



Σχολή Θετικών Επιστημών
Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση

Διπλωματική Εργασία

Σύγχρονες Τεχνικές για την Ανάλυση και τον Ποσοτικό
Προσδιορισμό Ουσιών σε Φαρμακευτικά Εναιωρήματα

Ζωή – Γεωργία Λιακοπούλου

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Όρκουλα Μαλβίνα

Συν-επιβλέπων Καθηγητής: Κοντογιάννης Χρήστος

Πάτρα, Ιούνιος 2023

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του φοιτητή/της φοιτήτριας («συγγραφέας/δημιουργός») που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο/η συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του/της συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του/της συγγραφέα/δημιουργού. Ο/Η συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.



Σύγχρονες Τεχνικές για την Ανάλυση και τον Ποσοτικό Προσδιορισμό Ουσιών σε Φαρμακευτικά Εναιωρήματα

Ζωή – Γεωργία Λιακοπούλου

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια :

Όρκουλα Μαλβλίνα

Επίκουρος Καθηγήτρια Ενόργανης

Φαρμακευτικής Ανάλυσης, Τμήμα

Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής:

Κοντογιάννης Χρήστος

Καθηγητής Ενόργανης Ανάλυσης

Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο
Πατρών

Πάτρα, Ιούνιος 2023

Στην οικογένειά μου

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται σύγχρονες τεχνικές ανάλυσης για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των φαρμακευτικών εναιωρημάτων. Τα φαρμακευτικά εναιωρήματα είναι αποδεδειγμένα από τις πιο δύσκολες φαρμακολογικές μορφές ως προς την ανάλυσή τους, και το γεγονός αυτό αποτελεί μία πρόκληση για τους ερευνητές. Τα εναιωρήματα είναι συνήθως υγρά διαλύματα τα οποία περιέχουν στερεά αδιάλυτα σωματίδια κατανεμημένα σε όλο τον όγκο του μέσου εναιώρησης (διάλυμα). Ως εκ τούτου αποτελούνται από διαφορετικές φάσεις συνήθως μία υγρή και μία στερεή, και για το λόγο αυτό η σύστασή τους είναι πολύπλοκη σε σχέση με άλλα φαρμακευτικά σκευάσματα (π.χ. δισκία). Στην παρούσα εργασία γίνεται μία αναφορά στα διάφορα είδη των φαρμακευτικών εναιωρημάτων, στον τρόπο παραγωγής τους αλλά και στα διάφορα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα που έχουν. Επιπλέον παρουσιάζονται σύγχρονες αναλυτικές τεχνικές που εφαρμόζονται ευρέως από ερευνητές σε εργαστήρια και σε φαρμακευτικές βιομηχανίες για τον ποιοτικό έλεγχο, την ταυτοποίηση αλλά και τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενεργών συστατικών (APIs) των εναιωρημάτων. Πιο συγκεκριμένα αναφέρονται 4 από τις πιο βασικές και ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους στα σύγχρονα εργαστήρια. Αρχικά γίνεται αναφορά στη φασματοσκοπία Raman και τα πλεονεκτήματά της στην ανάλυση των φαρμακευτικών εναιωρημάτων. Ακολούθως παρουσιάζεται η φασματοσκοπία περίθλασης ακτίνων X (XRD) και η εφαρμογή της σε τέτοιου είδους πολύπλοκα δείγματα. Έπειτα παρουσιάζεται η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) και η χρησιμότητα της στην ανάλυση των φαρμακευτικών εναιωρημάτων. Τέλος γίνεται αναφορά σε μία από τις πιο σύγχρονες μεθόδους που εφαρμόζεται στις μέρες μας την υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης ή υψηλής πίεσης HPLC (High Performance–Pressure Liquid Chromatography).

Λέξεις Κλειδιά: Φαρμακευτικά εναιωρήματα, Ταυτοποίηση, φασματοσκοπία, Raman, Fourier, HPLC, XRPD

Abstract

This paper presents modern analytical techniques for the determination of the quality and quantity of pharmaceutical suspensions. Pharmaceutical suspensions have proven to be one of the most difficult pharmacological forms to analyse, and this presents a challenge for scientists. Suspensions are usually liquid solutions containing solid insoluble particles distributed over the entire volume of the solution. Therefore they consist of different phases, usually a liquid and a solid, and for this reason their composition is complex compared to other pharmaceutical forms (e.g. tablets). In this paper a review presented on the different types of pharmaceutical suspensions, the way they are produced and the various advantages and disadvantages they have. In addition, modern analytical techniques are presented that they are widely applied by scientists in laboratories and pharmaceutical industries for quality control, identification and quantification of active pharmaceutical ingredients (APIs) of suspensions. More specifically, 4 of the most basic and widely used methods in modern laboratories are listed. First, reference is made to Raman spectroscopy and its advantages in the analysis of pharmaceutical suspensions. X-ray diffraction spectroscopy (XRD) and its application to such complex samples is presented below. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and its usefulness in the analysis of pharmaceutical suspensions is then presented. Finally, reference is made to one of the most modern methods applied nowadays the high performance liquid chromatography or high pressure liquid chromatography HPLC (High Performance - Pressure Liquid Chromatography).

Key Words: Pharmaceutical Suspensions, Identification, spectroscopy, Raman, Fourier, HPLC, XRPD

Περιεχόμενα

ΕΝΟΤΗΤΑ 1 ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑΤΑ

1.1 ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑΤΑ	1
1.2 Ταξινόμηση με βάση τον τρόπο χορήγησης.....	1
ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑΤΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΡΕΩΝ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ (ΔΙΕΣΠΑΡΜΕΝΗ ΦΑΣΗ).....	3
ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΗΛΕΚΤΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΤΩΝ ΣΤΕΡΕΩΝ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ	4
ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΜΕΓΕΘΟΣ ΤΩΝ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ	4
1.3 ΕΚΔΟΧΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΕ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑΤΑ.....	5
1.4 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑΤΩΝ-ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ.....	7
1.5 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑΤΩΝ	8
1.6 ΤΑΧΥΤΗΤΑ ΚΑΘΙΖΗΣΗΣ – ΕΞΙΣΩΣΗ STOKES	10

ΕΝΟΤΗΤΑ 2 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ RAMAN

2.1 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ RAMAN	11
2.2 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ RAMAN.....	11
2.3 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΕΙΡΑΜΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΑΞΗ	12
2.4 ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ.....	13
2.4.1 Πειραματική Διαδικασία.....	14
2.4.2 Φασματοσκοπικές Συνθήκες	15
2.4.3 Αποτελέσματα και επικύρωση της φασματοσκοπίας Raman	16

ΕΝΟΤΗΤΑ 3 ΠΕΡΙΘΛΑΣΗ ΑΚΤΙΝΩΝ Χ

3.1 Περίθλαση Ακτίνων Χ (XRD-XRPD) - Εισαγωγή - Βασικές αρχές.....	19
3.2 Περίθλαση ακτίνων Χ – Νόμος του Bragg.....	20
3.3 Οργανολογία – Πειραματική Διάταξη	21
3.4 Πλεονεκτήματα Φασματοσκοπίας Ακτίνων Χ	23
3.5 Παράδειγμα.....	24
3.6 Συμπεράσματα της έρευνας.....	27

ΕΝΟΤΗΤΑ 4 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ ΜΕ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ FOURIER

4.1 Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy FT-IR)	29
Εισαγωγή – Βασικές Αρχές	29
4.2 Τεχνικές Φασματοσκοπίας Υπερύθρου	29
4.3 Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (FT-IR).....	30
4.4 Πλεονεκτήματα.....	32
4.5 Παράδειγμα.....	33
4.5.1 Φάσματα FTIR	34
4.5.2 Σύγκριση Φασμάτων – Συμπεράσματα	36
ΕΝΟΤΗΤΑ 5 ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ	
5.1 HPLC ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ	38
5.2 ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ:	38
5.3 HPLC (High Performance Liquid Chromatography).....	39
5.3.1 HPLC Κανονικής Φάσης	40
5.3.2 HPLC Αντίστροφης φάσης.....	40
5.4 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ HPLC:	41
5.5 Ποιοτικός και Ποσοτικός Προσδιορισμός με HPLC:	42
5.5.1 Ποιοτικός Προσδιορισμός.....	42
5.5.2 Ποσοτικός Προσδιορισμός.....	43
5.6 Παράδειγμα.....	43
5.6.1 Χρωματογραφικές συνθήκες	44
5.6.2 Αποτελέσματα και Επικύρωση	45
5.6.3 Συμπεράσματα της έρευνας	49

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Θάλαμος δειγμάτων φασματομέτρου Raman

Εικόνα 2: Φάσματα Raman των εναιωρημάτων και του πρόσθετου διαλύματος

Εικόνα 3: . Καμπύλη βαθμονόμησης προτύπων

Εικόνα 4: Περίθλαση Ακτίνων X από έναν κρύσταλλο

Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση περίθλασης ακτίνων X

Εικόνα 6: Πειραματική Διάταξη XRPD

Εικόνα 7: Φάσματα XRPD για το δείγμα

Εικόνα 8: Φάσματα XRPD για το ίζημα

Εικόνα 9: Φάσματα ανά ρυθμό σάρωσης

Εικόνα 10: Φασματοφωτόμετρο Fourier με συμβολόμετρο Michelson

Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση Συμβολόμετρου Michelson

Εικόνα 12: Φάσμα FTIR νορφλοξασίνης

Εικόνα 13: Φάσμα FTIR Carprobol (C934)

Εικόνα 14: Φάσμα FTIR εναιωρήματος

Εικόνα 15: Φάσματα και των τριών ουσιών. (A) Νορφλοξασίνη, (B) Carprobol934, (C) Εναιώρημα

Εικόνα 16: Διάγραμμα εργαστηριακής διάταξης υγροχρωματογραφίας HPLC

Εικόνα 17: Χρωματογράφημα πρότυπων διαλυμάτων κεφιζίμης και κλαβουλανικού οξέος

Εικόνα 18: Χρωματογράφημα δειγμάτων

Εικόνα 19: Χρωματογράφημα τυφλού δείγματος

Εικόνα 20: Χρωματογράφημα εικονικού φαρμάκου Placebo

Εικόνα 21: Καμπύλη αναφοράς για την κεφιζίμη

Εικόνα 22: Καμπύλη αναφοράς για το κλαβουλανικό οξύ

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Πραγματικές και πειραματικές τιμές δείγματος

Πίνακας 2: Πραγματικές και πειραματικές τιμές προτύπων

Πίνακας 3: Αποτελέσματα μετρήσεων σε διαφορετικό pH

Πίνακας 4: Χρόνοι κατακράτησης κλαβουλανικού οξέος

Πίνακας 5: Χρόνοι κατακράτησης κεφιζίμης

ΕΝΟΤΗΤΑ 1

1.1 ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑΤΑ

Τα φαρμακευτικά εναιωρήματα είναι υγρά διαλύματα που περιέχουν λεπτά διαιρεμένα αδιάλυτα σωματίδια κατανεμημένα σχεδόν ομοιόμορφα σε όλο το διάλυμα. Το μέγεθος των σωματιδίων μπορεί να επηρεάσει τόσο τη σύσταση όσο και τη φυσικοχημική συμπεριφορά του εναιωρήματος. Σε ένα ιδανικό εναιώρημα τα αδιάλυτα σωματίδια αιωρούνται ομοιόμορφα εντός του διαλύματος και παραμένουν έτσι ακόμα και μετά από παρατεταμένες περιόδους. Ορισμένα εναιωρήματα είναι έτοιμα σκευάσματα προς χρήση σε μορφή διαλύματος, ενώ άλλα είναι διαθέσιμα σε μορφή ξηρής σκόνης, η οποία περιέχει το φάρμακο και κατάλληλους παράγοντες εναιώρησης και διασποράς που πρόκειται να αραιωθούν σε κατάλληλο διάλυμα, συνήθως καθαρό νερό. (pharmapproach 2020)

ΕΙΔΗ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑΤΩΝ

Τα φαρμακευτικά εναιωρήματα που παρασκευάζονται είναι διαφόρων ειδών και μπορούν να ταξινομηθούν με τους παρακάτω τρόπους:

- Ταξινόμηση με βάση τον τρόπο χορήγησης
- Ταξινόμηση με βάση την συγκέντρωση των στερεών σωματιδίων
- Ταξινόμηση με βάση την ηλεκτροκινητική των στερεών σωματιδίων
- Ταξινόμηση με βάση το μέγεθος των στερεών σωματιδίων

1.2 Ταξινόμηση με βάση τον τρόπο χορήγησης

1) Πόσιμο Εναιώρημα:

Πρόκειται για υγρά σκευάσματα που περιέχουν μία ή περισσότερες δραστικές ουσίες σε εναιώρημα το οποίο συνήθως είναι αρωματισμένο και μερικές φορές έγχρωμο και προορίζεται για χορήγηση από το στόμα. Τα πόσιμα εναιωρήματα μπορεί να εμφανίζουν ίζημα το οποίο όμως διασπείρεται εύκολα με ήπια ανακίνηση του δοχείου έτσι ώστε το εναιώρημα να γίνει ομοιόμορφο με σκοπό τη χορήγηση της σωστής δόσης. (pharmapproach 2020)

2) Εξωτερικά εφαρμοζόμενα εναιωρήματα – Τοπικό εναιώρημα

Τα τοπικά εναιωρήματα είναι σχεδιασμένα για δερματολογικούς, καλλυντικούς και προστατευτικούς σκοπούς. Τα εναιωρήματα αυτά είναι συνήθως έγχρωμα και μπορεί να περιέχουν κάποιο άρωμα αλλά δεν περιέχουν γλυκαντικά που περιέχουν συνήθως τα πόσιμα εναιωρήματα που αναφέρθηκαν παραπάνω. Τα τοπικά εναιωρήματα μπορεί να είναι υγρά σκευάσματα τα οποία αφήνουν στο δέρμα τη δραστική ουσία ύστερα από γρήγορη εξάτμιση του διαλύματος-μέσου διασποράς. Επίσης μπορεί να είναι ημιστερεά σε σύσταση, τα οποία περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις σκόνης διασκορπισμένες συνήθως σε μία βάση παραφίνης.

3) Ενέσιμα Εναιωρήματα

Πρόκειται για ετερογενή διαλύματα που περιέχουν αδιάλυτα σωματίδια φαρμάκου, τα οποία διασπείρονται σε φορείς είτε υδατικού είτε φυτικού ελαίου πριν χορηγηθούν στον ασθενή και είναι σχεδιασμένα για ενδομυϊκή ή υποδόρια χορήγηση. Σημαντικοί παράγοντες για τα ενέσιμα εναιωρήματα αποτελούν το ιξώδες και το μέγεθος των σωματιδίων διότι αυτά επηρεάζουν την ευκολία της έγχυσης (δυνατότητα χρήσης σύριγγας).

4) Ορθικά Εναιωρήματα

Πρόκειται για υγρά σκευάσματα που προορίζονται για ορθική χρήση. Τα συγκεκριμένα εναιωρήματα συνήθως χορηγούνται για τη διαχείριση των διαταραχών του παχέος εντέρου, όπως για παράδειγμα τη θεραπεία της νόσου του Crohn, της περιφερικής ελκώδους κολίτιδας και της πρωκτίτιδας.

5) Ωτικά Εναιωρήματα

Τέτοιου είδους εναιωρήματα είναι υγρά σκευάσματα που περιέχουν μικρά σωματίδια και προορίζονται για ενστάλαξη στο αυτί. Τα περισσότερα από αυτά είναι αντιβιοτικά ή αναλγητικά και στοχεύουν στη θεραπεία της λοίμωξης του αυτιού, της φλεγμονής και του πόνου. Γενικά τα ωτικά εναιωρήματα παρασκευάζονται ως αποστειρωμένα αφού έρχονται σε επαφή με την επιφάνεια του βλεννογόνου.

6) Οφθαλμικά Εναιωρήματα

Πρόκειται για υγρά διαλύματα που περιέχουν διεσπαρμένα σωματίδια και προορίζονται για εφαρμογή στο μάτι. Τέτοιου είδους εναιωρήματα είναι απαραίτητο να περιέχουν το φάρμακο σε μικροσκοπικά σωματίδια ούτως ώστε να αποφευχθεί ο ερεθισμός του κερατοειδούς. Επίσης δεν πρέπει ποτέ να διανέμονται αν υπάρχουν ενδείξεις σχηματισμού συσσωματωμάτων ή συμπυκνωμάτων.

7) Πνευμονικά Εναιωρήματα - Αερολύματα

Τα αερολύματα είναι εναιωρήματα που περιέχουν σωματίδια φαρμάκου και ως μέσο διασποράς είναι ο αέρας σε αντίθεση με τα παραπάνω εναιωρήματα (υγρά εναιωρήματα). Συνήθως ως μέσα διασποράς χρησιμοποιούνται πτητικά προωθητικά και χορηγούνται για εισπνοή και παροχή του φαρμάκου στον πνεύμονα. (pharmapproach 2020)

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑΤΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΡΕΩΝ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ (ΔΙΕΣΠΑΡΜΕΝΗ ΦΑΣΗ)

Βάσει της συγκέντρωσης των στερεών σωματιδίων τα εναιωρήματα χωρίζονται σε αραιά και συμπυκνωμένα.

1) Αραιωμένο Εναιώρημα

Τα αραιωμένα εναιωρήματα περιέχουν 2-10% w/v στερεά σωματίδια. Παραδείγματα τέτοιου είδους είναι: η οξική κορτιζόνη (cortisone acetate), η οξική πρεδνιζόλη (Prednisolone acetate), κ.ά.

2) Συμπυκνωμένο Εναιώρημα

Ένα συμπυκνωμένο εναιώρημα περιέχει 10-50% w/v στερεά σωματίδια. Παράδειγμα τέτοιου τύπου αποτελεί το εναιώρημα του οξειδίου του ψευδαργύρου. (pharmapproach 2020)

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΗΛΕΚΤΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΤΩΝ ΣΤΕΡΕΩΝ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ

Βάσει της ηλεκτροκινητικής των σωματιδίων τα εναιωρήματα διακρίνονται σε κροκιδωμένα και αποκροκιδωμένα ή αποκρυσταλλωμένα.

