

ΜΗ ΚΑΤΑΣΤΡΟΦΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΟΣ ΠΙΠΕΡΑΚΙΛΛΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΑΖΟΜΠΑΚΤΑΜΗΣ ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΑΝΑΣΥΣΤΑΣΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ RAMAN**I. Χρυσικού^{1,2,*}, Μ. Όρκουλα^{1,2}, Χ. Κοντογιάννης^{1,2}**¹Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα, Ελλάδα²Ινστιτούτο Επιστημών Χημικής Μηχανικής, Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΕΧΜΗ/ΙΤΕ), Πάτρα, Ελλάδα(*ioannach94@gmail.com)**ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Στην παρούσα εργασία, αξιοποιήθηκε η αναλυτική τεχνική της φασματοσκοπίας σκέδασης Raman, με στόχο τον ασηπτικό (χωρίς την έκθεση του δείγματος στην ατμόσφαιρα) ποιοτικό και ποσοτικό έλεγχο σκευάσματος πιπερακιλλίνης και ταζομπακτάμης μέσα από τον υάλινο περιέκτη του, πριν και μετά το στάδιο της ανασύστασης της αρχικής λυόφιλης κόνεως αυτού. Πριν τη ανασύσταση, με τη χρήση οπτικής ίνας φορητού φασματόμετρου Raman, λήφθηκε το φάσμα της κόνεως εμπορικού σκευάσματος πιπερακιλλίνης και ταζομπακτάμης, περιεκτικότητας 89% w/w στη μεν πρώτη και 11% w/w στη δε δεύτερη, εξωτερικά του αρχικού υάλινου περιέκτη και το φάσμα συγκρίθηκε με τα φάσματα των καθαρών δραστικών. Για την ταυτοποίηση των δύο δραστικών χρησιμοποιήθηκε η κορυφή της πιπερακιλλίνης στους 1003 cm^{-1} και της ταζομπακτάμης (ως ώμος) στους 625 cm^{-1} . Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανασύσταση του λυόφιλου σκευάσματος και λήφθηκαν τα φάσματα Raman του υγρού σκευάσματος μέσα από τον υάλινο περιέκτη. Έγινε εφικτή η ποσοτικοποίηση μόνο της πιπερακιλλίνης με χρήση καμπύλης βαθμονόμησης. Το όριο ανίχνευσης της πιπερακιλλίνης στο υγρό σκεύασμα με αυτή τη μέθοδο βρέθηκε να είναι ίσο με 2 mg/mL .

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πολλές φορές υπάρχει ανάγκη τόσο για τον ποιοτικό όσο και για τον ποσοτικό έλεγχο σκευασμάτων, τα οποία χορηγούνται στο περιβάλλον των νοσοκομειακών φορέων. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στα ενδοφλεβίως χορηγούμενα σκευάσματα λόγω του ότι τα τελευταία εισέρχονται άμεσα στην κεντρική κυκλοφορία. Κατ' αυτόν τον τρόπο είναι δυνατόν να προλαμβάνονται τυχόν λάθη που αφορούν είτε στην επιλογή λάθους σκευάσματος, είτε στην προετοιμασία λάθους συγκέντρωσης-δόσης^[1].

Πολλά σκευάσματα κυκλοφορούν σε μορφή κόνεως και πριν τη χορήγησή τους πρέπει να γίνει ανασύσταση με την προσθήκη είτε νερού είτε φυσιολογικού ορού (NaCl 0.9%). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το γενόσημο σκεύασμα πιπερακιλλίνης και ταζομπακτάμης. Η αναλογία των δύο δραστικών συστατικών στο σκεύασμα είναι 8:1 κατά μάζα. Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για το συνδυασμό ενός β-λακταμικού αντιβιοτικού (πιπερακιλλίνη) και ενός αναστολέα των β-λακταμασών (ταζομπακτάμη). Η φαρμακοτεχνική του μορφή είναι κόνις για ενέσιμο διάλυμα, ενώ τα δραστικά συστατικά είναι σε μορφή αλάτων του νατρίου. Το σκεύασμα δεν περιέχει έκδοχα.

