



# Μέθοδοι ελέγχου φαρμάκων

Συγγραφείς: David G. Watson, Μανόλης Γεωργαράκης

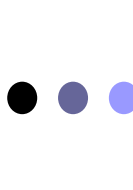
Επίβλεψη μαθήματος: Αναπληρώτρια καθ. Αικ. Μαρκοπούλου

email: [amarkopo@pharm.auth.gr](mailto:amarkopo@pharm.auth.gr)

site: [www.markopoulou.gr](http://www.markopoulou.gr)

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ, 2017



## Εφαρμογές Φαρμακευτικής Ανάλυσης στη Βιομηχανία

Έλεγχοι



- Έλεγχο ταυτότητας και καθαρότητας της δραστικής και των εκδόχων του σκευάσματος
- Την ταυτοποίηση δραστικής στο μορφοποιημένο προϊόν (σκεύασμα) και το % ποσοστό της δηλούμενης περιεκτικότητας της.
- Την σταθερότητα (stability) του φαρμάκου στο σκεύασμα (χρόνο ζωής του προϊόντος)
- Το ρυθμό απελευθέρωσης του φαρμάκου από το σκεύασμα
- Τη συγκέντρωση του φαρμάκου σε δείγμα ιστού ή σε βιολογικά υγρά

## ● ● ● | Απασχόληση σε Φαρμακοβιομηχανία (παραγωγή)

- ✓Υπεύθυνος παραγωγής (1-2 άτομα)
- ✓Υπεύθυνος υλικών συσκευασίας (1-2 άτομα)
- ✓Υπεύθυνος ζύγισσης (1-2 άτομα)
- ✓Αναλυτές (10-15 άτομα)
- ✓Υπεύθυνος επεξεργασίας φυτικών δρογών



## ● ● ● | Προσόντα και απαιτήσεις (κάτοχος)

- Πτυχιούχος φαρμακοποιός (Χημικός, Χημικός Μηχανικός)
- Προπτυχιακή εξειδίκευση (διπλωματική) στο γνωστικό του αντικείμενο
- Μεταπτυχιακό δίπλωμα
- Διδακτορική διατριβή



## Π ρ ο σ ό ν τ α κ α ι α π α ι τ ή σ ε ι ς ( Γ ν ώ σ τ η ς )



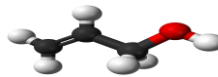
➤ Ηλεκτρονικών υπολογιστών



➤ Μαθηματικών και στατιστικής



➤ Χημείας φαρμάκου

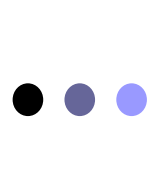


➤ Τεχνολογίας φαρμακευτικού σκευάσματος

➤ Αγγλικής γλώσσας



➤ Διαρκή ανανέωση γνώσεων



## Αρμοδιότητες Αναλυτή

Εκτελεί μια σειρά αναλύσεων σε:

✓ Πρώτες ύλες

✓ Δραστική

✓ Σκεύασμα



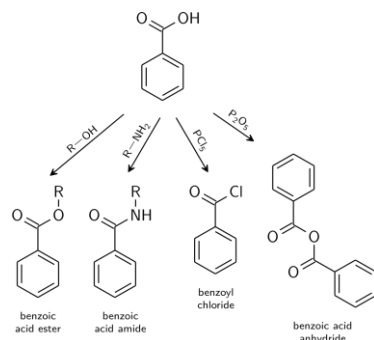
## Έλεγχοι σε πρώτες ύλες

- Ταυτοποίηση εκδόχων, δραστηκής
- Ύπαρξη βαρέων μετάλλων
- Έλεγχος ορισμένων φυσικοχημικών ιδιοτήτων (ιξώδες, δείκτη διάθλασης, στροφ. ικανότητας)
- Καθαρότητα



## Πηγές προσμίξεων δραστηκής

- ❖ Επιμόλυνση στις πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση
- ❖ Υπολείμματα χημικών ενδιάμεσων σύνθεσης
- ❖ Αντιδραστήρια, καταλύτες, διαλύτες
- ❖ Επιμόλυνση από περιέκτες



## Έλεγχοι σε πρώτες ύλες



Φαρμακοποιίες (Ευρωπαϊκή, Αμερικάνικη, Βρετανική, Ελληνική)

## Διαδικασίες για τον έλεγχο φαρμάκων

Μέθοδοι επικυρωμένοι και καταγεγραμμένη ως εσωτερικός κανονισμός της εταιρίας (Standard Operating Procedure)