1) Κροκιδωμένο Εναιώρημα

Πρόκειται για εναιωρήματα τα οποία γίνονται γρήγορα διαυγή, λόγω του σχηματισμού μεγάλων κροκίδων που υφίστανται γρήγορη καθίζηση. Τέτοιου είδους εναιωρήματα σχηματίζουν χαλαρά ιζήματα, τα οποία εύκολα επαναδιασπείρονται με ανάδευση. Ωστόσο σε αυτές τις περιπτώσεις που ο ρυθμός καθίζησης είναι γρήγορος υπάρχει κίνδυνος χορήγησης μη ακριβούς δόσης.

2) Αποκρυσταλλωμένο Εναιώρημα

Πρόκειται για εναιωρήματα των οποίων τα διεσπαρμένα σωματίδια παραμένουν ως διακριτές διαχωρισμένες μονάδες. Σε τέτοιου είδους εναιωρήματα ο ρυθμός καθίζησης είναι αργός (μικρά σωματίδια), κι έτσι το εναιώρημα παραμένει θολό για σημαντικό χρονικό διάστημα μετά την ανακίνησή του. (Kulshreshtha et.al, 2010)

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΜΕΓΕΘΟΣ ΤΩΝ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ

Με βάση το μέγεθος της διεσπαρμένης φάσης (διάμετρος σωματιδίων) έχουμε τις εξής κατηγορίες:

- 1) Χονδρό εναιώρημα με διάμετρο σωματιδίων μεγαλύτερη από 1 μm
- 2) Κολλοειδής διασπορά με διάμετρο σωματιδίων μικρότερη από 1 μm
- 3) Νανοαίωρημα με διάμετρο σωματιδίων από 10 έως 100 nm.

1.3 ΕΚΔΟΧΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΕ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑΤΑ

- **Διαλύτες:**

Διαλύτες ή μέσα διασποράς είναι κύρια συστατικά που χρησιμοποιούνται ως βάση στην οποία διαλύονται-διασπείρονται τα φάρμακα και άλλα έκδοχα. Ο διαλύτης που χρησιμοποιείται συνήθως ως μέσο διασποράς σε εναιώρημα είναι το καθαρό νερό. Σε κάποιες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται ιζώδεις ή με υδατικούς διαλύτες, όπως η προπυλενογλυκόλη και οι πολυαιθυλενογλυκόλες. Η επιλογή της ουσίας που θα χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης εξαρτάται από τη φύση και τις φυσικοχημικές ιδιότητες της δραστικής φαρμακευτικής ουσίας (API) και την προβλεπόμενη χρήση του σκευάσματος. (Kulshreshtha et. al, 2010)

- **Ρυθμιστικοί Παράγοντες:**

Οι ρυθμιστικοί παράγοντες ή αλλιώς τροποποιητές του pH είναι ουσίες που προστίθενται στα εναιωρήματα για να ελέγξουν πιθανές αλλαγές του pH. Συνήθως ως ρυθμιστικά διαλύματα χρησιμοποιούνται τα κιτρικά και τα φωσφορικά άλατα. Τα φωσφορικά ρυθμιστικά διαλύματα χρησιμοποιούνται για τη σταθεροποίηση εναιωρημάτων στην περιοχή pH 7-8, ενώ αντίθετα τα κιτρικά χρησιμοποιούνται για τη σταθεροποίηση στην περιοχή 3-5 pH.

- **Συντηρητικά:**

Συνήθως προστίθενται σε υδατικά εναιωρήματα, για την προστασία τους από μικροβιακές μολύνσεις. Τα πιο συνηθισμένα συντηρητικά που χρησιμοποιούνται είναι τα Parabens, η αλκοόλη, η γλυκερίνη, η προπυλενογλυκόλη και τα σορβικά.

- **Διαβρεκτικοί Παράγοντες - Επιφανειοδραστικές Ουσίες:**

Πρόκειται για έκδοχα που χρησιμοποιούνται για τη βελτίωση της ροής του υγρού διαλύματος στην επιφάνεια των σωματιδίων, με σκοπό να βελτιωθεί η ομοιόμορφη κατανομή των σωματιδίων σε όλο τον όγκο του διαλύματος. Παραδείγματα αποτελούν τα πολυσορβικά, οι εστέρες σορβιτάνης κ.ά. (Kulshreshtha et. al, 2010)

- **Αντιοξειδοτικά:**

Προστίθενται στα φαρμακευτικά εναιωρήματα ώστε να εξασφαλισθεί και να ενισχυθεί η χημική σταθερότητα του θεραπευτικού παράγοντα, που μπορεί να επηρεαστεί από την οξείδωση. Τέτοιες ουσίες μπορεί να είναι η θειουρία, το βουτυλιωμένο υδροξυτουόλιο (BHT), οι τοκοφερόλες, το ασκορβικό οξύ κ.ά.

- **Τροποποιητές Κροκίδωσης:**

Οι τροποποιητές κροκίδωσης είναι ουδέτεροι ηλεκτρολύτες, οι οποίοι αποτρέπουν τη συσσωμάτωση των αιωρούμενων σωματιδίων. Κάποια από αυτά τα έκδοχα είναι το χλωριούχο νάτριο ή κάλιο, το χλωριούχο αργίλιο, τα άλατα ασβεστίου, τα κιτρικά κ.ά. Συνήθως χρησιμοποιούνται σε συγκεντρώσεις 0,01-1%.

- **Παράγοντες Εναιώρησης - Τροποποιητές Ιξώδους:**

Πρόκειται για υδρόφιλα κολλοειδή, τα οποία προστίθενται στο φαρμακευτικό εναιώρημα με σκοπό να αυξηθεί το ιξώδες, να ανασταλεί η συσσωμάτωση και η καθίζηση των σωματιδίων. Τέτοιοι παράγοντες μπορεί να είναι παράγωγα κυτταρίνης, ή κόμμη ξανθάνης.

- **Αρωματικοί Παράγοντες:**

Προστίθενται στα φαρμακευτικά εναιωρήματα γεύσεις όπως μέντα ή έλαια λεμονιού κ.ά., για την κάλυψη της δυσάρεστης γεύσης του φαρμάκου.

- **Γλυκαντικά:**

Προστίθενται και αυτά για να μειώσουν τη δυσάρεστη γεύση του μερικώς διαλυμένου φαρμάκου. Παραδείγματα τέτοιων ουσιών αποτελούν η σορβιτόλη, η σακχαρόζη, η σακχαρίνη και η ασπαρτάμη.

- **Χρωστικές Ουσίες:**

Πρόκειται για ουσίες που προστίθενται για να βελτιώσουν την αισθητική και την εμφάνιση του εναιωρήματος. Η επιλογή της χρωστικής συνδέεται συνήθως με τη γεύση του εναιωρήματος αλλά και με την ηλικιακή ομάδα στην οποία

απευθύνονται. Για παράδειγμα η κόκκινη χρωστική ουσία χρησιμοποιείται σε φαρμακευτικά εναιωρήματα με άρωμα φράουλας, που πρόκειται για παιδιατρικά σκευάσματα.

- **Υγροποιητικά**

Στόχος αυτών είναι να επιβραδύνουν την εξάτμιση του υγρού διαλύματος κατά την αποθήκευση και χρήση. Τέτοιες ουσίες μπορεί να είναι η γλυκερίνη η προπυλενογλυκόλη κ.ά.

- **Χηλικοί Παράγοντες**

Πρόκειται για έκδοχα τα οποία προστατεύουν τις φαρμακευτικές ουσίες των εναιωρημάτων από καταλύτες, οι οποίοι επιταχύνουν την οξειδωτική αντίδραση. (Kulshreshtha et. al, 2010)

1.4 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑΤΩΝ- ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ

Τα φαρμακευτικά εναιωρήματα είναι γενικά θερμοδυναμικά ασταθή συστήματα , και για το λόγο αυτό η φυσική τους σταθερότητα είναι εξίσου σημαντική με τη χημική και τη βιολογική. Οι κύριοι παράγοντες σταθερότητας σε ένα εναιώρημα είναι η κατανομή και η ομοιομορφία των στερεών σωματιδίων, το ιζώδες, η δυνατότητα επαναιώρησης, ο ρυθμός διάλυσης, το pH και το δυναμικό ζήτα. (Yusuf Ali, et. Al. 2009)

Γενικά τα φαρμακευτικά εναιωρήματα παρασκευάζονται χρησιμοποιώντας μύλο υψηλής ενέργειας για την ανάμειξη των στερεών σωματιδίων μέσα στο μέσο διασποράς (διάλυμα). Είναι απαραίτητο να χρησιμοποιείται μύλος υψηλής ενέργειας διότι συνήθως το διάλυμα είναι παχύρρευστο και πρέπει να εξασφαλισθεί η πλήρης και ομοιόμορφη κατανομή των στερεών σωματιδίων.

Επιπλέον οι ιδιότητες των στερεών σωματιδίων-πρώτων υλών είναι καθοριστικές για το αποτέλεσμα και ελέγχονται αυστηρά ώστε να διασφαλιστούν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του φαρμακευτικού εναιωρήματος. Οι ιδιότητες που πρέπει να

ελέγχονται είναι: το μέγεθος και το σχήμα των σωματιδίων, το φορτίο τους, η κατανομή του μεγέθους, η περιεκτικότητα σε υπολειμματική υγρασία, η ρευστότητα και αν υπάρχει τάση για τη δημιουργία συσσωματωμάτων. Κάθε συστατικό θα πρέπει να ελέγχεται ως προς την ομοιογένεια και τυχόν ύπαρξη συσσωματωμάτων, έτσι ώστε η ανάμειξη όλων των συστατικών να είναι ομοιόμορφη. (Yusuf Ali, et. al. 2009)

Η παρασκευή ενός φαρμακευτικού εναιωρήματος περιλαμβάνει την ανάμειξη υδατοδιαλυτών συστατικών με νερό για να σχηματιστεί ένα υδατικό διάλυμα. Στη συνέχεια προστίθενται στο διάλυμα τα στερεά συστατικά διαδοχικά και με διαδικασία ανάμειξης υψηλής διάτμησης, ώστε να σχηματιστεί το εναιώρημα.

Οι σκόνες για εναιωρήματα (PFSs) παρασκευάζονται ως ξηρές σκόνες και έχουν σχεδιαστεί για να διασπείρονται γρήγορα με ήπια ανάμειξη παρουσία νερού. Η διαδικασία παρασκευής των PFS περιλαμβάνει την ανάμειξη σκονών των συστατικών, ωστόσο η ανάμειξη συστατικών χαμηλής ποσότητας, όπως οι χρωστικές ουσίες μπορεί να είναι δύσκολη. Επίσης συστατικά που είναι υγρά σε θερμοκρασία δωματίου, όπως υγρές γεύσεις, προσροφούνται από άλλες ουσίες πριν αναμειχθούν με τον κύριο όγκο των συστατικών. (Kulshreshtha et. al, 2010)

1.5 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑΤΩΝ

- 1) Τα φαρμακευτικά εναιωρήματα είναι χρήσιμα συστήματα χορήγησης φαρμάκων που έχουν χαμηλή διαλυτότητα. Αν και τα φάρμακα χαμηλής διαλυτότητας μπορούν να διαλυτοποιηθούν και επομένως να χορηγηθούν ως διάλυμα, ο όγκος του διαλύτη που θα χρησιμοποιηθεί μπορεί να είναι μεγάλος. Επιπλέον οι συνθέσεις στις οποίες το φάρμακο έχει διαλυτοποιηθεί χρησιμοποιώντας έναν διαλύτη μπορεί να παρουσιάσουν προβλήματα καθίζησης κατά την αποθήκευση.
- 2) Τα φαρμακευτικά εναιωρήματα μπορούν να παρασκευαστούν έτσι ώστε να καλύψουν τη δυσάρεστη γεύση του φαρμάκου.

- 3) Τα φαρμακευτικά εναιωρήματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη χορήγηση φαρμάκων σε παιδιά ή ηλικιωμένους ασθενείς που δυσκολεύονται να καταπιούν στερεές δοσολογικές μορφές.
- 4) Τα φάρμακα σε εναιωρήματα παρουσιάζουν υψηλότερο ρυθμό βιοδιαθεσιμότητας από άλλες μορφές, π.χ. κάψουλες ή δισκία.
- 5) Τα φαρμακευτικά εναιωρήματα παρασκευάζονται έτσι ώστε να παρέχουν ελεγχόμενη χορήγηση δόσης φαρμάκου, όπως για παράδειγμα είναι ενδομυϊκές ενέσεις.
- 6) Η χημική σταθερότητα ορισμένων φαρμάκων, όπως είναι η προκαϊνούχος βενζυλο-πενικιλίνη, μπορεί να βελτιωθεί όταν παρασκευάζεται ως εναιώρημα.
- 7) Τα φαρμακευτικά εναιωρήματα προσφέρουν αντοχή στα φάρμακα που περιέχονται σε αυτά, έτσι ώστε να μην υποστούν αλλοιώσεις λόγω υδρόλυσης ή οξείδωσης.
- 8) Τα φαρμακευτικά εναιωρήματα μπορούν να περιέχουν υψηλότερη συγκέντρωση φαρμάκων σε σύγκριση με άλλες φαρμακολογικές μορφές. (pharmapproach 2020)

ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑΤΩΝ

- 1) Τα φαρμακευτικά εναιωρήματα είναι γενικά ασταθή συστήματα και για το λόγο αυτό απαιτείται συγκεκριμένος τρόπος παρασκευής και πολλαπλοί έλεγχοι, ώστε να διασφαλιστεί ότι η φυσική σταθερότητα του σκευάσματος διατηρείται με τον χρόνο.
- 2) Τα φαρμακευτικά εναιωρήματα μπορεί να στερούνται της ακρίβειας δοσολογίας σε σχέση με άλλα φάρμακα, εκτός κι αν το αιώρημα είναι συσκευασμένο σε μορφή μίας δόσης.
- 3) Το εναιώρημα πρέπει να ανακινείται πριν από τη μέτρηση και τη χορήγηση της δόσης.
- 4) Πιθανόν να υπάρχουν προβλήματα στην έγχυση και στη χρήση σύριγγας για ενέσιμα εναιωρήματα.

- 5) Υπάρχει η πιθανότητα σχηματισμού κρυστάλλων (Ostwald ripening, ωρίμανση κατά Ostwald), με αποτέλεσμα την καταστροφή του εναιωρήματος. (pharmapproach 2020)

1.6 ΤΑΧΥΤΗΤΑ ΚΑΘΙΖΗΣΗΣ – ΕΙΣΩΣΗ STOKES

Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα φαρμακευτικά εναιωρήματα θα πρέπει να αναμειγνύονται πριν από τη χορήγησή τους. Ένας σημαντικός παράγοντας που θα πρέπει να ελέγχεται κατά την παρασκευή εναιωρημάτων είναι η ταχύτητα καθίζησης των σωματιδίων. Η ταχύτητα αυτή δίνεται από την εξίσωση του Stokes:

$$u = \frac{d^2(p_1 - p_2)}{18\eta} g$$

Όπου u η ταχύτητα καθίζησης, d η διάμετρος των σωματιδίων, g η επιτάχυνση της βαρύτητας, η το ιξώδες, p_1 η πυκνότητα των σωματιδίων και p_2 η πυκνότητα του υγρού. (Hui Wang et. al, 2018)

Συνεπώς αν κατά την παρασκευή ενός φαρμακευτικού εναιωρήματος παρατηρηθεί αυξημένη ταχύτητα καθίζησης μπορεί να μειωθεί είτε μειώνοντας τη διάμετρο των σωματιδίων είτε αυξάνοντας το ιξώδες του υγρού. Η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων μπορεί να γίνει είτε με λειοτρίβηση είτε μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται «ξήρανση κατά τον ψεκασμό». Η διαδικασία αυτή είναι μία τεχνική που στοχεύει στην παρασκευή πολύ μικρότερων σωματιδίων από αυτά που προκύπτουν με λειοτρίβηση. Διάλυμα φαρμάκου ψεκάζεται και ταυτόχρονα τα σωματίδια ξηραίνονται από ρεύμα αέρα με αποτέλεσμα τον σχηματισμό πολύ μικρών σωματιδίων. Σε τέτοιες περιπτώσεις που θέλουμε να μειώσουμε το μέγεθος των σωματιδίων θα πρέπει να λάβουμε υπόψη μας το γεγονός ότι τα μικρότερα σωματίδια έχουν την τάση να συσσωματώνονται πιο εύκολα και να δημιουργούν συμπαγές στρώμα. Όσον αφορά το ιξώδες μπορούμε να το αυξήσουμε, λαμβάνοντας όμως υπόψη ότι ένα μεγάλο ιξώδες δυσκολεύει την έγχυση και τη χορήγηση του εναιωρήματος μέσω σύριγγας. (Hui Wang et. al, 2018), (Skoog et.al. 2007)

ΕΝΟΤΗΤΑ 2

2.1 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ RAMAN

Τις τελευταίες δεκαετίες οι τεχνικές βελτιώσεις που έχουν σημειωθεί στα όργανα φασματομετρίας Raman έχουν καταστήσει δυνατή την αποτελεσματική εφαρμογή της μεθόδου αυτής σε μία ποιοτική και ποσοτική ανάλυση πολύπλοκων συστημάτων, όπως είναι τα φαρμακευτικά εναιωρήματα. Επιπλέον η φασματομετρία Raman είναι μία γρήγορη και μη καταστρεπτική μέθοδο, η οποία απαιτεί ελάχιστη έως καθόλου προετοιμασία δείγματος.

Το φαινόμενο Raman μελετήθηκε για πρώτη φορά το 1928 από τον Ιρλανδό φυσικό Raman. Πιο συγκεκριμένα ο Raman ανακάλυψε ότι το μήκος κύματος ενός μικρού κλάσματος της ορατής ακτινοβολίας, που σκεδάζεται από ορισμένα μόρια, διαφέρει από αυτό της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και επιπλέον οι μετατοπίσεις του μήκους κύματος εξαρτώνται από τη χημική δομή των μορίων που προκαλούν τη σκέδαση. Το 1931 ο Raman βραβεύτηκε με το Νόμπελ Φυσικής για την ανακάλυψη και τη συνεχή του έρευνα σε αυτό το φαινόμενο. Τα πλεονεκτήματα της φασματομετρίας Raman έναντι άλλων τεχνικών είναι πολλά με πιο σημαντικό το γεγονός ότι τα φάσματα μπορούν να ληφθούν σε υδατικά διαλύματα, διότι το νερό δεν προκαλεί παρεμποδίσεις, όπως συμβαίνει στα φάσματα υπερύθρου.