Προσπάθειες για τον ταυτόχρονο ποιοτικό και ποσοτικό έλεγχο των 2 δραστικών έχουν αναφερθεί, κυρίως μέσω της χρήσης χρωματογραφικών τεχνικών (HPLC), που είναι χρονοβόρες, καταστρεπτικές για το δείγμα αλλά και με υψηλό κόστος^[2-4]. Η φασματοσκοπία UV έχει επίσης χρησιμοποιηθεί, όμως η εφαρμογή της ήταν σχετικά πολύπλοκη και εξίσου καταστρεπτική για το δείγμα^[5]. Η φασματοσκοπία Raman, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία και στο παρελθόν για τον έλεγχο σκευασμάτων στις αρχικές συσκευασίες, όπως σε δισκία αλλά και υγρά σκευάσματα, αξιοποιήθηκε σε αυτήν την εργασία, αρχικά για την ταυτοποίηση των επιμέρους δραστικών συστατικών, πιπερακιλλίνης και ταζομπακτάμης, της ξηράς κόνεως του σκευάσματος, χωρίς την αφαίρεσή της από τον αρχικό υάλινο περιέκτη και στη συνέχεια για τον ποσοτικό

προσδιορισμό της πιπερακιλλίνης μετά την ανασύσταση. Στο στάδιο αμέσως μετά την ανασύσταση δεν ήταν δυνατή η ποσοτικοποίηση της ταζομπακτάμης μέσα από τον υάλινο περιέκτη, εξαιτίας της χαμηλής περιεκτικότητάς της στο σκεύασμα σε σύγκριση με την πιπερακιλλίνη (αναλογία μαζών 1:8) και επομένως της ισχυρής επικάλυψης των κορυφών της από τις κορυφές της κύριας υπάρχουσας δραστικής.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Χημικές Ουσίες-Αντιδραστήρια: Οι καθαρές δραστικές ουσίες, πιπερακιλλίνη και ταζομπακτάμη, προμηθεύτηκαν από την εταιρεία προμηθειών Glentham Life Sciences του Ηνωμένου Βασιλείου, ενώ το γενόσημο εμπορικό σκεύασμα αυτών και ο φυσιολογικός ορός (NaCl 0.9%) από την Ελληνική εταιρεία Ιατροτεχνολογικού Εξοπλισμού, Aenorasis S.A.

Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων για ποσοτικοποίηση της πιπερακιλλίνης: Παρασκευάστηκαν 5 διαλύματα του εμπορικού σκευάσματος πιπερακιλλίνης και ταζομπακτάμης, σε NaCl 0.9%, ώστε να κατασκευαστεί καμπύλη βαθμονόμησης για την ποσοτικοποίηση της πιπερακιλλίνης. Αρχικά, έγινε ανασύσταση της λυόφιλης κόνεως με προσθήκη φυσιολογικού ορού (σύμφωνα με το φύλλο οδηγιών χρήσης), με τη βοήθεια σύριγγας μέσα από το ελαστικό πώμα του περιέκτη, ώστε να προκύψει το ένα από τα 5 πρότυπα διαλύματα, συγκέντρωσης 200 mg/mL σε πιπερακιλλίνη. Τα υπόλοιπα διαλύματα προήλθαν από διαδοχικές αραιώσεις του αρχικού διαλύματος μέσα στον περιέκτη και είχαν συγκεντρώσεις 177.8, 133.3, 88.9 και 44.4 mg/mL.