## Η επικύρωση των μεθόδων και η υπόδειξη των διαδικασιών ανάλυσης

- ❖ **Διεθνή Διάσκεψη Εναρμόνισης** (*Intern. Conference of Harmonization, ICH*)
- ❖ **Διαχείριση Τροφής και Φαρμάκου** (*Food and Drug Administration, FDA*)
- ❖ **Ορθές πρακτικές κατασκευής** (*Good Manufacture Practice, GMP*)
- ❖ **Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης** (*International Organization for Standardization, ISO*)



## International Conference Harmonization (ICH) Διεθνή Διάσκεψη Εναρμόνισης Τεχνικών Απαιτήσεων

### Σκοπός

Η τυποποίηση της επικύρωσης των αναλυτικών διαδικασιών (Βρυξέλες το1990)

### Αναλυτική Διαδικασία

Παρέχει ακριβή περιγραφή (στάδια) μιας ανάλυσης

- Την ποιότητα και προέλευση του προτύπου αναφοράς (standard)
- Την ποιότητα /προετοιμασία αντιδραστηρίων και διαλυτών
- Την πορεία παρασκευής των προτύπων διαλυμάτων
- Την οργανολογία
- Την μεθοδολογία, διαδικασία ανάλυσης



## Έλεγχος σκευάσματος μιας δόσης

- Έλεγχος χρόνου καταθρυμματισμού
- Έλεγχος ευθρυπτότητας / μηχανική αντοχή
- Πάχους / διαμέτρου (δισκία καψάκια)
- Έλεγχος ομοιομορφίας βάρους
- Έλεγχος ομοιομορφίας δόσης
- Έλεγχος ρυθμού διάλυσης
- Προσδιορισμός δραστικής και προϊόντων διάσπασης





## Έλεγχος χρόνου καταθρυμματισμού

77.5 x 21.5mm



## Έλεγχος χρόνου καταθρυμματισμού

### Παράγοντες επίδρασης

- Φυσικοχημικές ιδιότητες δραστικών/εκδόχων
- Το είδος/ποσότητα του μέσου καταθρυμματισμού
- Η μέθοδος ενσωμάτωσης του μέσου καταθρυμματισμού
- Το είδος και η ποσότητα διολισθητικών, λιπαντικών, αραιωτικών
- Το μέγεθος κόκκων κοκκοποιημένου υλικού/πορώδες δισκίων



## Έλεγχος χρόνου καταθρυμματισμού

### Απλά δισκία

Προσθήκη δίσκου. (Στα 6 όλα, στα 18 τουλάχιστον τα 16)



### Επικεκαλυμμένα δισκία

Εμβάπτιση του πλαισίου για 3min σε νερό θερμοκρασίας δωματίου. Προσθήκη δίσκου και τεχνητού γαστρικού υγρού για 30min. Αν τα δισκία δεν καταθρυμματίστηκαν βάζουμε τεχνητό εντερικό υγρό για 30min. (Στα 6 όλα, στα 18 τουλάχιστον τα 16)



### Εντερικώς επικεκαλυμμένα δισκία

Εμβάπτιση του πλαισίου για 5min σε νερό θερμοκρασίας δωματίου. Απομάκρυνση δίσκου και προσθήκη τεχνητού γαστρικού υγρού για 60min. Δεν πρέπει τα δισκία να καταθρυμματίσουν. Βάζουμε δίσκους, τεχνητό εντερικό υγρό για 120min. (Στα 6 όλα, στα 18 τουλάχιστον τα 16)



### Σκληρά καψάκια

Προσθήκη πλέγματος. (Στα 6 όλα, στα 18 τουλάχιστον τα 16)



## Έλεγχος μηχανικής αντοχής

Η μηχανική αντοχή των δισκίων εκτιμάται με δοκιμασίες που μετρούν την αντοχή στην θραύση (crashing strength) των δισκίων, πρακτικά την δύναμη που απαιτείται για την θραύση ενός δισκίου κατά την διαμετρική συμπίεση του.



**Αντοχή σε εφελκυσμό**

$$T=2F/\pi dh$$

όπου F είναι η δύναμη που πρέπει να ασκηθεί διαμετρικά στο δισκίο για να σπάσει, d είναι η διάμετρος του δισκίου και h το πάχος του



## • • • | Ευθρυπτότητα δισκίων



Αριθμός προζυγισμένων δισκίων εισάγονται στον πλαστικό κυλινδρικό δίσκο της συσκευής και ο δίσκος εκτελεί 100 περιστροφές με ρυθμό 25στροφές/λεπτό. Ακολούθως τα δισκία ξεσκονίζονται προσεχτικά και ζυγίζονται. Η απώλεια βάρους δεν πρέπει να υπερβαίνει συγκεκριμένα όρια που ορίζονται στην φαρμακοποιία και που για τα συνήθη δισκία είναι 0.5%-1%.