Ωστόσο η φασματοσκοπία Raman απέκτησε μεγάλη αποδοχή και άρχισε να χρησιμοποιείται ευρέως από χημικούς για τις μελέτες δομής των μορίων, από τη δεκαετία του 1960 και μετά που έγιναν διαθέσιμα τα λέιζερ, τα οποία βοήθησαν πολύ στη λήψη των φασμάτων Raman. (Karen A. Esmonde – White, et.al. 2016)

2.2 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ RAMAN

- 1) Μη καταστρεπτική μέθοδος για το δείγμα, και η προετοιμασία του δείγματος είναι πολύ απλή.
- 2) Οι ποσότητες του δείγματος που απαιτούνται για τη λήψη του φάσματος είναι μικρές, της τάξης των μικρογραμμαρίων ή ακόμα και νανογραμμαρίων.

- 3) Οι δονήσεις που προκαλούνται στα μόρια από τη φασματοσκοπία Raman είναι χαρακτηριστική ιδιότητα κάθε μορίου, κι έτσι τα αποτελέσματα που προκύπτουν δεν απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση.
- 4) Ο αριθμός των δονήσεων μπορεί να υπολογιστούν εύκολα από τον αριθμό N των ατόμων, μέσω του τύπου $3N-6$.
- 5) Οι ζώνες που προκύπτουν σε ένα φάσμα Raman είναι στενότερες σε σχέση με άλλες τεχνικές (π.χ. φάσματα IR). Με περαιτέρω ανάλυση στις ζώνες αυτές μπορούμε να έχουμε λεπτομερείς πληροφορίες όσον αφορά τη χημική σύνθεση και τη δομή των δειγμάτων. (Seon Chan Park , et.al. 2007)

2.3 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΕΙΡΑΜΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΑΞΗ

1) Πηγή Μονοχρωματικής Ακτινοβολίας

Πριν την ανάπτυξη των λέιζερ η πηγή ακτινοβολίας ήταν λαμπτήρες υψηλής ισχύος, συνήθως υδραργύρου. Από τη δεκαετία του 1960 και μετά οι πηγές που χρησιμοποιούνται είναι σχεδόν πάντοτε λέιζερ. Για να παρατηρηθεί η σκέδαση Raman με ένταση αρκετή έτσι ώστε να μπορεί να μετρηθεί με ικανοποιητικό λόγο σήματος προς θόρυβο, απαιτείται μεγάλη ένταση ακτινοβολίας. Συνήθως χρησιμοποιούνται λέιζερ ιόντων αργού ή κρυπτού με μήκη κύματος 488 ή 514nm και 530 ή 647nm αντίστοιχα, που εκπέμπουν στην κυανή και στην πράσινη περιοχή του φάσματος. Ωστόσο το μειονέκτημα αυτών των πηγών με μικρό μήκος κύματος είναι ότι μπορεί να παράγουν σημαντικό φθορισμό και να προκαλέσουν φωτοδιάσπαση του δείγματος. (Skoog, et.al. 2007)

2) Φασματόμετρο Raman

Στα σύγχρονα πειράματα Raman το σήμα της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας Raman είναι αρκετά πιο ασθενές από το σήμα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Έτσι λοιπόν το φασματόμετρο πρέπει να έχει υψηλή διακριτική ισχύ, ώστε να μπορεί να διαχωρίσει τις δύο ακτινοβολίες. Η υψηλή διακριτική ισχύς στα φασματόμετρα Raman επιτυγχάνεται με φράγματα περίθλασης. Ένα άλλο πρόβλημα που μπορεί να παρατηρηθεί είναι η παρασιτική σκεδαζόμενη ακτινοβολία (σκέδαση Rayleigh). Για την αντιμετώπιση αυτού του φαινομένου χρησιμοποιούνται φίλτρα αποκοπής. (Skoog, et.al. 2007)

3) Ανιχνευτής

Τα περισσότερα σύγχρονα φασματόμετρα Raman βασίζονται είτε σε ανιχνευτές σύζευξης φορτίου (CCD), είτε σε φωτοπολλαπλασιαστικούς σωλήνες απεικόνισης. Οι ανιχνευτές CCD δεν έχουν καμία διαφορά από τις σύγχρονες κάμερες και η ευαισθησία τους μπορεί να ενισχυθεί, μέσω ενισχυτικού σωλήνα κατά έναν παράγοντα μέχρι και 10^7 . (Skoog, et.al. 2007)

4) Συσκευές Επιλογής Μήκους Κύματος και Μεταλλάκτες

Για την επιλογή μήκους κύματος απαιτούνται συσκευές υψηλής ποιότητας, προκειμένου να διαχωρίσουν το ασθενές σήμα της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας Raman από την σκεδαζόμενη ακτινοβολία Rayleigh. Για το σκοπό αυτό τα σύγχρονα φασματόμετρα Raman χρησιμοποιούν μονοχρωμάτορες με δύο ή και τρία οπτικά φράγματα. Ωστόσο τα τελευταία χρόνια τα ολογραφικά φίλτρα συμβολής (φίλτρα εγκοπής) και τα ολογραφικά φράγματα έχουν αντικαταστήσει την ανάγκη χρήσης μονοχρωματόρων πολλαπλών φραγμάτων. Παρόλα αυτά επειδή τα σήματα που μετρώνται είναι ασθενή τα όργανα με μονοχρωμάτορες χρησιμοποιούν φωτοπολλαπλασιαστές για την ενίσχυση του σήματος. Τα περισσότερα σύγχρονα όργανα Raman έχουν αντικαταστήσει τον μονοχρωμάτορα απλού μήκους κύματος με φασματογράφο και συστοιχία ανιχνευτών. Η συστοιχία φωτοδιόδων είναι ο πιο κοινός χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής σε όργανα τέτοιου τύπου, διότι επιτρέπει την άμεση συλλογή του φάσματος. (Skoog, et.al. 2007)

2.4 ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλαπλές μελέτες για τη χρησιμότητα της φασματοσκοπίας Raman στην ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των δραστικών ουσιών σε φαρμακευτικά εναιωρήματα. Μία από αυτές είναι η εργασία που δημοσιεύτηκε από τον De Beer και τους συνεργάτες του με τίτλο “Ανάπτυξη και επικύρωση μιας άμεσης και μη καταστρεπτικής ποσοτικής μεθόδου , φασματοσκοπία Raman, για τον προσδιορισμό της οξικής

μεδροξυπρογεστερόνης σε ένα φαρμακευτικό εναιώρημα”, (“Development and validation of a direct and non-destructive quantitative method for medroxyprogesterone acetate in a pharmaceutical suspension using FT-Raman spectroscopy”). στην συγκεκριμένη εργασία οι συγγραφείς συγκρίνουν τη φασματοσκοπία Raman με την προτεινόμενη μέθοδο HPLC (High Performance Liquid Chromatography) υγροχρωματογραφία υψηλής ανάλυσης. σκοπός τους ήταν να προσδιορίσουν τη δραστική φαρμακευτική ουσία (API) οξικής μεδροξυπρογεστερόνης (MPA) σε ένα υγρό φαρμακευτικό εναιώρημα χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία Raman. (DeBeer et. al., 2004)

2.4.1 Πειραματική Διαδικασία

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της μεδροξυπρογεστερόνης σε εναιώρημα ήταν:

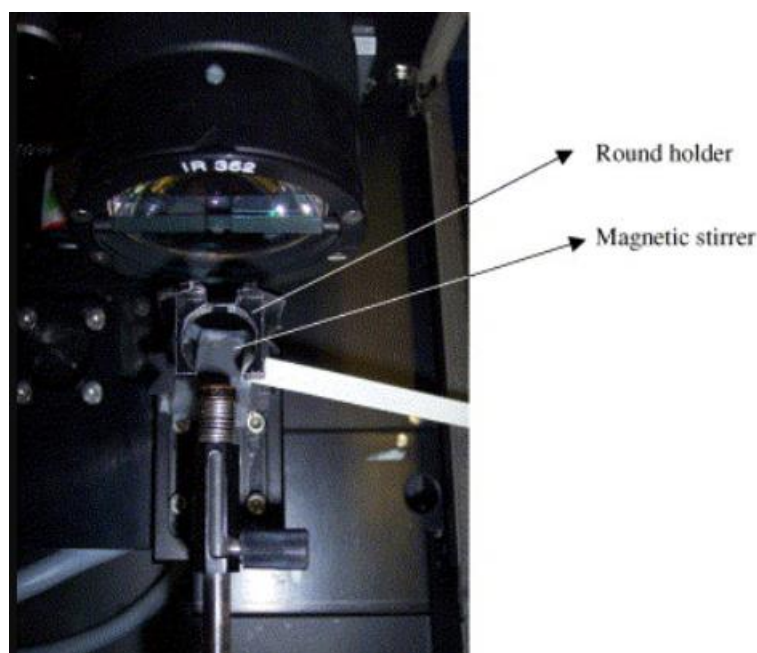
- (α) οξική μεδροξυπρογεστερόνη
- (β) μεθυλοπαραμπέν και πολυπαραμπέν
- (γ) πολυαιθυλενογλυκόλη 4000
- (δ) πολυσορβικό 80
- (ε) χλωριούχο νάτριο
- (στ) Εμπορικά εναιωρήματα MPA (DepoProvera 150mg σε 1ml)

Η περιεκτικότητα MPA προσδιορίστηκε σε 6 εμπορικά εναιωρήματα, αρχικά με φασματοσκοπία Raman και έπειτα με υγροχρωματογραφία υψηλής ανάλυσης. Επιπλέον παρασκευάστηκαν πρότυπα ώστε να κατασκευαστεί η καμπύλη βαθμονόμησης. Τα πρότυπα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη του μοντέλου βαθμονόμησης ήταν τα ίδια και για την φασματοσκοπία Raman και για την HPLC. Συγκεκριμένα παρασκευάστηκαν 5 πρότυπα με διαφορετικές συγκεντρώσεις MPA που κυμαίνονταν από 100 έως 200 mg/ml με αυξήσεις 25mg/ml το καθένα. Σε γυάλινα φιαλίδια προστέθηκαν ποσότητες MPA και στη συνέχεια προστέθηκε διάλυμα μέχρι 1ml. Το πρόσθετο αυτό διάλυμα περιείχε 28,9mg μακρογόλης 4000, 2,41mg πολυσορβικό 80, 68mg χλωριούχο νάτριο, 1,37mg μεθυλοπαραμπέν και 0,15mg προπυλοπαραμπέν. Κατά τη

φασματοσκοπία Raman οι μετρήσεις και των προτύπων αλλά και των εμπορικών εναιωρημάτων θα έπρεπε να πραγματοποιηθούν κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Για το λόγο αυτό τα εμπορικά εναιωρήματα μεταφέρθηκαν και αυτά σε γυάλινα φιαλίδια μέτρησης. (De Beer et. al. 2004)

2.4.2 Φασματοσκοπικές Συνθήκες

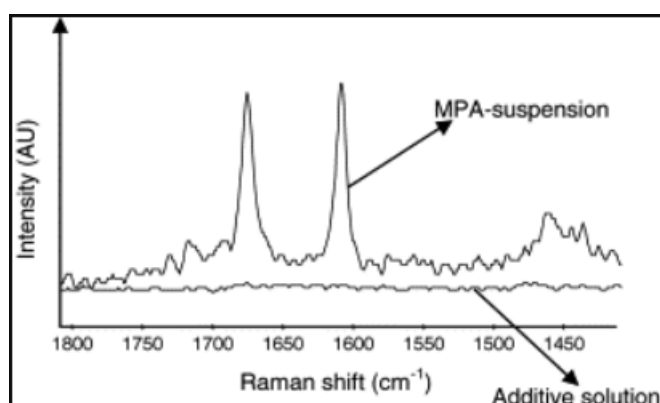
Για τις απαιτήσεις του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν: ένα φασματόμετρο Bruker FTEquinox 555 εξοπλισμένο με τη μονάδα Raman FRA 106, και ένας ανιχνευτής γερμανίου υψηλής ευαισθησίας. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε λέιζερ με ισχύ 1000mW και το μήκος κύματος κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ήταν 1,064μm. Επιπλέον όλα τα φιαλίδια, τα πρότυπα καθώς και τα δείγματα, τοποθετήθηκαν σε μία θήκη ώστε να διασφαλισθεί ότι κάθε εναιώρημα μετρήθηκε στην ίδια θέση (Εικόνα 1). Τα φάσματα που καταγράφηκαν ήταν αποτέλεσμα 1000 μετρήσεων (σαρώσεις). Ωστόσο ο χρόνος που αντιστοιχεί σ' αυτόν τον αριθμό μετρήσεων είναι περίπου 24 λεπτά, ενώ ο χρόνος που το εναιώρημα παραμένει ομοιογενές μετά την ανακίνησή του είναι περίπου 45 δευτερόλεπτα. Για το λόγο αυτό εισήχθη ένας μικρός μαγνήτης στα εναιωρήματα και αναδεύτηκαν από έναν μικρό μαγνητικό αναδευτήρα που ήταν ενσωματωμένος στο φασματόμετρο Raman ακριβώς κάτω από τη θέση του φιαλιδίου όπως φαίνεται στην Εικόνα 1. Έτσι κατά τη διάρκεια των μετρήσεων τα εναιωρήματα παρέμειναν ομοιογενή, καθώς χρησιμοποιήθηκε η μέγιστη ταχύτητα ανάδευσης 1000rpm. Ωστόσο το πρότυπο με συγκέντρωση 200mg/ml δεν ήταν εφικτό να παραμείνει ομοιογενές με αυτήν την ταχύτητα ανάδευσης, και για το λόγο αυτό αποκλείστηκε από τη βαθμονόμηση. (De Beer et.al. 2004)



Εικόνα 1. Θάλαμος δειγμάτων φασματομέτρου Raman

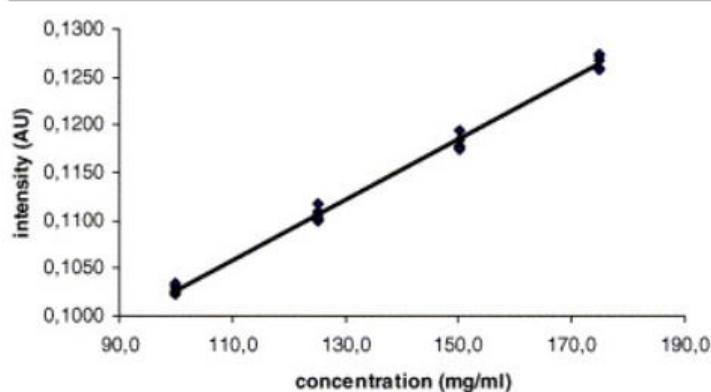
2.4.3 Αποτελέσματα και επικύρωση της φασματοσκοπίας Raman

Τα φάσματα Raman των εναιωρημάτων φαίνονται στην Εικόνα 2. Επίσης φαίνεται και το φάσμα ενός πρόσθετου διαλύματος, το οποίο πρόκειται για ένα εναιώρημα χωρίς τη δραστική ουσία MPA. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι αφού το πρόσθετο διάλυμα δεν έδειξε σήμα στο φασματικό εύρος ενδιαφέροντος $1700\text{-}1550\text{cm}^{-1}$, το σήμα στην περιοχή αυτή προέρχεται από τη δραστική ουσία MPA. Η υψηλότερη κορυφή έντασης μεταξύ 1630 και 1590cm^{-1} ήταν το σήμα που επιλέχθηκε για την ανάπτυξη του μοντέλου βαθμονόμησης και για την ποσοτική ανάλυση των εναιωρημάτων.