Παρασκευή διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων πιπερακιλλίνης για τον προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης (LOD): Χρησιμοποιήθηκε το προαναφερθέν πρότυπο διάλυμα με συγκέντρωση πιπερακιλλίνης 44.4 mg/mL, το οποίο είχε παρασκευασθεί για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης. Από αυτό, μέσω διαδοχικών αραιώσεων με φυσιολογικό ορό, προέκυψαν διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης πιπερακιλλίνης, των 8, 4, 2 και 1 mg/mL, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του ορίου ανίχνευσης της δραστικής στο υγρό σκεύασμα με αυτή τη μέθοδο.

Οργανολογία: Χρησιμοποιήθηκε φορητό φασματόμετρο Raman (i-Raman Plus, B&WTEK, USA), με διεγείρουσα δέσμη λέιζερ στα 785 nm.

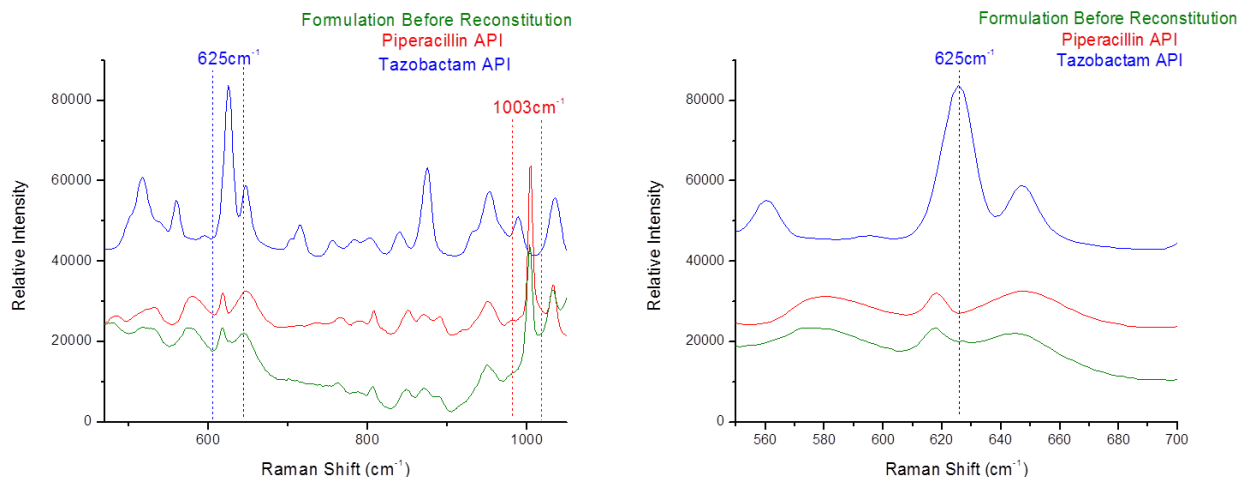
Λήψη Φασμάτων: Η λήψη των φασμάτων έγινε με τη χρήση της οπτικής ίνας του φορητού Raman. Συγκεκριμένα, με κατάλληλη ρύθμιση της απόστασης της οπτικής ίνας από το εξωτερικό του υάλινου περιέκτη, επετεύχθη εστίαση της δέσμης λέιζερ στο εσωτερικό του. Η αρχική ξηρά κόνις του σκευάσματος, καθώς και κάθε πρότυπο διάλυμα μετρούταν κατ' αυτόν τον τρόπο 6 φορές, από 6 διαφορετικές περιοχές του περιέκτη, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η επίδραση πιθανών διαφοροποιήσεων της μορφολογίας του, όπως πάχος και πυκνότητα υάλου, στην εξαγωγή των αποτελεσμάτων. Ο αριθμός των σαρώσεων ανά μέτρηση ήταν 5, ο χρόνος σάρωσης αντιστοιχούσε στα 20 s και η ισχύς του λέιζερ στα 280 mW.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ταυτοποίηση των δραστικών συστατικών

