles and applications*. David Sheehan.
41. Kataoka, H. and H.L. Lord, *Chapter 23 Sampling and sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis*. 2002. p. 779-836.
42. Ruiz-Garcia, A., et al., *Pharmacokinetics in drug discovery*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008. **97**(2): p. 654-690.
43. <http://www.chromatography-online.org/topics/method/development.html>.
44. Eric V. Anslyn, D.A.D., *Modern physical organic chemistry*
45. Völgyi, G., et al., *Potentiometric and spectrophotometric pK<sub>a</sub> determination of water-insoluble compounds: Validation study in a new cosolvent system*. Analytica Chimica Acta, 2007. **583**(2): p. 418-428.
46. <http://www.chemicaland21.com/lifescience/phar/ACETYLSALICYLIC%20ACID.htm>.
47. <http://www.pharmweb.net/pwmirror/pwy/paracetamol/pharmwebpic.html>.
48. Gritti, F. and G. Guiochon, *Adsorption mechanism of acids and bases in reversed-phase liquid chromatography in weak buffered mobile phases designed for liquid chromatography/mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(10): p. 1776-1788.
49. <http://chrom.tutms.tut.ac.jp/JINNO/DRUGDATA/02caffeine.html>.
50. <http://www.molinspiration.com/>.
51. Bosch, M.E., et al., *Determination of paracetamol: Historical evolution*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006. **42**(3): p. 291-321.
52. Panahi, H.A., et al., *HPTLC separation and quantitative analysis of aspirin, salicylic acid, and sulfosalicylic acid*. Journal of Planar Chromatography - Modern TLC, 2010. **23**(2): p. 137-140.
53. Suresh Kumar, S., et al., *Analytical method development and validation for aspirin*. International Journal of ChemTech Research, 2010. **2**(1): p. 389-399.
54. Akay, C., et al., *Rapid and simultaneous determination of acetylsalicylic acid, paracetamol, and their degradation and toxic impurity products by HPLC in pharmaceutical dosage forms*. Turkish Journal of Medical Sciences, 2008. **38**(2): p. 167-173.
55. Fegade, J.D., et al., *Development and validation of Reverse Phase High Performance Liquid Chromatographic method for simultaneous estimation of paracetamol and piroxicam in tablet*. International Journal of PharmTech Research, 2009. **1**(2): p. 184-190.
56. Gopinath, R., et al., *A RP-HPLC method for simultaneous estimation of paracetamol and aceclofenac in tablets*. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007. **69**(1): p. 137-140.
57. Soponar, F., A.C. Moț, and C. Sârbu, *Quantitative evaluation of paracetamol and caffeine from pharmaceutical preparations using image analysis and RP-TLC*. Chromatographia, 2009. **69**(1-2): p. 151-155.

58. Pucci, V., et al., *Reversed-phase capillary electrochromatography for the simultaneous determination of acetylsalicylic acid, paracetamol, and caffeine in analgesic tablets*. *Electrophoresis*, 2004. **25**(4-5): p. 615-621.
59. Saito, Y., M. Hayashida, and K. Jinno, *Chapter 1 Sample preparation for the analysis of drugs in biological fluids*. 2004. p. 1-14.
60. Ulu, S.T., *Determination of carbamazepine in pharmaceutical preparations using high-performance liquid chromatography and derivative spectrophotometry*. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2006. **3**(3): p. 123-139.
61. Sadasivudu, P., N. Shastri, and M. Sadanandam, *Development and validation of RP-HPLC and UV methods of analysis for fluconazole in pharmaceutical solid dosage forms*. *International Journal of ChemTech Research*, 2009. **1**(4): p. 1131-1136.
62. Patil, T. and Y. Pore, *Development and validation of simultaneous UV spectrophotometric method for the determination of levofloxacin and ambroxol in tablets*. *Journal of the Korean Chemical Society*, 2008. **52**(6): p. 622-629.
63. Saracino, M.A., et al., *Rapid HPLC analysis of the antiepileptic lamotrigine and its metabolites in human plasma*. *Journal of Separation Science*, 2007. **30**(14): p. 2249-2255.
64. Baranowska, I., S. Magiera, and K. Bortniczuk, *Reverse-phase HPLC method for the simultaneous analysis of triclosan and triclocarban in surface waters*. 2010. p. 173-180.
65. *Method validation in pharmaceutical analysis: a guide to best practice* Joachim Ermer, J.H.M.M.
66. *Analytical method validation and instrument performance verification*, C.C.C., Y.C. Lee, Herman Lam.