Εικόνα 2. Φάσματα Raman των εναιωρημάτων και του πρόσθετου διαλύματος

Επιπλέον έγινε και μία γραφική παράσταση των μετρούμενων σημάτων των προτύπων (Εικόνα 3), όπου και βρέθηκε η εξίσωση της ευθείας και ελέγχθηκαν όλες οι παράμετροι της καμπύλης βαθμονόμησης. Η ακρίβεια των αναλύσεων Raman επικυρώθηκε με διασταύρωση της πραγματικής και της τιμής που υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τις καμπύλες βαθμονόμησης. (De Beer et.al. 2004)



Εικόνα 3. Καμπύλη βαθμονόμησης προτύπων

Οι πραγματικές και οι τιμές που υπολογίστηκαν φαίνονται στον Πίνακα 1. Οι υπολογισμοί της περιεκτικότητας MPA στα εμπορικά διαλύματα έγιναν με τον ίδιο τρόπο όπως και στα πρότυπα και φαίνονται στον Πίνακα 2. Στους δύο πίνακες που φαίνονται παρακάτω γίνεται σαφές ότι σε διάστημα εμπιστοσύνης

95% οι τιμές τόσο των προτύπων όσο και των εμπορικών εναιωρημάτων είναι εντός των επιτρεπτών ορίων. Επομένως η φασματοσκοπία Raman είναι μία αξιόπιστη μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό ουσιών σε υγρά εναιωρήματα. (De Beer et.al. 2004)

Πραγματικό (mg/ml)	Raman	
	Υπολογισμένο (mg/ml)	Όρια εμπιστοσύνης 95% (mg/ml)
124,9	126,5	[124.4; 128,6]
150,0	148,7	[146.6; 150,8]
175,2	176,6	[174.2; 179,1]

Πίνακας 1

Εμπορικό δείγμα	Raman	
	Μέση τιμή (mg/ml) (n = 6)	Όρια εμπιστοσύνης 95% (mg/ml)
1	150,0	[147,9; 152,1]
2	150,8	[148.7; 152,9]
3	148,8	[146.7; 150,9]
4	151,4	[149.3; 153,5]
5	149,6	[147,5; 151,7]
6	149,5	[147.4; 151,6]

Πίνακας 2

ΕΝΟΤΗΤΑ 3

3.1 Περίθλαση Ακτίνων Χ (XRD-XRPD) - Εισαγωγή - Βασικές αρχές

Η περίθλαση ακτίνων Χ είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος στη φαρμακοβιομηχανία. Πρόκειται για μία μέθοδο η οποία εφαρμόζεται εκτενώς για τον προσδιορισμό του πολυμορφισμού ενός φαρμάκου. Τα στερεά ενεργά συστατικά APIs μπορεί να υπάρχουν σε διάφορες κρυσταλλικές μορφές με διαφορετικές φυσικές ιδιότητες, ενώ οι χημικές ιδιότητες να είναι πανομοιότυπες. Οι πολλαπλές κρυσταλλικές μορφές είναι γνωστές ως πολύμορφες και το φαινόμενο αυτό ονομάζεται πολυμορφισμός. Το φαινόμενο του πολυμορφισμού είναι υψίστης σημασίας στην φαρμακευτική βιομηχανία και μελετάται λεπτομερώς, διότι η μετάβαση φάσης ενός API θα μπορούσε να οδηγήσει σε ανεπιθύμητες ιδιότητες που θα επηρεάσουν τη σταθερότητα του τελικού προϊόντος, τις ιδιότητες διάλυσης ακόμα και τη βιοδιαθεσιμότητα του API, δημιουργώντας έτσι διαφορετική φαρμακολογικά δράση. Ως εκ τούτου η αναγνώριση του πολυμορφισμού στο τελικό προϊόν θεωρείται απαραίτητη για την ανάπτυξη του φαρμάκου. Τα φαρμακευτικά εναιωρήματα όπως έχει ήδη αναφερθεί αποτελούνται από τη στερεή δραστική ουσία API και ορισμένα έκδοχα διεσπαρμένα στο υγρό διάλυμα – μέσο εναιώρησης. Λόγω του υγρού μέσου εναιώρησης, το οποίο είναι συχνά νερό, τα API στα φαρμακευτικά εναιωρήματα είναι επιρρεπή σε πολυμορφισμούς και κατά συνέπεια στη φυσική αστάθεια του εναιωρήματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία κρυστάλλων και την απώλεια ικανότητας ενός εναιωρήματος να επαναιωρείται ομοιόμορφα. Για το λόγο αυτό η ταυτοποίηση του API σε ένα φαρμακευτικό εναιώρημα είναι απαραίτητη ώστε να διασφαλιστεί η σταθερότητα του φαρμακευτικού εναιωρήματος. Ωστόσο ο προσδιορισμός των πολυμορφισμών του API σε ένα εναιώρημα αποτελεί πρόκληση λόγω:

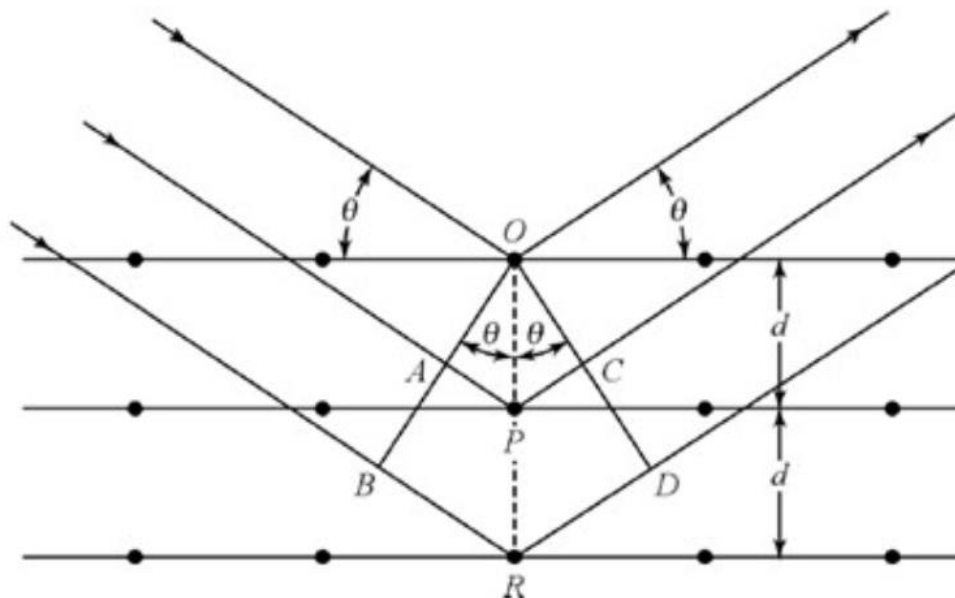
- α) της υγρής φάσης που επηρεάζει την αναλογία σήμα/θόρυβος,
- β) της χαμηλής συγκέντρωσης του API σε τέτοια σκευάσματα

γ) της έλλειψης ομοιογένειας των δειγμάτων. (Skoog, et.al. 2007)

3.2 Περίθλαση ακτίνων X – Νόμος του Bragg

Η περίθλαση των ακτίνων X είναι μία μέθοδος για την αναγνώριση και την αξιολόγηση της κρυσταλλικότητας και της δομής των δειγμάτων. Συγκεκριμένα το φαινόμενο της περίθλασης των ακτίνων X προκύπτει από τη σκέδαση ακτίνων X από τα ηλεκτρόνια των ατόμων που υπάρχουν στο δείγμα χωρίς να αλλάζει μήκος κύματος η ακτινοβολία. Δεδομένου οι ακτίνες X έχουν μήκη κύματος συγκρίσιμα με τις διατομικές αποστάσεις ενός κρυσταλλικού στερεού (0,2-10nm) η προσπίπτουσα ακτινοβολία περιθλάται σε συγκεκριμένες κατευθύνσεις που προβλέπονται από τον νόμο του Bragg. Η σχέση που συνδέει την προσπίπτουσα με την περιθλώμενη ακτίνα δίνεται από τον νόμο του Bragg:

$n\lambda = 2d\sin\theta$, όπου n είναι ένας ακέραιος αριθμός, λ είναι το μήκος κύματος της μονοχρωματικής ακτινοβολίας , θ είναι η γωνία πρόσπτωσης και d η απόσταση μεταξύ των επιπέδων.



Εικόνα 4. Περίθλαση Ακτίνων X από έναν κρύσταλλο

Όταν η δέσμη των ακτίνων X προσπίπτει στην επιφάνεια ενός κρυστάλλου με κάποια γωνία θ , τότε ένα τμήμα της σκεδάζεται από το επιφανειακό στρώμα των ατόμων και το μη σκεδαζόμενο τμήμα της εισέρχεται στο δεύτερο στρώμα. Εκεί και πάλι σκεδάζεται ένα τμήμα της ακτινοβολίας και το υπόλοιπο εισέρχεται στο τρίτο στρώμα των ατόμων (Εικόνα 4). Το αθροιστικό αποτέλεσμα της σκέδασης αυτής από τα τακτικά χωροθετημένα κέντρα του κρυστάλλου είναι η περίθλαση της δέσμης. Το αποτέλεσμα που προκύπτει από την περίθλαση των ακτίνων X είναι μία θεμελιώδης φυσική ιδιότητα του δείγματος και μάζ παρέχει πληροφορίες για την κρυσταλλική του δομή κι έτσι μπορούμε να το ταυτοποιήσουμε. (Skoog, et.al. 2007)

3.3 Οργανολογία – Πειραματική Διάταξη

Μία τυπική πειραματική διάταξη φασματοσκοπίας XRPD αποτελείται από:

1) Πηγή Ακτινοβολίας: Πρόκειται για μία λυχνία ακτίνων X η οποία αποτελείται από μία κάθοδο, κατασκευασμένη συνήθως από νήμα βολφραμίου, και από μία άνοδο που είναι κατασκευασμένη από καθαρό μέταλλο. Κατά τη θέρμανση της καθόδου τα ηλεκτρόνια επιταχύνονται και προσκρούουν στην άνοδο. Ένα πολύ μικρό ποσοστό (1 – 2%) μετατρέπεται σε ακτίνες X. (Skoog, et.al. 2007)

2) Μονοχρωμάτορας

3) Ευθυγραμμιστές μονοχρωματικής ακτινοβολίας: Η ευθυγράμμιση της ακτινοβολίας πραγματοποιείται από μία σειρά λεπτών πλακιδίων από μολυβδένιο. Όσο μικρότερη είναι η απόσταση των μεταλλικών πλακιδίων τόσο καλύτερη ευθυγράμμιση θα έχουμε. Επιπλέον με τους ευθυγραμμιστές έχουμε αποφυγή φασματικών παρεμβολών αλλά ταυτόχρονα και μείωση της έντασης της ακτινοβολίας.

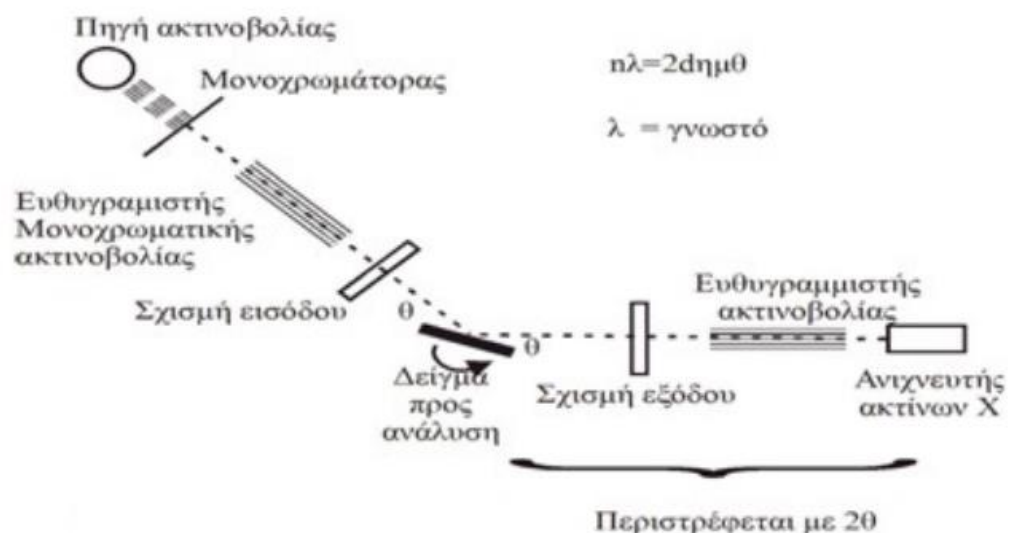
4) Δειγματοφορέας: όπου τοποθετείται το δείγμα για ανάλυση

5) Ανιχνευτής ακτίνων X:

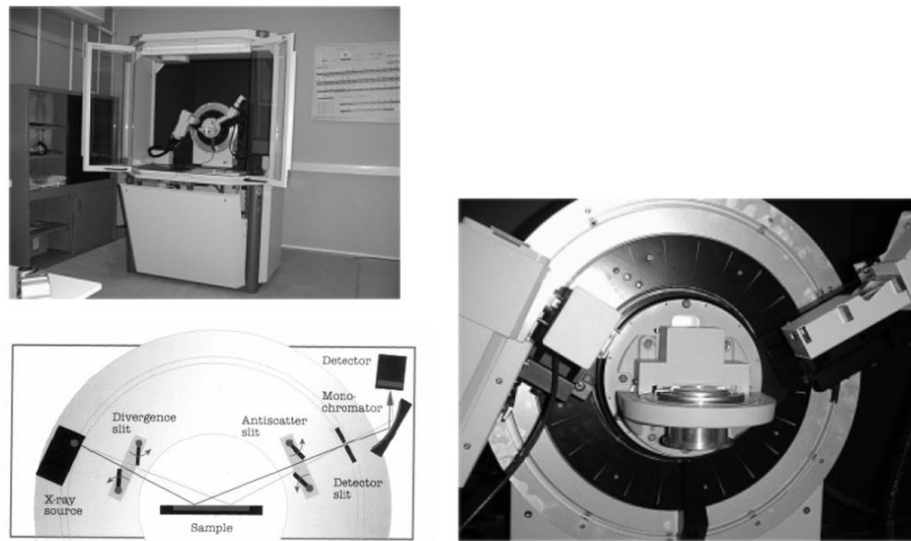
- Αναλογικοί Απαριθμητές – Θάλαμοι Ιονισμού – Geiger Muller:

Αποτελούνται από γυάλινο περίβλημα με εσωτερική επικάλυψη αγωγίμου υλικού ή από σωλήνα από ανοξείδωτο χάλυβα (κάθοδος). Η άνοδος είναι κατασκευασμένη από βολφράμιο, ενώ το φέρον αέριο συνήθως είναι το αργό. Σε τέτοιου τύπου ανιχνευτές τα φωτόνια των ακτίνων X ιονίζουν το φέρον αέριο και τα ηλεκτρόνια συλλέγονται στην άνοδο προκαλώντας παλμό.

- Ανιχνευτές ημιαγωγών: Τέτοιου είδους ανιχνευτές χρησιμοποιούνται στα όργανα με διασπορά ενέργειας. Ο ανιχνευτής αποτελείται από έναν αγωγίμο κρύσταλλο από πυρίτιο (Si) ή υπερκαθαρό Γερμάνιο (Ge). Οι ακτίνες X δημιουργούν ζεύγη ηλεκτρονίων – οπών και τα ηλεκτρόνια προωθούνται στην ζώνη αγωγιμότητας. Η εφαρμογή δυναμικού προκαλεί την διέλευση ρεύματος ανάλογο της ενέργειας της ακτινοβολίας X που έπεσε πάνω στον ανιχνευτή. (Skoog, et.al. 2007)



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση περίθλασης ακτίνων X



Εικόνα 6. Πειραματική Διάταξη XRPD (http://old.uoi.gr/services/lab-net/net-web/Powder-XRD_gr.pdf)

3.4 Πλεονεκτήματα Φασματοσκοπίας Ακτίνων X

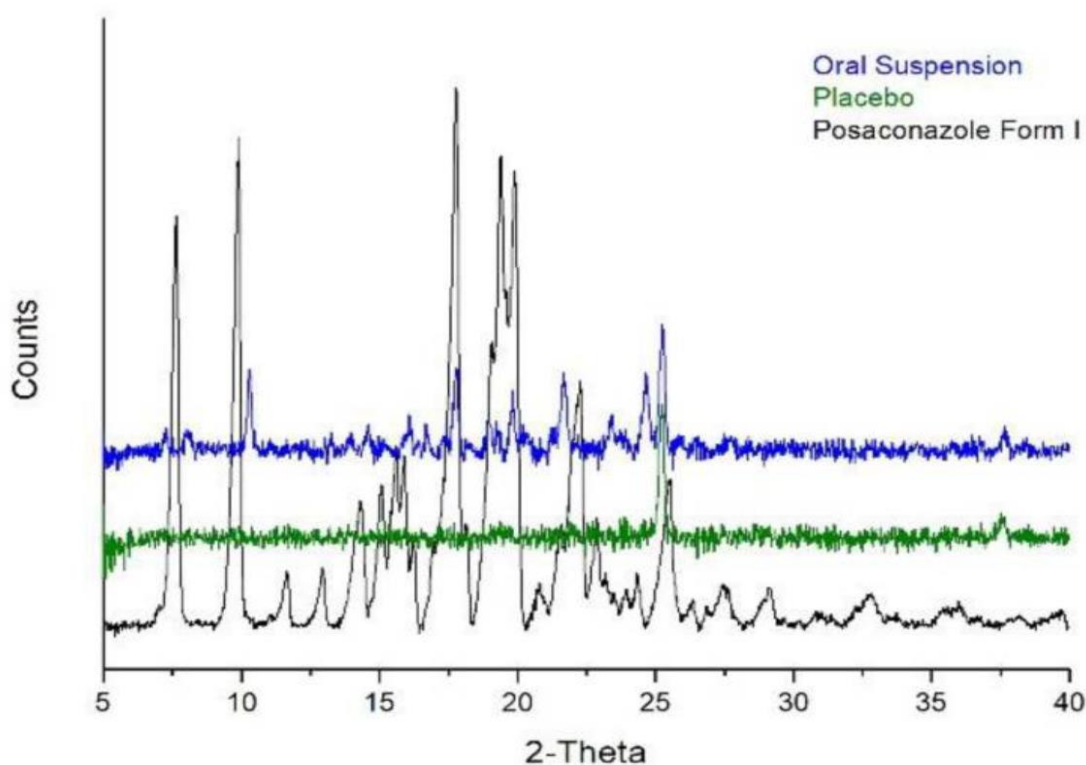
Τα πιο σημαντικά πλεονεκτήματα της φασματοσκοπίας με ακτίνες X είναι τα εξής:

- 1) Μη καταστροφική : Τα δείγματα δεν καταστρέφονται ή δεν αλλάζουν κατά την έκθεση τους σε ακτίνες X οπότε μπορούν να εξεταστούν ξανά ή ακόμα και να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπα.
- 2)Ελάχιστη Προετοιμασία δείγματος: Τα περισσότερα δείγματα αναλύονται με ελάχιστη ή καθόλου προετοιμασία σε σχέση με άλλες μεθόδους που απαιτούν διαδικασίες διαλυτοποίησης.
- 3) Γρήγορη: Η φασματοσκοπία ακτίνων X επιτρέπει τον προσδιορισμό της χημικής σύστασης της ουσίας σε μερικά δευτερόλεπτα.
- 4) Εύκολος χειρισμός: Τα περισσότερα σύγχρονα όργανα λειτουργούν με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή χρησιμοποιώντας ένα εύχρηστο λογισμικό για τη λήψη των μετρήσεων και τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων.