Λήφθηκαν τα φάσματα Raman της κόνεως του σκευάσματος μέσα από τον υάλινο περιέκτη πριν την ανασύσταση, καθώς και τα φάσματα των καθαρών δραστικών πιπερακιλλίνης και ταζομπακτάμης σε επιχρυσωμένο πλακίδιο υψηλής ανακλαστικότητας (Σχήμα 1, αριστερά), ώστε να ταυτοποιηθούν οι κορυφές που αντιστοιχούν στις επιμέρους δραστικές ουσίες. Όπως είναι εμφανές, στο φάσμα του σκευάσματος, η κορυφή στους 1003 cm^{-1} αντιστοιχεί στην πιπερακιλλίνη, ενώ ο ώμος στην περιοχή των 625 cm^{-1} , ο οποίος δεν υπάρχει στο φάσμα της

καθαρής πιπερακιλλίνης, φανερώνει την παρουσία της ταζομπακτάμης στο σκεύασμα (Σχήμα 1, δεξιά).

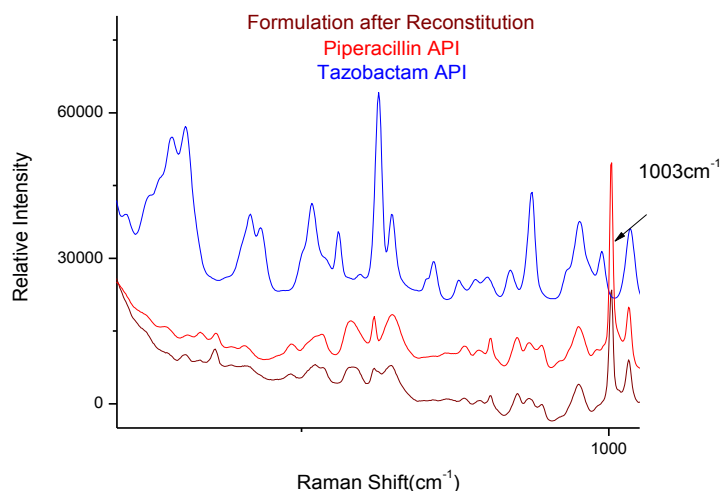


Σχήμα 1. Φάσματα Raman της καθαρής δραστικής πιπερακιλλίνης (κόκκινη γραμμή), της καθαρής δραστικής ταζομπακτάμης (μπλε γραμμή) και του εμπορικού σκευάσματος περιεκτικότητας 89% w/w σε πιπερακιλλίνη και 11% w/w σε ταζομπακτάμη (πράσινη γραμμή), στην περιοχή κυματαρίθμων από 470 έως 1050 cm^{-1} (αριστερά) και σε μεγέθυνση από τους 550 έως 700 cm^{-1} (δεξιά).

Ποσοτικοποίηση της πιπερακιλλίνης

Στο στάδιο μετά την ανασύσταση του σκευάσματος, δεν ήταν δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός της ταζομπακτάμης στο υγρό σκεύασμα μέσα από τον υάλινο περιέκτη, εξαιτίας της μικρής περιεκτικότητας της δραστικής αυτής στην αρχική ξηρά κόνι, επομένως και της μικρής συγκέντρωσής της στο ανασυσταθέν διάλυμα του σκευάσματος, συγκριτικά με αυτήν της πιπερακιλλίνης (οκταπλάσια συγκέντρωση από την ταζομπακτάμη). Αυτή η μεγάλη διαφορά στις συγκεντρώσεις ήταν υπεύθυνη για την ισχυρή επικάλυψη των κορυφών της ταζομπακτάμης από αυτές της πιπερακιλλίνης.

Στο φάσμα Raman του υγρού μέσα από τον περιέκτη, είναι εμφανής η χαρακτηριστική κορυφή της πιπερακιλλίνης στους 1003 cm^{-1} (Σχήμα 2), η οποία και επιλέχθηκε για την ποσοτικοποίηση της κύριας δραστικής του σκευάσματος.