## • • • | Έλεγχος ομοιομορφίας βάρους

Ελέγχονται 20 μονάδες. Υπολογίζεται το Μέσο Βάρος (πρέπει να είναι εντός ορίων). Επίσης μόνο 2 μονάδες μπορούν να αποκλίνουν < από την %επιτρεπόμενη απόκλιση και κανένα στο διπλάσιο.

Π.χ. δισκία Μέσου Βάρους <80mg έχουν όριο 10%Απόκλιση

1. Δισκία
2. Καψάκια (το κέλυφος πλένεται με αιθέρα ή αλκοόλη)
3. Κόνεις για παρεντερική χρήση (ο περιέκτης εκπλένεται και ξηραίνεται στους 100-105°C για 1h)

## Έλεγχος ρυθμού διάλυσης (καθορισμένου χρόνου, σε διαφορετικούς χρόνους)



## Έλεγχος ρυθμού διάλυσης

$$\frac{dc}{dt} = kA(C_s - C) \quad \text{Noyes and Whitney)}$$

$dc/dt$  ο ρυθμός διάλυσης του φαρμάκου (mg/min)

$K$  σταθερά διάλυσης (cm/min)

$A$  επιφάνεια δραστικής

$C_s$  συγκέντρωση κορεσμού (mg/ml)

$C$  συγκ. διαλυμένης ουσίας σε  $t$

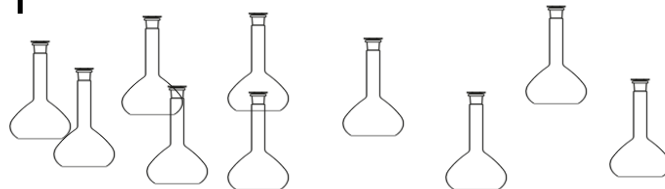
# ● ● ● | Προδιαγραφές διαλυτοποίησης

-Στο πρώτο στάδιο ελέγχονται 6 δισκία και ο έλεγχος θεωρείται επιτυχής αν όλα τα δισκία εμφανίζουν ρυθμό διάλυσης όχι μικρότερο από αυτόν που καθορίζεται στις προδιαγραφές (Q) συν 5%.

-Διαφορετικά εξετάζονται άλλα 6 δισκία και το προϊόν περνά επιτυχώς την δοκιμασία αν ο μέσος όρος του ρυθμού διάλυσης των 12 δισκίων είναι μεγαλύτερος ή ίσος με Q και κανένα δισκίο δεν εμφανίζει ρυθμό διάλυσης Q μείον 15%.

-Διαφορετικά ελέγχονται άλλα 12 δισκία και το προϊόν περνά επιτυχώς την δοκιμασία αν ο μέσος όρος του ρυθμού διάλυσης των 24 δισκίων είναι μεγαλύτερος ή ίσος με Q και ταυτόχρονα όχι περισσότερα από 2 δισκία εμφανίζουν ρυθμό διάλυσης Q μείον 15%.

## ● ● ● | (content uniformity test).

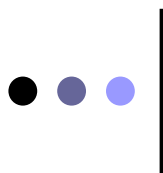


### Έλεγχος στα 10 δισκία

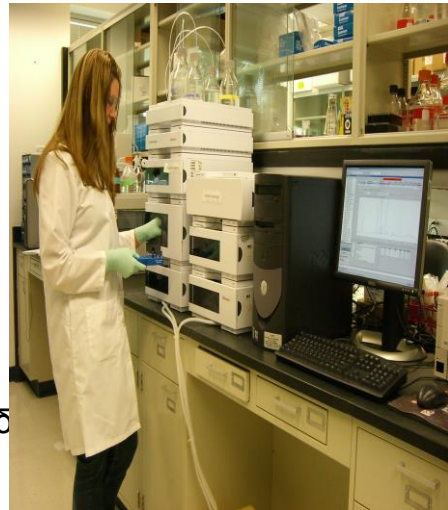
Η περιεκτικότητα σε φάρμακο 9 δισκίων πρέπει να βρίσκεται μεταξύ 85% και 115% της δηλωμένης περιεκτικότητας ενώ η περιεκτικότητα του 10ου μεταξύ 75% και 125%

### Έλεγχος σε επιπλέον 20 δισκία

Αν οι παραπάνω συνθήκες δεν ικανοποιούνται ελέγχεται η περιεκτικότητα και των υπολοίπων 20 δισκίων και η οποία και για τα 20 δισκία πρέπει να είναι εντός των ορίων 85%-115%.