5) Χαμηλό κόστος: Οι αναλύσεις με ακτίνες X είναι πολύ πιο οικονομικές σε σχέση με άλλες τεχνικές. (Skoog, et.al. 2007)

3.5 Παράδειγμα

Έχουν δημοσιευτεί πολλές μελέτες για την εφαρμογή της μεθόδου της περίθλασης ακτίνων X (XRPD) στο προσδιορισμό των ενεργών συστατικών (APIs) σε φαρμακευτικά εναιωρήματα. Μία από αυτές είχε ως αντικείμενο τον προσδιορισμό της ποζαконаζόλης σε πόσιμα εναιώρημα. Στη μελέτη αυτή κατά την πειραματική διαδικασία οι ερευνητές χρησιμοποίησαν εμπορικό εναιώρημα που περιείχε ποζαконаζόλη, πρότυπο δείγμα ποζαконаζόλης Form-I και ένα ακόμη δείγμα εικονικού φαρμάκου (Placebo). Τα φάσματα που καταγράφηκαν για όλα τα δείγματα φαίνονται στην Εικόνα 7. (Michail Lykouras et.al. 2020)

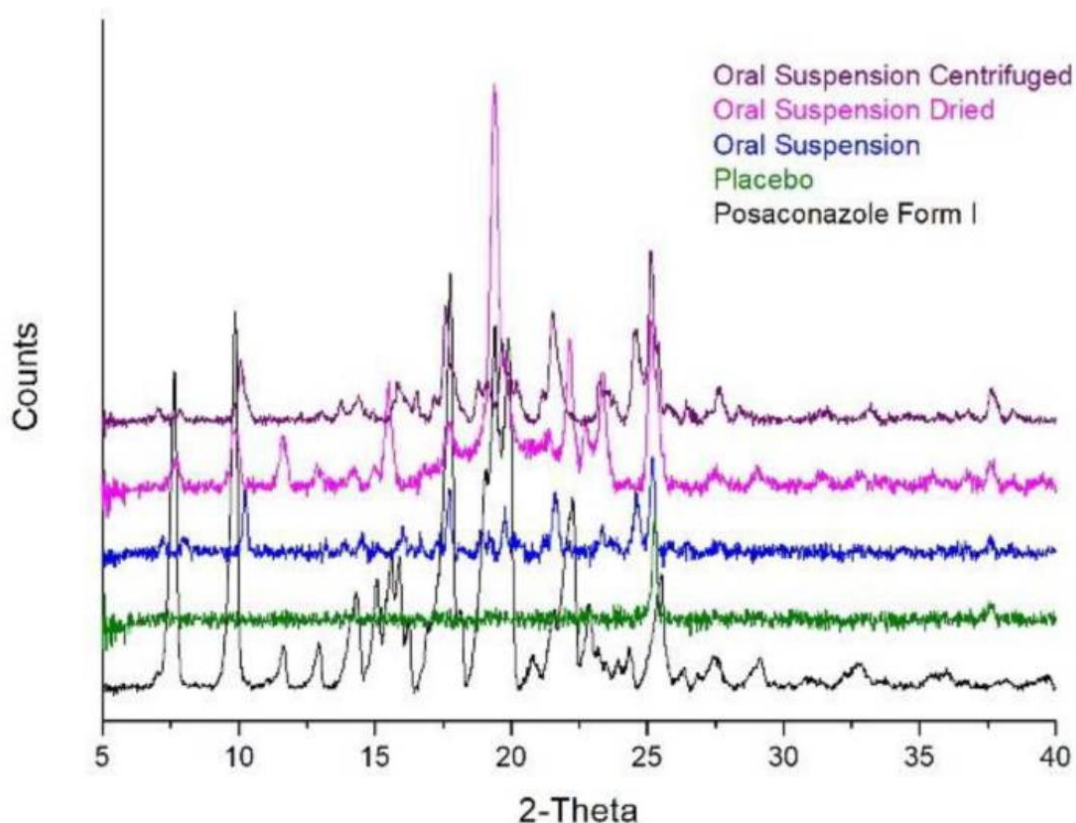


Εικόνα 7. Φάσματα XRPD για το δείγμα (Oral suspension, μπλε γραμμή), για το εικονικό φάρμακο (Placebo, πράσινη γραμμή), για την ποζαконаζόλη Form-I (Posaconazole Form-I, μαύρη γραμμή)

Όπως φαίνεται στην εικόνα 7 για το εμπορικό εναιώρημα (μπλε γραμμή) η αναλογία σήματος/θορύβου είναι αρκετά χαμηλή, λόγω της υγρής φάσης του εναιωρήματος και της χαμηλής συγκέντρωσής του σε API. Το γεγονός αυτό εμπόδισε την αναγνώριση της κρυσταλλικής δομής της ποζακοναζόλης, και δεν ήταν δυνατό να προσδιοριστεί αν το API βρέθηκε σε μία ή περισσότερες κρυσταλλικές μορφές ταυτόχρονα. Για το λόγο αυτό οι ερευνητές εφάρμοσαν τρεις διαφορετικές μεθόδους, ώστε να αυξήσουν τη συγκέντρωση της ποζακοναζόλης στο δείγμα και να έχουν καλύτερη αναλογία σήματος/θορύβου. Οι τρεις αυτές μέθοδοι ήταν η διήθηση, η ξήρανση και η φυγοκέντρωση, ούτως ώστε να απομονωθεί η ποζακοναζόλη από το μέσο εναιώρησης. (Michail Lykouras et.al. 2020)

Με τη διήθηση υπό κενό δεν κατέστη δυνατός ο διαχωρισμός της ποζακοναζόλης από το μέσο εναιώρησης, πιθανόν λόγω της παρουσίας κόμμεως ξανθάνης (xanthane gum), που χρησιμοποιείται ως παράγοντας εναιώρησης του API. Η μέθοδος ξήρανσης δοκιμάστηκε και αυτή για τον διαχωρισμό του API από την υγρή φάση του εναιωρήματος. Με την ξήρανση επιτεύχθηκε τόσο η αφαίρεση του API από το μέσο εναιώρησης όσο και η αύξηση της συγκέντρωσης της ποζακοναζόλης. Η τελική συγκέντρωση της ποζακοναζόλης ήταν περίπου 12,5% w/w., δηλαδή σχεδόν τριπλάσια από την αρχική συγκέντρωση. Ωστόσο παρατηρώντας το φάσμα στην Εικόνα 8, φαίνεται πως το φάσμα του συμπυκνωμένου δείγματος (Oral Suspension Dried) έμοιαζε πολύ με το φάσμα της ποζακοναζόλης Form-I. Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι κατά την εφαρμογή της μεθόδου της ξήρανσης δεν είναι δυνατόν να η ποζακοναζόλη να διατηρήσει την πολυμορφική της μορφή. Η τρίτη και τελευταία μέθοδος που δοκιμάστηκε για την αύξηση της συγκέντρωσης του API ήταν η φυγοκέντρωση. Το ίζημα που διαχωρίστηκε μέσω της φυγοκέντρωσης περιείχε την ποζακοναζόλη και τα αδιάλυτα έκδοχα. Η συγκέντρωση του API στο δείγμα προσδιορίστηκε περίπου 20% w/w, δηλαδή σχεδόν 5 φορές μεγαλύτερη από την αρχική συγκέντρωση του δείγματος. Το φάσμα που πήραμε από το ίζημα (Oral suspension Centrifuged) συγκρίθηκε με το φάσμα του πόσιμου εναιωρήματος και φαίνεται να έχουμε μεγάλη ομοιότητα μεταξύ αυτών των δύο και αύξηση της αναλογίας σήματος/θορύβου. Επιπλέον το φάσμα του δείγματος συγκρίθηκε με

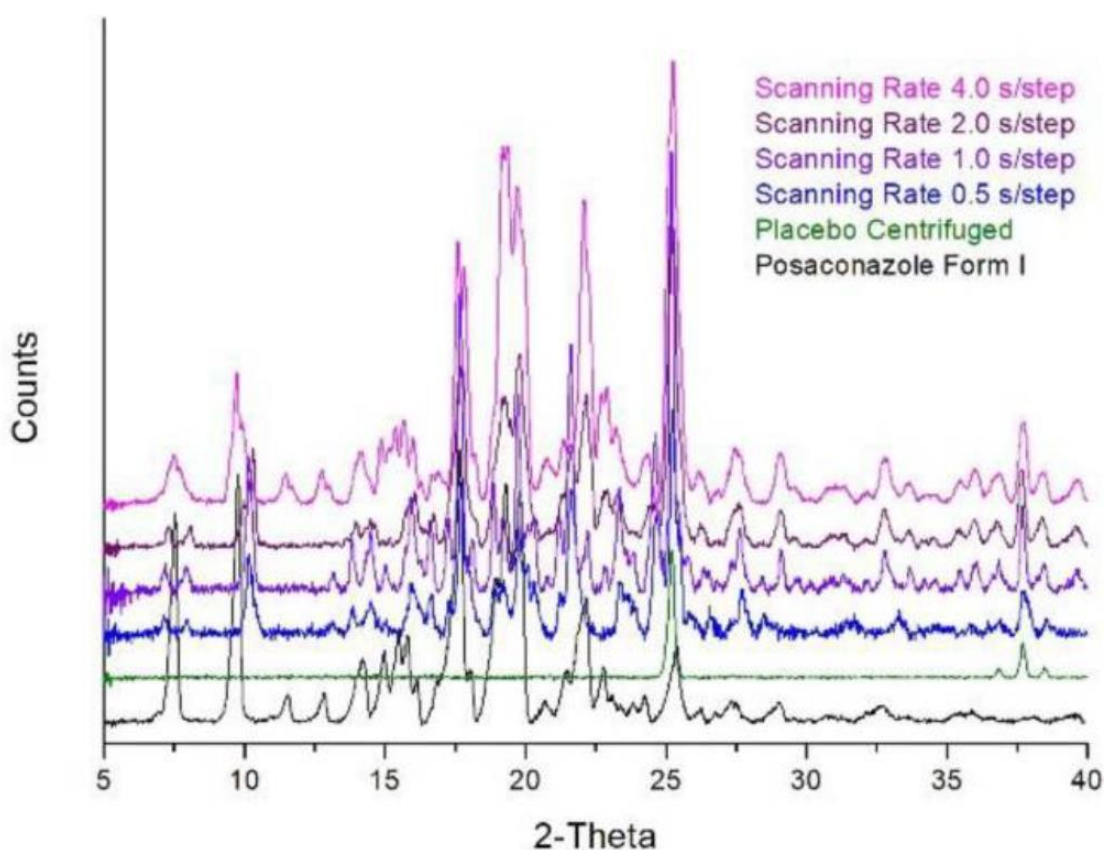
πρότυπα φάσματα XRPD όλων των μορφών ποζαконаζόλης και βρέθηκε ότι ήταν της μορφής S (Form-S). (Michail Lykouras et.al. 2020)



Εικόνα 8. Φάσματα XRPD για το ίζημα (Oral Suspension Centrifuged, μωβ γραμμή), το συμπυκνωμένο δείγμα (Oral Suspension Dried, ροζ γραμμή), το εμπορικό εναιώρημα (Oral Suspension, μπλε γραμμή), το εικονικό φάρμακο (Placebo, πράσινη γραμμή), την ποζαконаζόλη Μορφής I (Posaconazole Form-I, μαύρη γραμμή)

Επιπλέον διερευνήθηκε και η επίδραση του ρυθμού σάρωσης στην αναλογία σήματος/θορύβου. Συγκεκριμένα εφαρμόστηκαν 4 διαφορετικοί ρυθμοί σάρωσης: 0,5s/βήμα, 1s/βήμα, 2s/βήμα και 4s/βήμα, και το μέγεθος του βήματος ήταν 0,02°. Παίρνοντας το φάσμα για κάθε ρυθμό σάρωσης παρατηρήθηκε ότι όταν εφαρμόστηκε ο 2 φορές πιο αργός ρυθμός (1s/βήμα) και σάρωση και 30 λεπτά, η αναλογία σήματος/θορύβου βελτιώθηκε σημαντικά. Όταν χρησιμοποιήθηκε ρυθμός σάρωσης 8 φορές πιο αργός (4s/βήμα) και σάρωση για

120 λεπτά, οι κορυφές της ποζαконаζόλης Form-I μπορούσαν να ανιχνευθούν σε όλο το φάσμα. Ως εκ τούτου συμπεραίνουμε ότι αν και η αναλογία σήματος/θορύβου βελτιώθηκε σε πολύ αργούς ρυθμούς, η ποζαконаζόλη του δείγματος ήταν ευαίσθητη σε πολυμορφική μετατροπή σε ποζαконаζόλη Form-I (Εικόνα 9).



Εικόνα 9.Φάσματα ανά ρυθμό σάρωσης

3.6 Συμπεράσματα της έρευνας

Από την παραπάνω μελέτη συμπεραίνουμε πως η κατάλληλη επεξεργασία και προετοιμασία του δείγματος οδήγησε σε καλύτερα αποτελέσματα και στον τελικό προσδιορισμό του API στο δείγμα. Επιπλέον η σύγκριση του αρχικού φάσματος (μη επεξεργασμένο δείγμα) με τα φάσματα που καταγράφηκαν με ρυθμό 2s/βήμα και με 4s/βήμα αποκάλυψε ότι είχαμε σημαντική βελτίωση της αναλογίας

σήματος/θορύβου έπειτα από την επεξεργασία και τις εναλλαγές του ρυθμού σάρωσης. Το γεγονός αυτό οδήγησε στη βελτίωση της ποιότητας των φασμάτων και έτσι κατέστη δυνατός ο πλήρης προσδιορισμός της ποζαконаζόλης στο εμπορικό εναιώρημα (Pozaconazole Form-S). Επιπλέον η μελέτη αυτή είναι η πρώτη που αναφέρει ότι το API στα πόσιμα αυτά εναιωρήματα είναι ποζαконаζόλη Form-S.

ΕΝΟΤΗΤΑ 4

4.1 Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy FT-IR)

Εισαγωγή – Βασικές Αρχές

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου είναι και αυτή μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους, η οποία βρίσκει εφαρμογή σε πολλά επιστημονικά πεδία, όπως στην οργανική και ανόργανη Χημεία, στη Βιολογία, στην Ιατρική κ.ά. Επίσης η αναλυτική αυτή μέθοδος βρίσκει εφαρμογή, εκτός από το ερευνητικό πεδίο, σε μεγάλο πλήθος βιομηχανικών εφαρμογών όπως σε φαρμακευτικές βιομηχανίες, σε βιομηχανίες τροφίμων και πολλές ακόμα. Όσον αφορά τον τομέα της φαρμακευτικής η φασματοσκοπία υπέρυθρου εφαρμόζεται για τον χαρακτηρισμό και ταυτοποίηση των ουσιών των φαρμακευτικών σκευασμάτων αλλά και των πρώτων υλών που χρησιμοποιούνται κατά την παραγωγή τους. (Κουή Μαρία κ.ά. 2015)

Η περιοχή του υπέρυθρου του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος εκτείνεται από το τέλος του ορατού έως την περιοχή των μικροκυμάτων δηλαδή 0,7 – 300 μm . Οι τρεις υπέρυθρες περιοχές ενδιαφέροντος στην IR φασματοσκοπία είναι:

- Το εγγύς υπέρυθρο (NIR) φάσμα που βρίσκεται από 0,8 μm έως 2,5 μm και αντιστοιχεί στους κυματαριθμούς 14.000 – 4.000 cm^{-1} .
- Το μέσο υπέρυθρο (MIR) φάσμα που βρίσκεται μεταξύ 2,5 μm έως 25 μm και αντιστοιχεί σε κυματαριθμούς 4.000 – 400 cm^{-1} .
- Το άπω υπέρυθρο (FIR) μεταξύ 25 μm έως 300 μm και αντιστοιχεί στους κυματαριθμούς 400 – 10 cm^{-1} . (Κουή Μαρία κ.ά. 2015)

4.2 Τεχνικές Φασματοσκοπίας Υπερύθρου

Οι τεχνικές της υπέρυθρης φασματοσκοπίας χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες:

1) Την κλασική φασματοσκοπία, στην οποία χρησιμοποιούνται συμβατικά φασματοφωτόμετρα διασποράς (Classical Dispersive IR Spectrometers)

2) Την φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier κατά την οποία χρησιμοποιούνται φασματοφωτόμετρα υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier με συμβολόμετρο (Fourier Transform IR Spectrometers).

Όσον αφορά την πρώτη κατηγορία τα φασματοφωτόμετρα διασποράς IR αποτελούντα πρώτα όργανα που αναπτύχθηκαν στη φασματοσκοπία υπερύθρου. Μία τυπική πειραματική διάταξη αποτελείται από:

α) Μία πηγή ακτινοβολίας, η οποία εκπέμπει σε όλη την υπέρυθρη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος.

β) Έναν μονοχρωμάτορα, του οποίου το στοιχείο διασποράς, είναι είτε ένα πρίσμα είτε ένα φράγμα περίθλασης

γ) Έναν ανιχνευτή υπερύθρου

δ) Ένα οπτικό σύστημα κατόπτρων (Skoog, et.al. 2007)

4.3 Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)

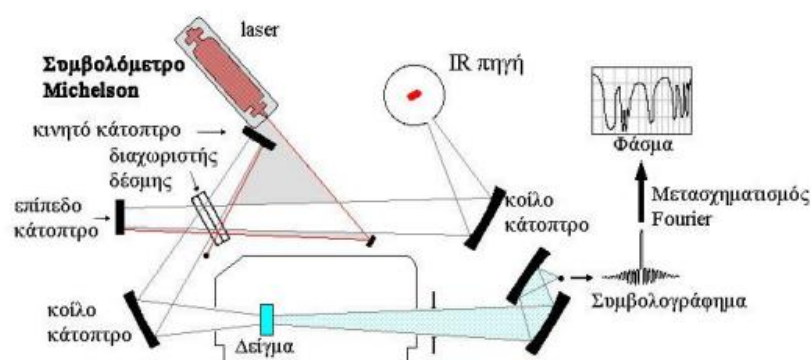
Τις τελευταίες δεκαετίες η ανάπτυξη των φασματοφωτομέτρων υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier έχει οδηγήσει στην αντικατάσταση των κλασικών φασματοφωτομέτρων διασποράς. Αν και οι πληροφορίες που παρέχουν και οι δύο αυτές τεχνικές είναι ίδιες, η υψηλή ευαισθησία και η ταχύτητα των φασματοφωτομέτρων Fourier είναι δύο από τα πιο σημαντικά πλεονεκτήματα που την κάνουν να υπερέχει έναντι στην κλασική φασματοσκοπία υπερύθρου. Ωστόσο το βασικό πλεονέκτημα των σύγχρονων αυτών οργάνων είναι έγκειται στη χρήση συμβολόμετρου αντί για μονοχρωμάτορα, το οποίο επιτρέπει να κατευθύνονται στον ανιχνευτή όλες οι συχνότητες ταυτόχρονα και όχι διαδοχικά όπως συμβαίνει στα φασματοφωτόμετρα διασποράς. Ένα τυπικό

φασματοφωτόμετρο Fourier με συμβολόμετρο Michelson φαίνεται στην Εικόνα 10 και αποτελείται από τρία βασικά μέρη:

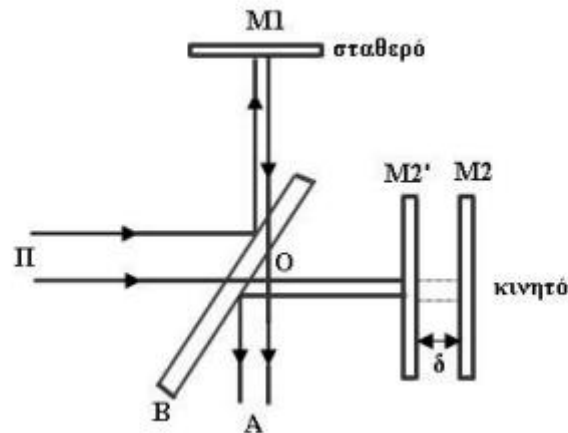
α) Πηγή Υπέρυθρης Ακτινοβολίας: Χρησιμοποιούνται πηγές ίδιου τύπου με αυτές των συμβατικών φασματοφωτομέτρων IR. (Κουή Μαρία κ.ά. 2015)

β) Συμβολόμετρο: Ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα συμβολόμετρα είναι το συμβολόμετρο Michelson, το οποίο αποτελείται από δύο κάτοπτρα, ένα που παραμένει ακίνητο και ένα που κινείται, και ανάμεσα τους βρίσκεται ένας διαχωριστής δέσμης 50/50 (beamsplitter). Ο διαχωριστής δέσμης είναι έτσι κατασκευασμένος ώστε να μην απορροφά την υπέρυθρη ακτινοβολία και επίσης η ανακλαστικότητα και η διαπερατότητα του να είναι 50% η καθεμία. Η επιλογή του υλικού του διαχωριστή δέσμης εξαρτάται από την περιοχή του φάσματος που εξετάζεται. (Κουή Μαρία κ.ά. 2015)

γ) Ανιχνευτής: Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην φασματοσκοπία με μετασχηματισμό Fourier διαφέρουν από αυτούς που χρησιμοποιούνται στην συμβατική φασματοσκοπία, ως προς τους χρόνους απόκρισης τους. Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται σε τέτοια συστήματα προσφέρουν υψηλούς χρόνους απόκρισης και μεγάλη ευαισθησία. (Κουή Μαρία κ.ά. 2015)



Εικόνα 10. Φασματοφωτόμετρο Fourier με συμβολόμετρο Michelson (Κουή Μαρία κ.ά. 2015)



Εικόνα 11. Σχηματική αναπαράσταση Συμβολόμετρου Michelson

4.4 Πλεονεκτήματα

Η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι της κλασικής φασματοσκοπίας υπερύθρου με συμβατικό φασματοφωτόμετρο. Τα σημαντικότερα από αυτά είναι η υψηλή ευαισθησία και η ταχύτητα που παρουσιάζουν καθώς και ο βελτιωμένος λόγος σήματος προς θόρυβο (SNR). Τα φασματοφωτόμετρα FTIR έχουν βασικά χαρακτηριστικά κατασκευής και λειτουργίας, τα οποία τους επιτρέπουν τη λήψη ενός πλήρους φάσματος κατά τη διάρκεια μιας μόνο σάρωσης και παράλληλα ο ανιχνευτής μπορεί να παρατηρεί όλες τις συχνότητες ταυτόχρονα. Επιπλέον είναι δυνατόν να καταγραφούν πολλά φάσματα σε πολύ μικρό χρόνο, λόγω της υψηλής ταχύτητας σάρωσης. Το γεγονός αυτό οδηγεί στη βελτίωση της ευαισθησίας και ταυτόχρονα λόγω των πολλαπλών επαναλαμβανόμενων σαρώσεων αυξάνεται σημαντικά ο λόγος σήματος προς θόρυβο. Ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό των οργάνων αυτών είναι ότι χρησιμοποιείται συνήθως κυκλικό οπτικό άνοιγμα που επιτρέπει να περνά μέσα από το δείγμα μεγάλο εμβαδόν δέσμης, το οποίο μπορεί να είναι 75 με 100 φορές μεγαλύτερο από το πλάτος της σχισμής ενός φράγματος περίθλασης ή ενός πρίσματος που χρησιμοποιούνται στα κλασικά φασματοφωτόμετρα διασποράς. Επιπλέον η

ακτίνα Laser HeNe με την υπέρυθη ακτινοβολία που προσπίπτει στο συμβολόμετρο Michelson παρέχουν τη δυνατότητα πλήρους καταγραφής της μετατόπισης του κατόπτρου και ταυτόχρονα καθορίζουν τον αριθμό των επαναλαμβανόμενων φασμάτων. Επιπλέον στη φασματοσκοπία FTIR έχουμε φάσματα πολύ υψηλής ποιότητας λόγω της χρήσης ηλεκτρονικού υπολογιστή που προσφέρει τη δυνατότητα ταχείας λήψης πολλαπλών φασμάτων και επεξεργασίας των δεδομένων. (Κουή Μαρία κ.ά. 2015)

4.5 Παράδειγμα

Σύμφωνα με πολλές έρευνες που έχουν δημοσιευτεί, έχει αποδειχθεί πως η εφαρμογή και η χρησιμότητα της φασματοσκοπίας με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) στις αναλύσεις φαρμακευτικών εναιωρημάτων είναι πολύ σημαντική. Μία από αυτές τις μελέτες εστίασε σε ένα πολυμερικό εναιώρημα (Norfloxacin / Carbopol 934) και στην αλληλεπίδραση μεταξύ της νορφλοξασίνης και του πολυμερούς. Η χημική αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των δύο ουσιών μελετήθηκε με φασματοσκοπία FTIR και Raman. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για να πραγματοποιηθεί το πείραμα ήταν τα εξής: (S. Sahoo, et.al. 2012)

- Νορφλοξασίνη (Norflox)
- Carbopol 934 (C934)
- Λεκιθίνη σόγιας
- Γλυκερόλη
- Μεθυλοπαραμπέν
- Προπυλοπαραμπέν
- Διάλυμα Σορβιτόλης
- Καθαρό νερό

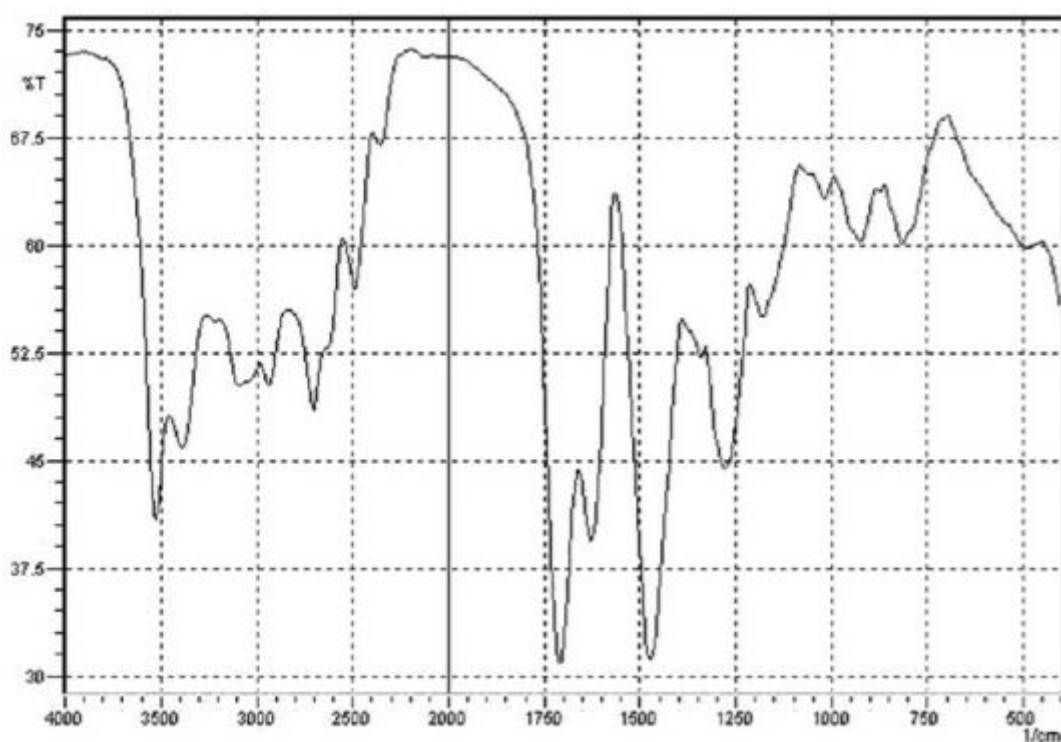
Για τις απαιτήσεις του πειράματος οι ερευνητές παρασκεύασαν με υπερήχων ένα βλενοσυγκολλητικό εναιώρημα χρησιμοποιώντας τα παραπάνω υλικά. Για να πραγματοποιηθεί η φασματοσκοπία υπέρυθρου Fourier, το εναιώρημα αυτό μετά από τους υπερήχους ψεκάστηκε με τη βοήθεια ενός ψεκαστήρα και τα λεπτά σταγονίδια που δημιουργήθηκαν ξηράνθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα

τα στερεά δείγματα συλλέχθηκαν και κονιορτοποιήθηκαν, ώστε να χρησιμοποιηθούν στην ανάλυση Fourier. Η ανάλυση Fourier πραγματοποιήθηκε με φασματοφωτόμετρο FTIR συνδεδεμένο με ένα υπέρυθρο (IR) μικροσκόπιο ρυθμισμένο σε λειτουργία ανάκλασης. Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε καθαρίστηκε αρχικά προσεκτικά χρησιμοποιώντας καθαρό ξηρό άζωτο ώστε να μειωθεί η υγρασία και να αυξηθεί ο λόγος σήματος προς θόρυβο αλλά και η ποιότητα των φασμάτων. Τα φάσματα που προέκυψαν ήταν στην περιοχή του μέσου υπέρυθρου (MIR) 400 έως 4000 cm^{-1} και πραγματοποιήθηκαν 60 σαρώσεις. (S. Sahoo, et.al. 2012)

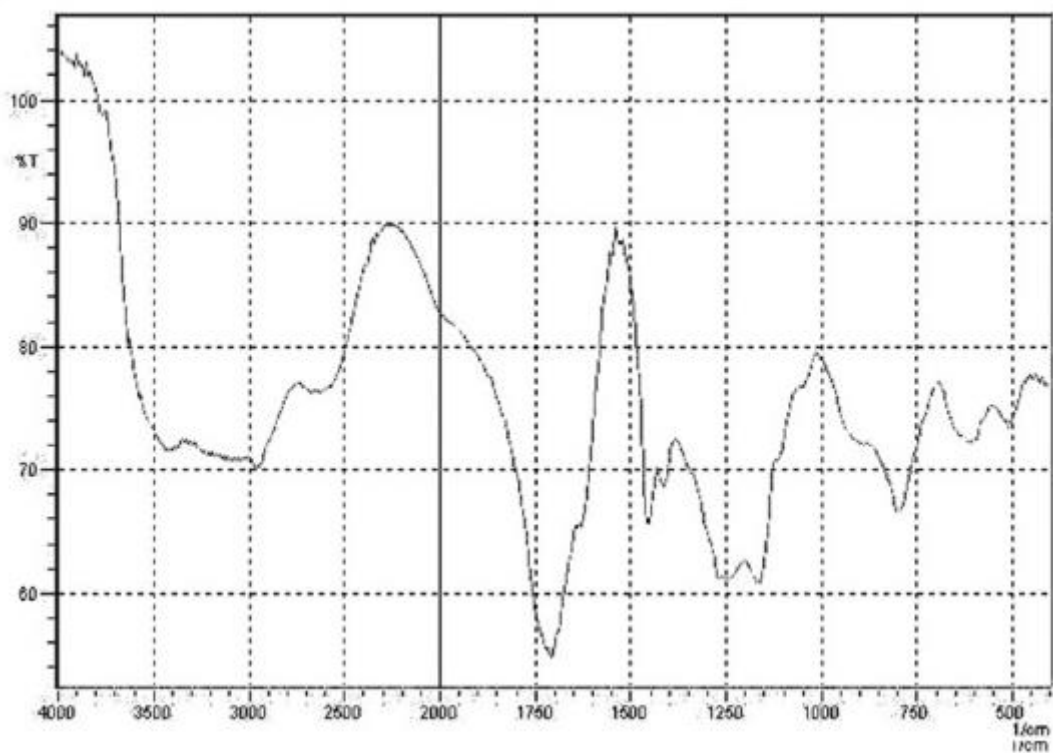
4.5.1 Φάσματα FTIR

Η ακτινοβολία υπέρυθρου όταν προσκρούει σε ένα μόριο μπορεί να απορροφηθεί, να ανακλαστεί ή να μεταδοθεί. Η απορρόφηση της ακτινοβολίας οδηγεί σε φάσματα FTIR, ενώ η ανάκλαση οδηγεί σε σκέδαση που χρησιμοποιείται στη φασματοσκοπία Raman. Επιπλέον η απορρόφηση υπέρυθρων (IR) των λειτουργικών ομάδων μπορεί να ποικίλλει σε ένα ευρύ φάσμα. Ωστόσο έχει βρεθεί ότι πολλές λειτουργικές ομάδες δίνουν χαρακτηριστικά απορρόφησης IR σε ένα συγκεκριμένο στενό εύρος συχνοτήτων. Εδώ στη μελέτη αυτή τα υπέρυθρα φάσματα καταγράφονται σε ένα φασματοφωτομετρο μετασχηματισμού Fourier στην περιοχή του μέσου υπέρυθρου (MIR) εντός του εύρους (400 – 4500 cm^{-1}). (S.Sahoo et.al. 2012)

Παρατηρώντας το φάσμα FTIR της νορφλοξασίνης (Εικόνα 12) βλέπουμε μία χαρακτηριστική κορυφή μεταξύ 3550 και 3500 cm^{-1} , η οποία αποδόθηκε σε δόνηση της υδροξυλικής ομάδας (OH) , και σε διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου από μία μόνο γέφυρα.. Επίσης η κορυφή στα 2750 – 2700 cm^{-1} έδειξε την παρουσία αιθυλομάδας, και η κορυφή στα 2500 cm^{-1} οφειλόταν στην ομάδα του καρβοξυλικού οξέος. (S. Sahoo et.al. 2012)

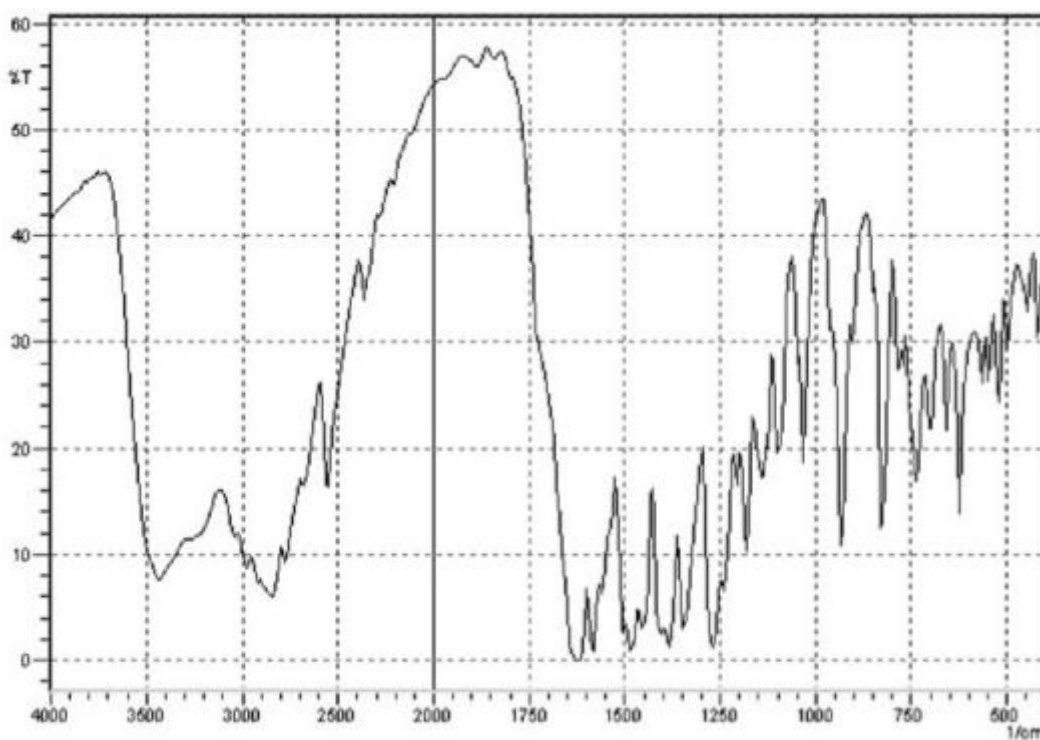


Εικόνα 12. Φάσμα FTIR νορφλοξασίνης (S. Sahoo et.al. 2012)



Εικόνα 13. Φάσμα FTIR Carprobol (C934)

Καθώς παρατηρούμε το φάσμα του C934 βλέπουμε μία κορυφή μεταξύ 3000 και 2950 cm^{-1} που αντιπροσωπεύει τη δόνηση υδροξυλικών ομάδων. Η κορυφή μεταξύ 1750 και 1700 cm^{-1} αποδόθηκε σε δονήσεις καρβονυλίου ($\text{C}=\text{O}$). Στο φάσμα FTIR του σκευάσματος που περιείχε και νορφλοξασίνη και C934 η κορυφή που φαίνεται μεταξύ 3550 -3400 cm^{-1} αποδόθηκε σε πολυμερή δεσμό υδρογόνου. Επίσης η κορυφή στα 2600 - 2500 cm^{-1} προκύπτει από ισχυρούς διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου. Μεταξύ 1600 και 1650 cm^{-1} η κορυφή αποδόθηκε σε δόνηση καρβονυλίου, ενώ η κορυφή στα 1250 – 1200 cm^{-1} αποδόθηκε στην παρουσία ακρυλικών. (S. Sahoo et.al. 2012)

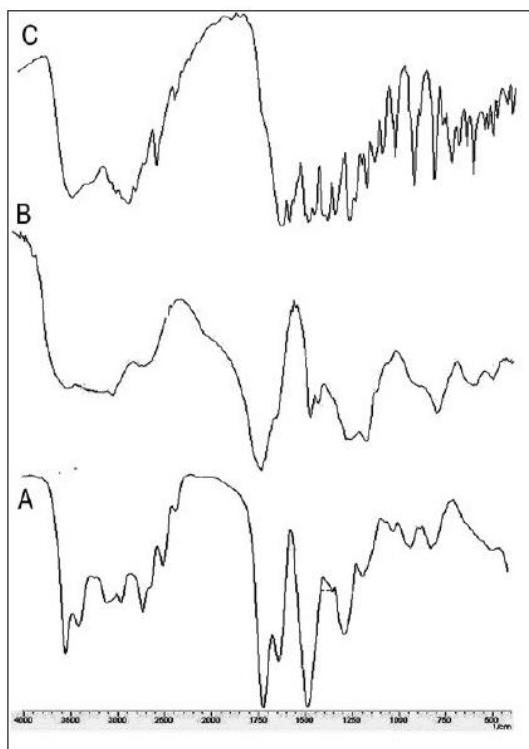


Εικόνα 14. Φάσμα FTIR εναιωρήματος (S. Sahoo et.al. 2012)