Σχήμα 2. Φάσματα Raman της καθαρής δραστικής πιπερακιλλίνης (κόκκινη γραμμή), της καθαρής δραστικής ταζομπακτάμης (μπλε γραμμή) και του εμπορικού σκευάσματος, συγκέντρωσης 200 mg/mL σε πιπερακιλλίνη, μέσα από τον υάλινο περιέκτη αμέσως μετά την ανασύσταση (καφέ γραμμή).

Καμπύλη Βαθμονόμησης

Η εξίσωση που περιγράφει την ένταση της σκέδασης Raman εξαρτάται από ποικιλία παραγόντων και μπορεί να παρουσιασθεί ως εξής:

$$I_{\nu} = I_0 K_{\nu} C \quad (1)$$

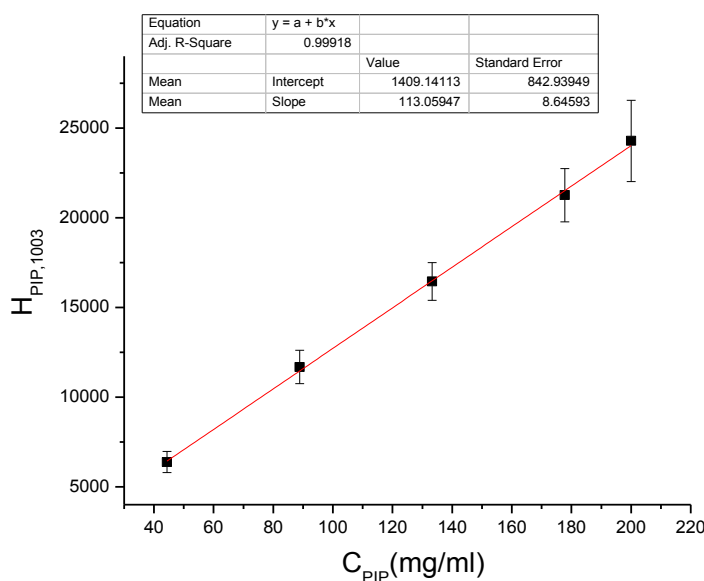
όπου I_0 είναι η ένταση της διεγείρουσας δέσμης λέιζερ, ν είναι η μετατόπιση Raman και K_{ν} είναι μία σταθερά που εξαρτάται από την απόκριση του φασματόμετρου, την αυτοαπορρόφηση του μέσου και τις ιδιότητες σκέδασης των μορίων του αναλύτη, ενώ C είναι η συγκέντρωση των σκεδαζόντων κατά Raman μορίων.

Για την ποσοτικοποίηση της πιπερακιλλίνης στο σκεύασμα του ενδιαφέροντός μας υπολογίσθηκε η ένταση (ύψος) της χαρακτηριστικής κορυφής της πιπερακιλλίνης στους 1003 cm^{-1} , ύστερα από αφαίρεση του υποβάθρου. Με βάση την εξίσωση (1), το ύψος της κορυφής σκέδασης της πιπερακιλλίνης (PIP) στους 1003 cm^{-1} , έναντι της συγκέντρωσης της δραστικής παρουσιάζεται ως εξής:

$$H_{PIP}^{1003} = I_0 K_{PIP}^{1003} C_{PIP} \quad (2)$$

Με αξιοποίηση του κατάλληλου λογισμικού (OriginPro[®] 8) ενσωματώθηκαν στην εξίσωση (2) οι τιμές του ύψους της κορυφής στους 1003 cm^{-1} όλων των προτύπων διαλυμάτων και με βάση τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων κατασκευάστηκε καμπύλη βαθμονόμησης (Σχήμα 3), με γραμμική απόκριση που περιγράφεται από την εξίσωση:

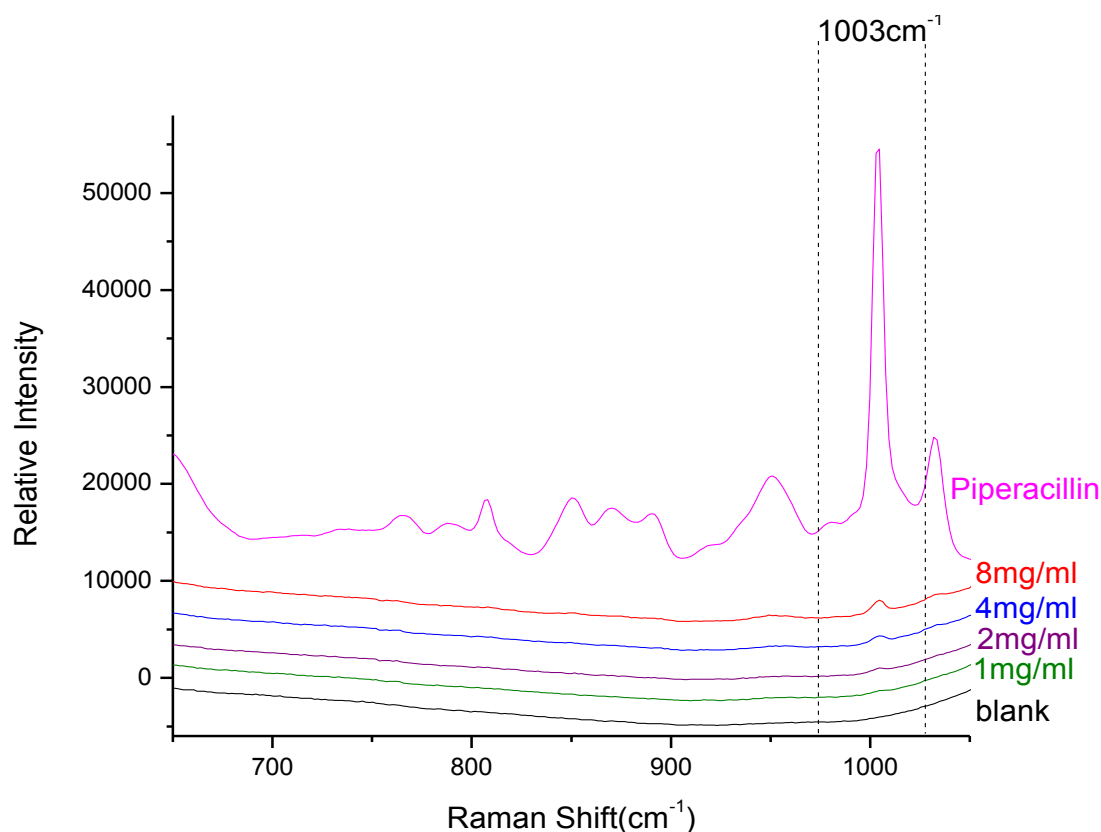
$$H_{PIP}^{1003} = \{113.06(\pm 8.65)\}C_{PIP} + \{1409.14(\pm 842.94)\}, R^2=0.99918 \quad (3)$$



Σχήμα 3. Καμπύλη βαθμονόμησης για την ποσοτικοποίηση της πιπερακιλλίνης στο υγρό σκεύασμα μέσα από τον υάλινο περιέκτη, αμέσως μετά το στάδιο της ανασύστασης.

Όριο Ανίχνευσης Πιπερακιλλίνης (LOD)

Για τον προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης λήφθηκαν τα φάσματα των διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης πιπερακιλλίνης που παρασκευάστηκαν, των 8, 4, 2 και 1 mg/mL, καθώς και το φάσμα του φυσιολογικού ορού NaCl 0.9% (τυφλό δείγμα), μέσα από τον υάλινο περιέκτη (Σχήμα 4). Λαμβάνοντας υπ' όψιν την χαρακτηριστική κορυφή της πιπερακιλλίνης στους 1003 cm^{-1} και με βάση τη μέθοδο της οπτικής αξιολόγησης^[6], προσδιορίσθηκε το όριο ανίχνευσης (LOD) της δραστικής με τη συγκεκριμένη μεθοδολογία, το οποίο εκτιμάται να είναι ίσο με 2 mg/mL.