## Έλεγχος δραστικής



- Φασματοφωτομετρία Υπεριώδους
- Φασματοφωτομετρία Υπερύθρου
- Υγρή / Αέρια Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

- Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)
- Φασματοσκοπία RAMAN
- Υγρή ή αέρια χρωματογραφία συνδεδεμένη σε σειρά με ανιχνευτή Μαζών (GC or LC/MS)
- Ατομική απορρόφηση / εκπομπή



## Πηγές προσμίξεων φαρμακευτικού σκευάσματος

- ❖ Σωματίδια από ατμόσφαιρα, μηχανές, συσκευές, συσκευασία
- ❖ Προσμίξεις από έκδοχα
- ❖ Διασταυρούμενη επιμόλυνση από προηγούμενη παραγωγή
- ❖ Μικροβιακή επιμόλυνση
- ❖ Αντίδραση δραστικής με έκδοχα

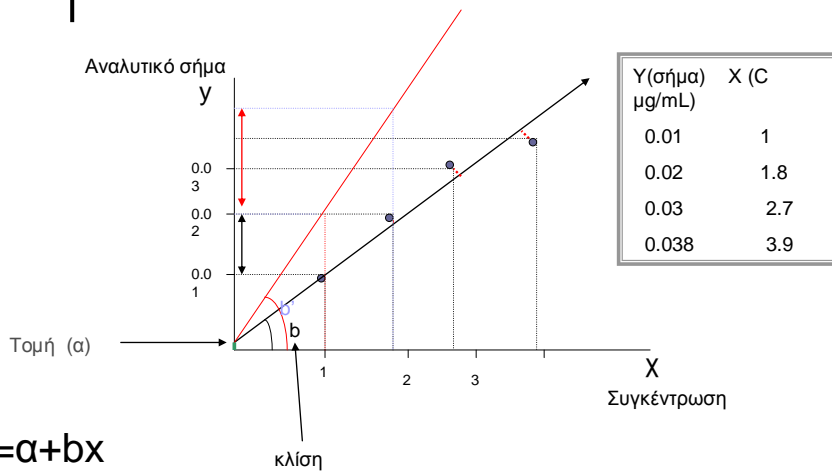
# Χαρακτηριστικά ποιότητας ενόργανων μεθόδων ανάλυσης

- Ισχύς μεθόδου
- Αξιοπιστία μεθόδου (ακρίβεια , πιστότητα)
- Αναλυτικό λευκό (Blank)
- Όριο ανίχνευσης, LOD(Limit of Detection) ➔  $\chi - \chi_b = 3S_b$
- Όριο ανίχνευσης, LOQ(Limit of Quantitation) ➔  $\chi - \chi_b = 10S_b$
- Ανθεκτικότητα: *Ελέγχει την αξιοπιστία σε διακυμάνσεις της μεθόδου* (Robustness)
- Εκλεκτικότητα (Selectivity): *εκφράζει την μέγιστη συγκ. παρουσίας προσμίξεων (σφάλμα 5%)*
- Αναλυτική περιοχή συγκεντρώσεων (Range) *70-130% της δηλούμενης περιεκτικότητας*
- Ευαισθησία μεθόδου
- Γραμμικότητα

## Εφαρμογές HPLC σε ποσοτικές αναλύσεις φαρμάκων

- Αναλύσεις βασισμένες σε βαθμονόμηση με εξωτερικό πρότυπο πολλών σημείων (εύρος  $\pm 20\%$ ,  $r > 0.99$ )
- Ανάλυση με βαθμονόμηση με εξωτερικό πρότυπο ενός σημείου
- Ανάλυση με βαθμονόμηση ενός σημείου και εσωτερικό πρότυπο
- Ανάλυση με βαθμονόμηση πολλών σημείων και εξωτερικό πρότυπο
- Ανάλυση με εκχύλιση