4.5.2 Σύγκριση Φασμάτων - Συμπεράσματα

Στην εικόνα 15 φαίνονται συγκριτικά οι κορυφές FTIR για το καθαρό φάρμακο, για το πολυμερές και για το εναιώρημα που παρασκευάστηκε. Συγκρίνοντας τα φάσματα FTIR μεταξύ του καθαρού φαρμάκου (Norflox), του πολυμερούς Carbopol (C934) και του σκευάσματος που περιέχει και νορφλοξασίνη και Carbopol, παρατηρούμε ότι η κορυφή στα 1700 cm^{-1} της νορφλοξασίνης δεν ανιχνεύτηκε στο βλεννοσυγκολλητικό εναιώρημα πιθανώς λόγω αλληλεπίδρασης

με το πολυμερές. Επιπλέον από τη σύγκριση των φασμάτων μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η καρβοξυλική ομάδα της νορφλοξασίνης υφίσταται χημική αλληλεπίδραση με το πολυμερές, όπως ήταν αναμενόμενο. Οι κορυφές στην περιοχή $3550 - 2500 \text{ cm}^{-1}$ θα μπορούσαν να αποδοθούν στις ασύμμετρες και συμμετρικές δονήσεις των ομάδων υδροξυλίου (OH), ωστόσο η μετατόπιση των χαρακτηριστικών αυτών κορυφών υποδηλώνει αλλαγή στην ένταση και επιβεβαιώνει την ύπαρξη δεσμών υδρογόνου. (S. Sahoo et.al. 2012)



Εικόνα 15. Φάσματα και των τριών ουσιών. (A) Νορφλοξασίνη, (B) Carbopol934, (C) Εναιώρημα (S Sahoo et.al. 2012)

ΕΝΟΤΗΤΑ 5

5.1 HPLC ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Οι χρωματογραφικές τεχνικές είναι μία σημαντική ομάδα μεθόδων οι οποίες βοηθούν τον επιστήμονα να διαχωρίσει τις ουσίες με παραπλήσιες χημικές ιδιότητες από σύνθετα μίγματα. Σε όλες αυτές τις τεχνικές διαχωρισμού το δείγμα διαλύεται σε μία κινητή φάση, η οποία μπορεί να είναι ένα αέριο, ένα υγρό ή ένα υπερκρίσιμο υγρό. Στη συνέχεια η κινητή φάση αναγκάζεται να διέλθει μέσω μιας στατικής φάσης, η οποία συνήθως είναι καθηλωμένη σε μία στήλη. Στις χρωματογραφικές τεχνικές ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό αλληλεπίδρασης της κάθε ουσίας με τις δύο φάσεις, ο οποίος καθορίζεται από την φυσικοχημική “συγγένεια” των συστατικών με την κάθε φάση. Η κινητή και η στατική φάση επιλέγονται κατάλληλα έτσι ώστε τα συστατικά του δείγματος να κατανέμονται μεταξύ των δύο φάσεων σε διαφορετικό βαθμό. Πιο συγκεκριμένα οι ουσίες οι οποίες κατακρατούνται ισχυρότερα από την στατική φάση κινούνται αργά κατά τη ροή της κινητής φάσης. Ενώ οι ουσίες που κατακρατούνται ασθενέστερα με από τη στατική φάση κινούνται ταχύτερα. Έτσι λοιπόν αυτή η διαφορά στην ευκινησία της κάθε ουσίας, οδηγεί στον διαχωρισμό των συστατικών του δείγματος, καταλαμβάνοντας το καθένα ξεχωριστές ζώνες. Το γεγονός αυτό καθιστά δυνατό τον ποιοτικό αλλά και τον ποσοτικό προσδιορισμό της κάθε ουσίας στο δείγμα. (Καρκαλούσος Πέτρος κ.ά., 2015)

5.2 ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ:

Οι χρωματογραφικές τεχνικές μπορούν να ταξινομηθούν με διάφορα κριτήρια, είτε με βάση το μέσο που τοποθετείται η στατική φάση, είτε με βάση το είδος της κινητής φάσης. Όσον αφορά τη στατική φάση διακρίνουμε δύο ειδών χρωματογραφικές τεχνικές: τη χρωματογραφία στήλης και την επίπεδη χρωματογραφία. Ενώ οι κατηγορίες με βάση το είδος της κινητής φάσης είναι η

υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography LC) και η αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography GC). Επιπλέον υπάρχουν και κάποιες ακόμα υποκατηγορίες χρωματογραφικών τεχνικών ανάλογα με τον μηχανισμό αλληλεπίδρασης των ως προς διαχωρισμό ουσιών με την στατική φάση. Αυτές είναι η χρωματογραφία προσρόφησης, κατανομής, ιονανταλλαγής, χημικής συγγένειας και μοριακού αποκλεισμού. (Καρκαλούσος Πέτρος κ.ά., 2015)

Χρωματογραφία Στήλης

Στη χρωματογραφία στήλης η στατική φάση βρίσκεται ακινητοποιημένη στο εσωτερικό μιας στήλης κατασκευασμένη συνήθως από ανοξείδωτο χάλυβα ή ύαλο. Η κινητή φάση διέρχεται διαμέσου της στήλης υπό συνεχή ροή είτε λόγω βαρύτητας είτε υπό υψηλή πίεση. Όταν εισαχθεί το δείγμα στην κορυφή της στήλης τα συστατικά του υφίστανται διαδοχικές κατανομές μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης. Η ταχύτητα μετακίνησης κάθε μορίου εξαρτάται από την αναλογία του χρόνου παραμονής στη στατική φάση ως προς τον χρόνο παραμονής στην κινητή φάση, και η αναλογία αυτή μας δείχνει τον συντελεστή κατανομής του συστατικού στις δύο φάσεις. Έτσι λόγω των διαφορετικών συντελεστών κατανομής της κάθε ουσίας είναι εφικτός ο διαχωρισμός των επιμέρους συστατικών. Το γεγονός αυτό επιτρέπει στα συστατικά που έχουν διαχωριστεί πλήρως να εξέλθουν από τη στήλη σε διαφορετικούς χρόνους. (Skoog, et.al. 2007), (Καρκαλούσος Πέτρος κ.ά., 2015)

5.3 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης αποτελεί μία από τις πιο εξελιγμένες μορφές χρωματογραφίας και βρίσκει εφαρμογή σε πάρα πολλά επιστημονικά πεδία, όπως για παράδειγμα την κλινική βιοχημεία, τη φαρμακευτική, τις ιατρικές επιστήμες κ.ά. Το χαρακτηριστικό της HPLC είναι ότι η κινητή φάση δε ρέει υπό την επίδραση της βαρύτητας αλλά λόγω της υψηλής πίεσης που δημιουργείται μέσω μιας αντλίας. Το γεγονός αυτό επιταχύνει τη διαδικασία της ανάλυσης και μάς επιτρέπει τη χρήση στηλών με μικρό μέγεθος σωματιδίων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να αυξάνεται το εμβαδόν της επιφάνειας της στατικής φάσης που

είναι διαθέσιμο να αλληλεπιδράσει με τα μόρια που μεταφέρονται μέσω της κινητής φάσης. Ως εκ τούτου ο διαχωρισμός των ουσιών βελτιώνεται σημαντικά και το μέγεθος της στήλης μειώνεται. (Skoog et.al., 2007)

5.3.1 HPLC Κανονικής Φάσης

Στην HPLC κανονικής φάσης χρησιμοποιείται ως πληρωτικό υλικό στήλης (στατική φάση) κάποιο πολικό υλικό όπως είναι το οξείδιο του πυριτίου (SiO_2) ή το οξείδιο του αργιλίου (Al_2O_3). Αντίθετα στην κινητή φάση χρησιμοποιούνται μη πολικοί διαλύτες όπως π.χ. το εξάνιο, το χλωροφόρμιο, και δεν περιέχεται νερό. Έτσι οι πολικές ενώσεις που έχουν διαχωριστεί από το μίγμα αλληλεπιδρούν ισχυρότερα με την πολική στατική φάση σε σχέση με τις μη πολικές ενώσεις. Ως εκ τούτου οι μη πολικές ουσίες διασχίζουν τη στήλη ταχύτερα και εκλούνται νωρίτερα από τις πολικές. Οι πολικές ενώσεις που συγκρατούνται στην στατική φάση εκλούνται όταν αυξήσουμε την πολικότητα της κινητής φάσης. Η HPLC κανονικής φάσης είναι κατάλληλη για τον διαχωρισμό χημικών ενώσεων που δεν διαλύονται στο νερό ή που υδρολύονται και συνεπώς δεν συνιστάται η παραμονή τους σε υδατικό περιβάλλον. (Καρκαλούσος Πέτρος κ.ά., 2015)

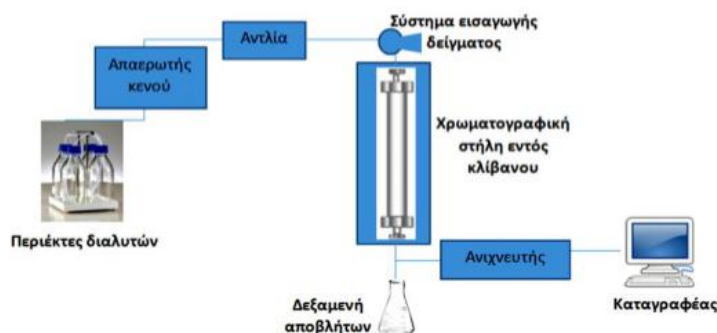
5.3.2 HPLC Αντίστροφης φάσης

Στην HPLC αντίστροφης φάσης ο διαχωρισμός των ουσιών βασίζεται στην προσρόφηση υδρόφοβων μορίων σε υδρόφοβη στατική φάση, ενώ η κινητή φάση είναι αυξημένης πολικότητας. Εδώ η στατική φάση αποτελείται από οξείδιο του πυριτίου συζευγμένο με διάφορες ομάδες, συνήθως αλκύλια (π.χ. ακετύλιο, οκτύλιο, δεκαοκτύλιο), οι οποίες κάνουν τη στατική φάση να είναι μη πολική. Από την άλλη μεριά η κινητή φάση αποτελείται από οργανικούς διαλύτες (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο κ.ά.), αναμεμειγμένους με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα συνήθως νερό. Στην HPLC αντίστροφης φάσης, όπως και στην HPLC κανονικής φάσης, τα μόρια που έχουν “συγγένεια” με τη στατική φάση συγκρατούνται σε αυτήν. Άρα σε αυτήν την περίπτωση έχουμε τα πολικά μόρια να εκλούνται γρηγορότερα από τα μη πολικά. Η μείωση της πολικότητας της

κινητής θα οδηγήσει στη μείωση της αλληλεπίδρασης των υδρόφοβων μορίων με τη στατική φάση. Συνεπώς στην HPLC αντίστροφης φάσης η σειρά έκλουσης των μορίων αντιστρέφεται σε σχέση με την HPLC κανονικής φάσης κι έτσι τα πολικά μόρια εκλούνται ταχύτερα από τα μη πολικά. (Skoog et.al. 2007), (Καρκαλούσος Πέτρος κ.ά., 2015)

5.4 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ HPLC:

- 1)Περιέκτης διαλυτών: Οι διαλύτες που θα αποτελέσουν την κινητή φάση βρίσκονται σε ειδικές φιάλες
- 2)Απαερωτής κενού: Εξασφαλίζει την απαέρωση της κινητής φάσης , έτσι ώστε να ελέγχεται η πίεση στη χρωματογραφική στήλη.
- 3) Αντλία: Εξασφαλίζει τη συνεχή ροή της κινητής φάσης υπό σταθερή πίεση διαμέσου του συνόλου του συστήματος, από τους περιέκτες των διαλυτών μέχρι το δοχείο συλλογής αποβλήτων.
- 4) Σύστημα εισαγωγής δείγματος (Injection system/ injector value): Πρόκειται για βρόγχο σταθερού όγκου ή αυτόματο σύστημα εισαγωγής μεταβλητού όγκου έγχυσης. Βρίσκεται πριν από τη χρωματογραφική στήλη και επιτρέπει την εισαγωγή του δείγματος στην κινητή φάση.
- 5) Χρωματογραφική στήλη: εδώ επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του δείγματος στα συστατικά του. Η στήλη βρίσκεται σε θερμοστατούμενο κλίβανο, διότι ο διαχωρισμός καθορίζεται από τη θερμοκρασία.
- 6) Ανιχνευτής (Detector): Αυτοί που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι οι φασματογράφοι μάζας MS (Mass Spectroscopy Detectors), ανιχνευτής Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού NMR, ανιχνευτής UV/Vis υπεριώδους – ορατού, ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων, (Diode Array Detector, DAD).
- 7) Δεξαμενή Αποβλήτων: Όπου συλλέγεται η κινητή φάση μαζί με τα περιεχόμενα συστατικά του δείγματος. (Skoog et.al. 2007), (Καρκαλούσος Πέτρος κ.ά., 2015)



Εικόνα 16. Διάγραμμα εργαστηριακής διάταξης υγροχρωματογραφίας HPLC
(Καρκαλούσος Πέτρος κ.ά., 2015)

5.5 Ποιοτικός και Ποσοτικός Προσδιορισμός με HPLC:

5.5.1 Ποιοτικός Προσδιορισμός

Στον ποιοτικό προσδιορισμό διαχωρίζουμε δύο περιπτώσεις:

1) Όταν είναι γνωστή η ταυτότητα του συστατικού του δείγματος και πρέπει να ταυτοποιήσουμε την κορυφή. Σε αυτήν την περίπτωση η ταυτοποίηση γίνεται με βάση τον χρόνο ανάσχεσης της κορυφής ή αλλιώς τον συντελεστή κατακράτησης, που προκύπτει από την ανάλυση του δείγματος και του προτύπου. Σε τέτοιου είδους περιπτώσεις είναι απαραίτητο οι πειραματικές συνθήκες να είναι πανομοιότυπες και στην ανάλυση του δείγματος και στην ανάλυση του προτύπου. Σε τέτοιου είδους περιπτώσεις που η ταυτότητα του συστατικού είναι γνωστή υπάρχει κι άλλη μεθοδολογία που εφαρμόζεται. Πιο συγκεκριμένα εμβολιάζεται το δείγμα με το γνωστό πρότυπο κι έτσι θα έχουμε ενίσχυση της υπάρχουσας κορυφής του συστατικού με διατήρηση της συμμετρίας της, που μας οδηγεί στην επιβεβαίωση της ταυτότητας της κορυφής. (Καρκαλούσος Πέτρος κ.ά., 2015)

2) Σε περιπτώσεις που δεν είναι γνωστή η ταυτότητα των συστατικών του δείγματος, γίνεται σύζευξη της μεθόδου HPLC με κάποιον ανιχνευτή που βοηθάει στην ταυτοποίηση, όπως για παράδειγμα ανιχνευτής μαγνητικού συντονισμού NMR, ή φασματογράφος μάζας MS. Γενικά η ταυτοποίηση των

ουσιών ενός δείγματος συνιστάται να γίνεται με δύο ή περισσότερες χημικές τεχνικές και συνήθως κρίνεται απαραίτητος ο συνδυασμός τεχνικών. (Καρκαλούσος Πέτρος κ.ά., 2015)

5.5.2 Ποσοτικός Προσδιορισμός

Όπως έχει ήδη αναφερθεί ο χρόνος ανάλυσης μιας ουσίας υπό αυστηρά καθορισμένες πειραματικές συνθήκες αποτελεί χαρακτηριστική σταθερά της ουσίας. Επιπλέον προκειμένου να γίνει η ταυτοποίηση των ουσιών στις οποίες οφείλονται οι κορυφές του χρωματογραφήματος, είναι απαραίτητο να συγκρίνουμε το χρωματογράφημα που προκύπτει από την ανάλυση του δείγματος με αυτό που λαμβάνεται κατά την ανάλυση των προτύπων. Ως εκ τούτου είναι σημαντικό να έχουμε μία γενική γνώση των αναμενόμενων αναλυτών του στο δείγμα πριν την ανάλυση, έτσι ώστε να επιλεγούν τα σωστά πρότυπα. Όσον αφορά την ποσοτικοποίηση των ουσιών, είναι προφανές ότι όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της αναλύμενης ουσίας τόσο μεγαλύτερο θα είναι το εμβαδόν της προκύπτουσας κορυφής, εφόσον περισσότερα μόρια της ουσίας θα ανιχνεύονται από τον ανιχνευτή και μάλιστα η σχέση αυτή είναι ανάλογη. Επομένως η ποσοτικοποίηση γίνεται με βάση του εμβαδού της επιφάνειας της κορυφής, το οποίο είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση της ουσίας, μετά την κατασκευή κατάλληλης καμπύλης αναφοράς. Επιπλέον εκτός της αναλογίας αυτής, ισχύει και η αναλογία του ύψους της κορυφής με την ποσότητα του αναλύτη. Το πιο σημαντικό κατά την ποσοτικοποίηση είναι να κατασκευαστεί καμπύλη αναφοράς με πρότυπες ουσίες για κάθε ένα συστατικό του δείγματος. Αυτό είναι απαραίτητο διότι δεν υπάρχει αναλογία μεταξύ του εμβαδού της κορυφής της μίας ουσίας με τη συγκέντρωση μιας άλλης, διότι κάθε ουσία απορροφά σε συγκεκριμένο μήκος κύματος και με διαφορετικό συντελεστή μοριακής απόσβεσης. (Καρκαλούσος Πέτρος κ.ά., 2015)

5.6 Παράδειγμα

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες για την χρησιμότητα και την εφαρμογή της υγροχρωματογραφίας HPLC στην ανάλυση φαρμακευτικών εναιωρημάτων. Μία πρόσφατη εργασία που δημοσιεύτηκε το 2022 είχε τίτλο “A Validated RP-