Σχήμα 4. Φάσματα Raman της καθαρής δραστικής πιπερακιλλίνης (ροζ γραμμή), του τυφλού δείγματος μέσα από τον υάλινο περιέκτη (μαύρη γραμμή), καθώς και των γνωστών διαλυμάτων πιπερακιλλίνης μέσα από τον περιέκτη, συγκεντρώσεων 8 mg/mL (κόκκινη γραμμή), 4 mg/mL (μπλε γραμμή), 2 mg/mL (μωβ γραμμή) και 1 mg/mL (πράσινη γραμμή).

Έλεγχος Ακρίβειας

Για τον έλεγχο της ακρίβειας των εξαγόμενων αποτελεσμάτων, παρασκευάστηκε ένα διάλυμα του σκευάσματος, με συγκέντρωση πιπερακιλλίνης 71.1 mg/mL και λήφθηκε το φάσμα του με τον ίδιο τρόπο που έγινε και με τα πρότυπα διαλύματα, ώστε να συγκριθεί η εξαγόμενη μέσω της καμπύλης βαθμονόμησης συγκέντρωση με την πραγματική τιμή της. Η συγκέντρωση του αγνώστου διαλύματος υπολογίστηκε ίση με (72.6±1.6) mg/mL και το σχετικό σφάλμα μεταξύ της πειραματικής και της θεωρητικής τιμής βρέθηκε ίσο με 2.2%.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η φασματοσκοπία Raman αξιοποιήθηκε επιτυχώς για τον ποιοτικό προσδιορισμό των επιμέρους δραστικών συστατικών της αρχικής ξηράς κόνεως, πιπερακιλλίνης και ταζομπακτάμης, μέσα από τον υάλινο περιέκτη πριν την ανασύσταση του σκευάσματος. Επιπρόσθετα, κατέστη δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός μόνο για την κύρια δραστική αυτού, την πιπερακιλλίνη, μέσα από τον περιέκτη αμέσως μετά το στάδιο της ανασύστασης, μιας και η ταζομπακτάμη βρίσκεται σε πολύ χαμηλότερη συγκέντρωση από την πιπερακιλλίνη στο υγρό σκεύασμα και η επικάλυψη των κορυφών της από αυτές της πιπερακιλλίνης είναι ισχυρή. Το όριο ανίχνευσης για την πιπερακιλλίνη με αυτή τη μέθοδο αντιστοιχεί στα 2 mg/mL.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Οι συγγραφείς εκφράζουν θερμές ευχαριστίες προς τον καθηγητή του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Πατρών, κ. Γρ. Σιβολαπέσκο, καθώς και προς τους κ.κ. Γ. Αλεβιζόπουλο και Β. Βασιλακοπούλου από την εταιρεία Aenorasis S.A. για την πολύτιμη βοήθεια τους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] RW. Hicks, SC. Becker. J Infus Nurs 29(1) (2006) 20-27.
- [2] P. Rama. Krishna. Veni, N. Sharmila, K. J. P. Narayana, B. Hari. Babu, P. V. V. Satyanarayana. JPR. 7(1) (2013) 127-131.
- [3] P. N. S. Pai, G. K. Rao, M. S. Murthy, H. Prathibha. Indian. J. Pharm. Sci. 68(6) (2006) 799-801.
- [4] A. Lakshmana. Rao, K. Sai. Krishna, CH. Kiran. Kumar, T. Raja. Inter. J. Pharm. Sci. 3(2) (2011) 134-136.
- [5] M. Inés. Toral, F. Nova-Ramírez, F. Nacaratte. J. Chil. Chem. Soc. 57(2) (2012) 1189-1193.
- [6] ICH Expert Working Group. ICHHT Guideline. Q2(R1) (2005) 11.