# Καμπύλη αναφοράς



$$y = \alpha + bx$$

Όπου το  $\alpha$  δηλώνει το σφάλμα της μεθόδου

Το  $b$  δηλώνει την ευαισθησία

# Χαρακτηριστικά καμπύλης αναφοράς

$$y = \alpha + bx$$

Κλίση:

$$b = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

Y(σήμα)	X (C μg/mL)
0.604	0.8
0.736	1,0
0.931	1.2
0.766	1.0
mean	

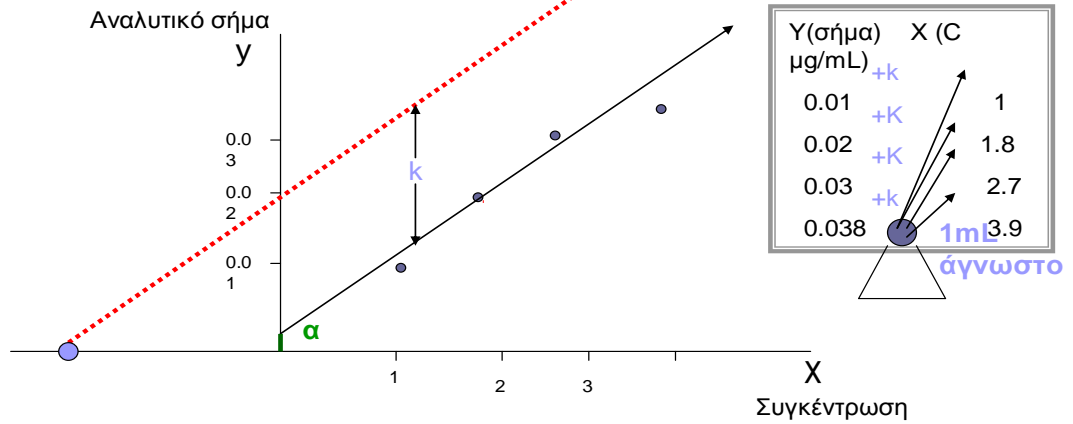
Τομή:  $\alpha = y - bx$  Επιθυμητή η ελάχιστη τιμή

Συντελεστής  
συσχέτισης

$$r = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_i [(x_i - \bar{x})^2] \sum_i [(y_i - \bar{y})^2]}}$$

Τείνει στη 1

# Προσθετική μέθοδος

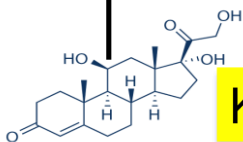


$y = \alpha + bx$  (κανονική καμπύλη αναφοράς που περιέχει το σφάλμα μεθόδου)

$y = k + \alpha + bx$  (καμπύλη προσθετικής που περιέχει και το σφάλμα της μεθόδου)

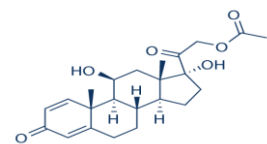
$y = k + bx$  (καμπύλη προσθετικής δίχως το σφάλμα) για  $y=0$  έχουμε  $0 = k + bx$  ή  $x = -k/\beta$

## Εσωτερική πρότυπος ουσία



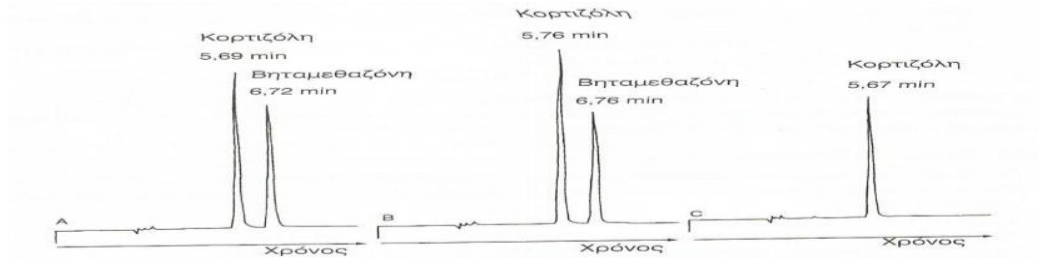
Κορτιζόλη

Οξική πρεδνισολόνη:



- ανήκει στην κατηγορία των κορτικοστεροειδών ορμονών.
- έχει ανάλογη χημική δομή.
- παρουσιάζει παραπλήσιες φυσικοχημικές ιδιότητες.
- παρουσιάζει παρόμοια χρωματογραφική συμπεριφορά.
- δεν εκλούεται σε χρόνο πολύ διαφορετικό από αυτόν της προσδιοριζόμενης ουσίας.
- δεν βρίσκεται στα προς ανάλυση δείγματα.

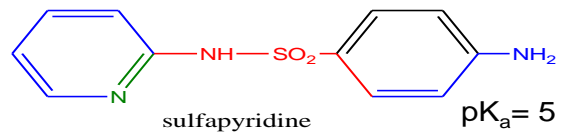
# Εφαρμογές



$$\text{Ποσότητα κορτιζόλης στο δείγμα} = \frac{\text{Παράγων απόκρισης για άγνωστο δείγμα}}{\text{Παράγων απόκρισης για πρότυπο}} \times \text{Ποσότητα κορτιζόλης στο πρότυπο}$$

Παράγων απόκρισης = Εμβαδόν ατροπίνης/εμβ. εσωτερικής προτύπου

# Εκχύλιση



## ➤ Σε δισκίο (στερεού-υγρού)

Συνήθως η ουσία ιονίζεται στο κατάλληλο pH (όξινο) και παραλαμβάνεται με υδατικό διαλύτη

## ➤ Σε υδρόφιλο σιρόπι (υγρού-υγρού)

Συνήθως η ουσία διατηρείται σε μη ιονισμένη μορφή pH (αλκαλικό) και παραλαμβάνεται με οργανικό μη πολικό διαλύτη που δεν αναμιγνύεται με το σιρόπι

## ➤ Σε αλοιφή (στερεού-υγρού)

Συνήθως η ουσία ιονίζεται στο κατάλληλο pH (όξινο) και παραλαμβάνεται με πολικό οργανικό ή υδατικό διαλύτη





## Συντελεστής Αραίωσης

$$\Sigma.A. = \frac{\text{αρχική συγκέντρωση δάγματος}}{\text{τελική συγκέντρωση δάγματος}} = \frac{\text{όγκος (τελικής) φιάλης(ml)}}{\text{ml σιφώνιου}}$$

Π.χ. Διάλυμα προς έγχυση που περιέχει 0.95% w/v NaCl αραιώθηκε με νερό (10mL στα 250mL , 10mL στα 200mL) και μετρήθηκε ως προς το Na με φλογοφωτομετρία. Βρέθηκε ότι περιέχει 0.74mg Na /100mL. Υπολογίστε α) την %w/v περιεκτικότητα NaCl β) το % της δηλούμενης περιεκτικότητας NaCl. Ατομικά βάρη: Na=23, Cl=35.5

Συντ. αραίωσης = 25 X 20 = 500

Αρχ. Συγκ. Na = Τελική Συγκ. Na X Συντελ. Αραίωσης = 0.74mg Na /100mL X 500 = 370mg Na /100mL

Στα 58.5mg/100mL Na Cl περιέχονται 23mg/100mL Na

Στα X mg/100mL Na Cl περιέχονται 370mg/100mL Na

X=941 mg/100mL ή 0,941g/100mL

---

Αν τα 0.95gr/100mL ισοδυναμούν με το 100%, τα 0.941g/100mL θα ισοδυναμούν με το 98.9%



## Μονάδες μέτρησης

- %v/v, 30:70 (mL)
- %w/w 30:70 (gA/100g B)  
π.χ 10mg/g = 0.01g/g = 1g/100g = 1%w/w
- %w/v (g/100mL)
- ppm 1μέρος A/1000000μέρη B  
π.χ 2μg στα 3g = 2μg στα 3.000.000μg = 2/3μg στα 1000000μg = 2/3ppm  
π.χ 1ppm = 1g στα 1000000g = 1/10000g στα 100g  
= 0.0001g/100g = 0.0001%w/w
- Molarity Molar ή M = MBg/L  
mMolar ή mM = MBmg/L ή MBμg/mL  
μMolar ή μM = MBμg/L ή MBng/mL



## Έρευνα στον τομέα ανάπτυξης νέων προϊόντων



- A) Σύνθεση πρωτότυπης δραστικής/ σκευάσματος
- B) Έρευνα για διαμόρφωση γενόσημου



## Δραστηριότητες



- τη σύνθεση καινούργιας δραστικής
- τη μορφοποίηση σκευάσματος
- τον έλεγχο κλινικών δοκιμών (πειραματόζωα, εθελοντές), καταγραφή ανεπιθύμητων ενεργειών

➤ την **ανάλυση**

οΠροσδιορισμό δραστικής

οΒιοισοδυναμία / Βιοδιαθεσιμότητα

➤ την έγκριση του φακέλου ( ΕΟΦ, EMA)