HPLC Method for Simultaneous Determination of Cefixime and Clavulanic Acid Powder in Pediatric Oral Suspension”. Στη μελέτη αυτή γίνεται ταυτόχρονος προσδιορισμός της κεφιξίμης (CFX) και του κλαβουλανικού οξέος (CVA) σε ένα παιδιατρικό πόσιμο εναιώρημα, με τη μέθοδο της υγροχρωματογραφίας HPLC ανάστροφης φάσης. Μέχρι σήμερα έχουν δημοσιευτεί πολλές μελέτες για την ξεχωριστή ανάλυση των CFX και CVA, ωστόσο στη συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιείται ταυτόχρονη ανάλυση και προσδιορισμός και των δύο ουσιών. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι: (Utsav Nepal et.al. 2022)

- Δείγμα από το φαρμακευτικό εναιώρημα που περιέχει κεφιξίμη και κλαβουλανικό οξύ
- Μεθανόλη
- Νερό
- Όξινο φωσφορικό δινάτριο
- Δισόξινο φωσφορικό κάλιο

Η οργανολογία του πειράματος αποτελείται από ένα σύστημα HPLC Agilent 1260, μία αντλία, έναν αυτόματο δειγματολήπτη, μία χρωματογραφική στήλη από δεκαοκτύλιο (C18) 5μm, και έναν ανιχνευτή Uv/Vis που λειτουργούσε στα 220nm. (Utsav Nepal et.al. 2022)

5.6.1 Χρωματογραφικές συνθήκες

Η κινητή φάση παρασκευάστηκε με διάλυση 3,408 gr φωσφορικού δινάτριου σε 800mL νερό και στη συνέχεια προστέθηκαν 200mL μεθανόλη. Το pH ρυθμίστηκε στα 5,5 με ορθοφωσφορικό οξύ. Η κινητή φάση διηθήθηκε μέσω φίλτρων μεμβράνης 0,45μm και η απαέρωση έγινε με υπερήχους για 20 λεπτά . Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε στήλη C18 (δεκαοκτύλιο) με μήκος κύματος 220 nm από ανιχνευτή υπεριώδους – ορατού (Uv/Vis) και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 30 °C. Ο όγκος έγχυσης ήταν 20μL και ο ρυθμός ροής ήταν 1mL/min. Επιπλέον παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα κεφιξίμης και κλαβουλανικού οξέος, και το διάλυμα του δείγματος από το φαρμακευτικό εναιώρημα. (Utsav Nepal et.al. 2022)

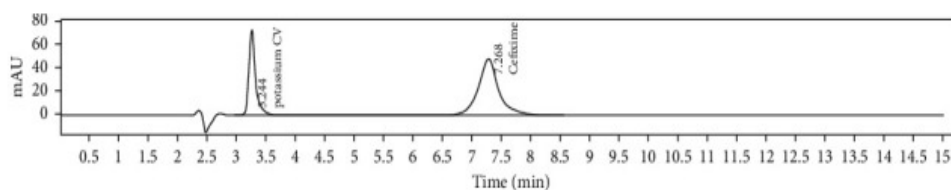
5.6.2 Αποτελέσματα και Επικύρωση

Για την επικύρωση της μεθόδου οι ερευνητές έπρεπε να ελέγξουν την ειδικότητα, την γραμμικότητα, την επαναληψιμότητα, την ακρίβεια, την πιστότητα και τα όρια ανίχνευσης LOD και LOQ (όριο ποσοτικού προσδιορισμού). Επιπλέον έπρεπε να κατασκευάσουν τις πρότυπες καμπύλες αναφοράς και για την κεφιζίμη και για το κλαβουλανικό οξύ. Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των CFX και CVA ήταν γνωστά μέσα από τις βιβλιογραφίες κι έτσι επιλέχθηκαν οι κατάλληλες χρωματογραφικές συνθήκες όπως η σύσταση της κινητής φάσης, η στατική φάση, το μήκος κύματος του ανιχνευτή και η σωστή προετοιμασία του δείγματος. Ωστόσο κατά την πειραματική διαδικασία έγιναν κάποιες μετρήσεις μεταβάλλοντας το pH της κινητής φάσης και βελτιστοποιώντας τις συνθήκες χρωματογραφικού διαχωρισμού στη στήλη. Μέσα από τη βιβλιογραφία είναι επίσης γνωστό ότι το κατάλληλο pH για την έκλυση φαρμάκων που σχετίζονται με κεφιζίμη και κλαβουλανικό οξύ είναι μεταξύ 4 και 6,5. Έτσι οι ερευνητές ξεκίνησαν από το υψηλότερο pH 6,5 και μείωναν σταδιακά κατά 0,5. Τα αποτελέσματα αυτών των μετρήσεων φαίνονται στον πίνακα παρακάτω, και βάσει αυτού επιλέχθηκε pH 5,5 για την κινητή φάση. (Utsav Nepal et.al. 2022)

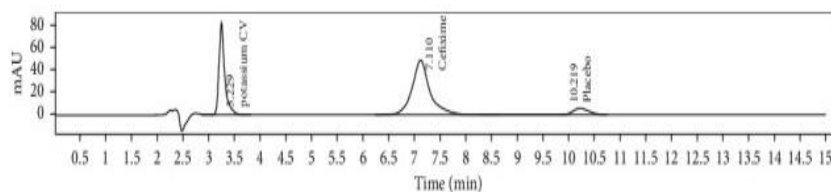
Column	Mobile phase	Elution mode	Flow rate	pH	Observation	Result
C18	Methanol-water consists of disodium hydrogen phosphate (20 : 80, v/v)	Isocratic	1.0 mL/min	6.5	Poor resolution	Rejected
C18	Methanol-water consists of disodium hydrogen phosphate (20 : 80, v/v)	Isocratic	1.0 mL/min	6.0	Poor resolution	Rejected
C18	Methanol-water consists of disodium hydrogen phosphate (20 : 80, v/v)	Isocratic	1.0 mL/min	5.5	Good resolution	Accepted
C18	Methanol-water consists of disodium hydrogen phosphate (20 : 80, v/v)	Isocratic	1.0 mL/min	5.0	Poor and unstable peak shape	Rejected
C18	Methanol-water consists of disodium hydrogen phosphate (20 : 80, v/v)	Isocratic	1.0 mL/min	4.5	Poor and unstable peak shape	Rejected
C18	Methanol-water consists of disodium hydrogen phosphate (20 : 80, v/v)	Isocratic	1.0 mL/min	4.0	Poor and unstable peak shape	Rejected

Πίνακας 3. Αποτελέσματα μετρήσεων σε διαφορετικό pH

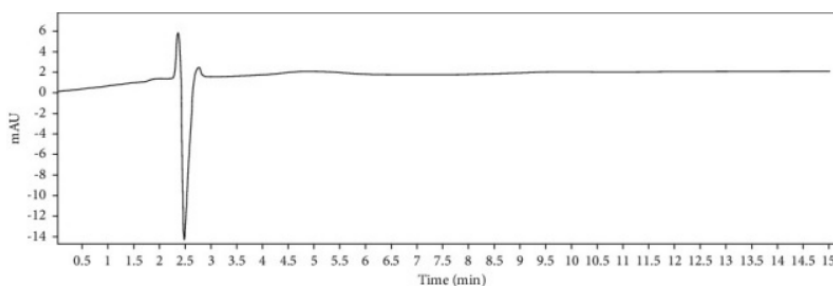
Τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν από την ανάλυση φαίνονται στις παρακάτω εικόνες. (Utsav Nepal et.al. 2022)



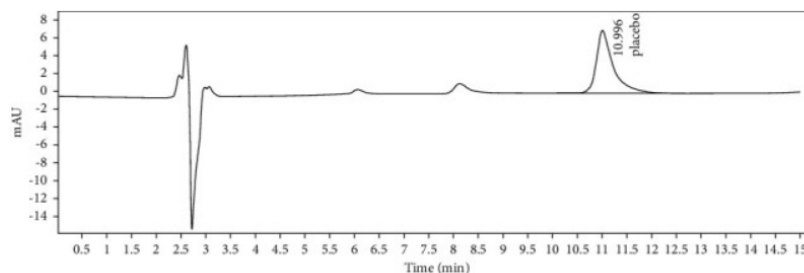
Εικόνα 17. Χρωματογράφημα πρότυπων διαλυμάτων κεφιξίμης και κλαβουλανικού οξέος



Εικόνα 18. Χρωματογράφημα δειγμάτων



Εικόνα 19. Χρωματογράφημα τυφλού δείγματος



Εικόνα 20. Χρωματογράφημα εικονικού φαρμάκου Placebo

Παρατηρώντας τα χρωματογραφήματα των προτύπων και του δείγματος (εικόνες 17 και 18 αντίστοιχα) βλέπουμε πως δεν υπάρχουν ασύμμετρες κορυφές κατά την ανάλυση τόσο της κεφιζίμης όσο και του κλαβουλανικού οξέος. Επίσης είναι φανερό πως οι κορυφές των αναλυτών είναι καθαρές και δεν υπάρχουν αιχμές παρεμβολών. Οι πίνακες με τους χρόνους κατακράτησης των ουσιών που φαίνονται παρακάτω επιβεβαιώνουν την ταυτοποίηση των ουσιών (Πίνακες 4 και 5). Με βάση αυτών που αναφέρθηκαν επιβεβαιώνεται και η ειδικότητα της μεθόδου. (Utsav Nepal et.al. 2022)

Specificity of clavulanic acid.

S. no.	Retention time (minutes)		Area	
	Standard	Sample	Standard	Sample
1	3.244	3.229	555.367	630.096
2	3.242	3.228	559.499	627.963
3	3.240	3.227	554.267	612.822
4	3.239	3.225	549.702	623.480
5	3.237	3.224	557.230	627.552
Average	3.240	3.227	555.213	624.383
%RSD	0.088	0.057	0.6601	1.1037

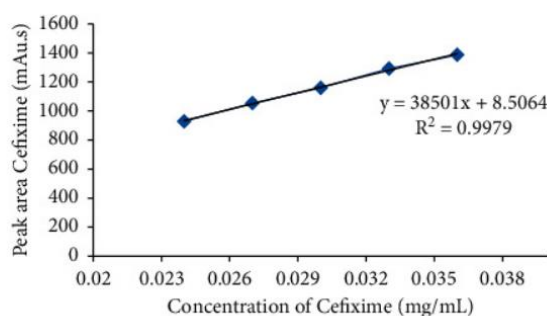
Πίνακας 4. Χρόνοι κατακράτησης κλαβουλανικού οξέος

Specificity of cefixime.

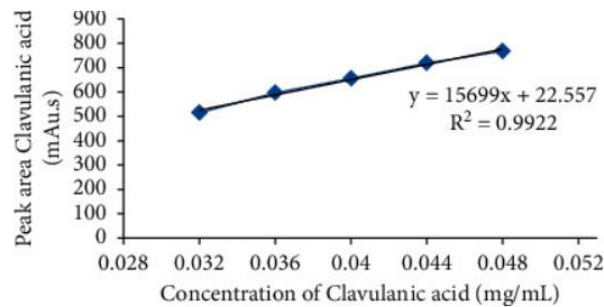
S. no.	Retention time (minutes)		Area	
	Standard	Sample	Standard	Sample
1	7.268	7.110	1159.539	1171.232
2	7.245	7.099	1159.844	1170.727
3	7.226	7.089	1158.852	1172.009
4	7.208	7.079	1159.564	1172.305
5	7.190	7.070	1159.141	1172.559
Average	7.227	7.089	1159.388	1171.766
%RSD	0.420	0.224	0.0337	0.0653

Πίνακας 5. Χρόνοι κατακράτησης κεφιξίμης (Utsav Nepal et.al. 2022)

Όσον αφορά τη γραμμικότητα της μεθόδου οι ερευνητές κατασκεύασαν δύο πρότυπες καμπύλες αναφοράς, μία για την κεφιξίμη και μία για το κλαβουλανικό οξύ (Εικόνες 21 και 22 αντίστοιχα). Είναι φανερό παρατηρώντας τις καμπύλες ότι υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ των περιοχών συγκέντρωσης 0,024 – 0,036 mg/mL και 0,032 – 0,048 mg/mL για την κεφιξίμη και το κλαβουλανικό οξύ αντίστοιχα. Επιπλέον επιβεβαιώθηκαν η ακρίβεια, η πιστότητα, η ανθεκτικότητα, υπολογίστηκαν τα όρια ανίχνευσης LOD και LOQ και το ποσοστό ανάκτησης ήταν εντός των αποδεκτών ορίων. (Utsav Nepal et.al. 2022)



Εικόνα 21. Καμπύλη αναφοράς για την κεφιξίμη



Εικόνα 22. Καμπύλη αναφοράς για το κλαβουλανικό οξύ (Utsav Nepal 2022)

5.6.3 Συμπεράσματα της έρευνας

Βάσει όλων αυτών των δεδομένων που αναφέρθηκαν παραπάνω η HPLC αντίστροφης φάσης είναι μία επικυρωμένη μέθοδος ανάλυσης σύμφωνα με τις προδιαγραφές που προέρχονται από τον ICH (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use), για την ταυτοποίηση αλλά και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των CFX και CVA. Η επικύρωση της μεθόδου επιτεύχθηκε από τους ερευνητές, μετρώντας την ειδικότητα, την γραμμικότητα, την επαναληψιμότητα, την ακρίβεια, την πιστότητα και τα όρια ανίχνευσης LOD και LOQ. Συμπερασματικά η αναλυτική αυτή μέθοδος μπορεί να υποστηρίξει τις φαρμακευτικές βιομηχανίες ώστε να αναλύσουν φαρμακευτικά σκευάσματα που περιέχουν κεφιζίμη και κλαβουλανικό οξύ και να αξιολογήσουν την ποιότητά τους. (Utsav Nepal et.al. 2022)

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Liquid Dosage Forms: Pharmaceutical Suspensions, Pharmapproach 2020

Kulshreshtha A., Singh O. and Wall M, Springer 2010, Pharmaceutical Suspensions: From Formulation Development to Manufacturing,

Yusuf Ali, Akio Kimura, Martin J. Coffre, Praveen Tyle, Springer 2009, Pharmaceutical Development of Suspension Dosage Form

N. Bostjin, J. Van Reneghem, W. Dhondt, C. Vervaet, T. De Beer, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2018. A continuous Manufacturing concept for a pharmaceutical oral suspension

Advantages and Disadvantages of Pharmaceutical Suspensions, 20 July 2020 in Pharmaceutics by Pharmapproach

Hui Wang, Peny Tab, David Barona, Grace Li, Susan Hoe, David Lechuga – Ballesteros, David S. Nobes, Reinhard Vehring, 5 September 2018, ScienceDirect, Characterization of the suspension stability of pharmaceuticals using a shadowgraphic imaging method,

Karen A. Esmonde – White, Maryann Cuellar, Carsten Uerpmann, Bruno Lenain, Ian R. Lewis, Raman spectroscopy as a process analytical technology for pharmaceutical manufacturing and bioprocessing, Springerlink 2016

T.R.M De Beer, G.J. Vergote, W.R.G. Baeyens, J.P. Remon, C. Vervaet, F. Verpoort, Development and validation of a direct, non-destructive quantitative method for medroxyprogesterone acetate in a pharmaceutical suspension using FT-Raman spectroscopy, European Journal of Pharmaceutical Science 2004

T.R.M. De Beer, W.R.G. Baeyens, A. Vermeire, D. Broes, J.P. Remon, C. Vervaet, Raman spectroscopic method for the determination of medroxyprogesterone acetate in a pharmaceutical suspension: validation of quantifying abilities, uncertainty assessment and comparison with the high performance liquid chromatography reference method, Analytica Chimica 2007

Seon Chan Park, Minjung Kim, Jaegeun Noh, Hoeil Chung, Youngah Woo, Jonghwa Lee, Mark S. Kemper, Reliable and fast quantitative analysis of active ingredient in pharmaceutical suspension using Raman spectroscopy, Anal. Chim Acta, 2007

Michail Lykouras, Stefani Fertaki, Malvina Orkoulas, and Christos Kontoyannis. Sample Preparation of Posaconazole Oral Suspensions for Identification of the Crystal Form of the Active Pharmaceutical Ingredient, Molecules MDPI 2020

Skoog, Holler, Crouch, Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, 2007

Βασίλης Γ. Ναστόπουλος, Εφαρμογή των μεθόδων περίθλασης των ακτίνων Χ επί μονοκρυστάλλων για την επίλυση χημικών προβλημάτων, Διδακτορική Διατριβή, Πάτρα 1987

http://old.uoi.gr/services/lab-net/net-web/Powder-XRD_gr.pdf

Κουή, Μ., Αβδελίδης, Ν., Θεοδωρακέας, Π., & Χειλάκου, Ε. (2015). Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier με Αποσβένουσα Ολική Ανάκλαση [Κεφάλαιο]. Στο Κουή, Μ., Αβδελίδης, Ν., Θεοδωρακέας, Π., & Χειλάκου, Ε. 2015. Μη καταστρεπτικές και φασματοσκοπικές μέθοδοι εξέτασης των υλικών [Προπτυχιακό εγχειρίδιο]. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις.

S Sahoo, CK Chakraborti, PK Behera and SC Mishra FTIR and Raman Spectroscopic Investigations of a Norfloxacin/Carbopol934 Polymeric Suspension, J Young Pharm. 2012 Jul-Sep

Καρβέλης Δημήτρης, Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού της αλίσκικρένης και υδροχλωροθειαζιδίου σε δισκία με την τεχνική υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, Μεταπτυχιακό Δίπλωμα ειδίκευσης, Αθήνα 2013

Καρκαλούσος Πέτρος, Γεωργίου Ζωή, Κρούπης Χρήστος, Παπαιωάννου Άγγελος, Πλαγιάς Παναγιώτης, Σπυρόπουλος Βασίλειος, Τσότσου Γεωργία Ελένη, Φούντζουλα Χριστίνα Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (απόδοσης)

στην κλινική χημεία. Βασικές αρχές και παραδείγματα, Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις, 2015

Utsav Nepal, Vijay Kumar Panthi, Namindra Prasad Chaudhary, Samip Chaudhary, A Validated RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Cefixime and Clavulanic Acid Powder in Pediatric Oral Suspension, Int J Anal Chem 2022

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα: Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης