

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DARJAN KOŠIR

DIPLOMSKA NALOGA

Univerzitetni študij farmacije

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DARJAN KOŠIR

**STABILNOST IN KOMPATIBILNOST
PROTIBOLEČINSKIH MEŠANIC V ELASTOMERNIH
ČRPALKAH**

**STABILITY AND COMPATIBILITY OF ANALGESIC
ADMIXTURES IN ELASTOMERIC INFUSERS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom izr. prof. dr. Vojka Kmetca in somentorstvom doc. dr. Roberta Roškarja. Protibolečinske mešanice v elastomernih črpalkah sem pripravljaj v aseptičnem prostoru v lekarni Onkološkega inštituta Ljubljana.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojemu mentorju izr. prof. dr. Vojku Kmetcu za vse napotke, strokovne nasvete in pomoč pri izdelavi diplomske naloge. Prav tako gre zahvala doc. dr. Robertu Roškarju, ki me je uvedel v eksperimentalno delo in bil zmeraj pripravljen pomagati in svetovati. Hvala tudi vsem ostalim sodelavcem na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko za nasvete in pomoč.

Velika zahvala gre tudi Moniki Sonc, mag. farm., spec. in Samotu Rožmanu, mag. farm. ter ostalemu osebju lekarne na Onkološkem inštitutu Ljubljana za idejno pobudo diplomske naloge, pomoč pri njeni izvedbi, doniran material in koristne nasvete.

Iskreno se zahvaljujem tudi moji družini, puncu Marjeti in prijateljem za zaupanje, potrpežljivost in podporo v času mojega študija.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelal pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Vojka Kmetca in somentorja doc. dr. Roberta Roškarja.

Darjan Košir

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Mirjana Gašperlin

Član diplomske komisije: doc. dr. Marko Anderluh

Ljubljana, junij 2010

VSEBINA

VSEBINA	I
POVZETEK	III
SEZNAM OKRAJŠAV	IV
1 UVOD	1
1.1 ZDRAVLJENJE BOLEČINE PRI BOLNIKIHZ RAKOM.....	1
1.1.1 Bolečina pri bolnikih z rakom.....	1
1.1.2 Načela zdravljenja bolečine	2
1.1.2.1 Izbira zdravila	2
1.1.2.2 Zdravila za zdravljenje bolečine	2
1.1.2.3 Neželeni učinki zdravljenja z močnimi opioidi.....	3
1.1.2.4 Odmerjanje morfina.....	4
1.1.2.5 Rotacija opioidov.....	5
1.1.2.6 Ostali postopki zdravljenja bolečine.....	5
1.2 PODKOŽNE INFUZIJE ZDRAVIL PRI BOLNIKIHZ RAKOM.....	6
1.2.1 Učinkovine v podkožnih infuzijah	7
1.2.2 Vrste črpalk	8
1.2.2.1 Elastomerne (balonske) črpalke	8
1.3 PRIPRAVA IN UPORABA PROTIBOLEČINSKIH MEŠANIC V ELASTOMERNIH ČRPALKAH ZA PODKOŽNO APLIKACIJO	11
1.3.1 Priprava in postopek polnjenja.....	11
1.3.2 Postopek nastavitve podkožne infuzije.....	14
1.3.3 Negovalni postopki.....	15
1.4 STABILNOST IN KOMPATIBILNOST	15
1.4.1 Stabilnost.....	15
1.4.2 Inkompatibilnost.....	17
1.4.3 Fizikalno-kemijske lastnosti in stabilnost učinkovin	18
1.4.3.1 Morfinijev sulfat	18
1.4.3.2 Natrijev deksametazonfosfat	20
1.4.3.3 Haloperidol	21
1.4.3.4 Ketaminijev klorid	22
1.4.3.5 Lidokainijev klorid.....	23
1.4.3.6 Metoklopramidijev klorid.....	24
1.4.3.7 Midazolam.....	25
1.4.4 Stabilnostne in kompatibilnostne študije	27
1.4.4.1 Stabilnost in kompatibilnost mešanic dveh učinkovin	27
1.4.4.2 Stabilnost in kompatibilnost mešanice treh ali več učinkovin.....	29
1.4.4.3 Stabilnost in kompatibilnost protibolečinskih mešanic v prenosni črpalki	30
2 NAMEN DELA	32
3 MATERIALI IN METODE	33
3.1 MATERIALI.....	33
3.1.1 Zdravila (raztopine za injiciranje)	33
3.1.2 Naprave in pribor.....	34
3.1.3 Topila, raztopine, reagenti	35

3.2 RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA HPLC METODE.....	35
3.2.1 Priprava vodne mobilne faze.....	35
3.2.2 Priprava stresnih vzorcev	37
3.2.3 Razvoj kromatografskih pogojev	38
3.2.4 Končni kromatografski pogoji HPLC metode	39
3.3 VREDNOTENJE HPLC METODE.....	39
3.3.1 Priprava vzorcev za validacijo	39
3.3.2 Vrednotenje validacijskih parametrov HPLC metode.....	41
3.4 STABILNOSTNE IN KOMPATIBILNOSTNE ŠTUDIJE	44
3.4.1 Stabilnostna in kompatibilnostna študija v enodnevnih elastomernih črpalkah	44
3.4.2 Stabilnostna in kompatibilnostna študija v steklenih vsebnikih	46
3.4.3 Preučevanje izhlapevanja vode v enodnevnih elastomernih črpalkah	47
3.4.4 Preučevanje iztekajočih se enodnevnih elastomernih črpalk.....	47
3.4.5 Stabilnostna in kompatibilnostna študija v iztekajočih se sedemdnevnih elastomernih črpalkah in preučevanje le-teh	48
3.4.6 Preučevanje izhlapevanja vode v sedemdnevnih elastomernih črpalkah	49
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	50
4.1 RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA HPLC METODE.....	50
4.2 VREDNOTENJE HPLC METODE.....	57
4.3 STABILNOSTNE IN KOMPATIBILNOSTNE ŠTUDIJE	61
4.3.1 Stabilnostna in kompatibilnostna študija v enodnevnih elastomernih črpalkah	61
4.3.2 Stabilnostna in kompatibilnostna študija v steklenih vsebnikih	64
4.3.3 Preučevanje izhlapevanja vode v enodnevnih elastomernih črpalkah	69
4.3.4 Preučevanje iztekajočih se enodnevnih elastomernih črpalk.....	71
4.3.5 Stabilnostna in kompatibilnostna študija v iztekajočih se sedemdnevnih elastomernih črpalkah in preučevanje le-teh	71
4.3.6 Izhlapevanje vode v sedemdnevnih elastomernih črpalkah.....	74
5 SKLEP.....	75
6 LITERATURA.....	77

POVZETEK

Rakavi bolniki v terminalnem stadiju imajo velikokrat zelo močne bolečine. Za lajšanje bolečine in drugih simptomov se pogosto uporabljajo protibolečinske mešanice v elastomernih črpalkah, ki jih apliciramo podkožno. Take analgetične mešanice so sestavljene iz več zdravilnih učinkovin bodisi iz iste ali različnih terapevtskih skupin. Pripravijo se za vsakega bolnika individualno.

V lekarni Onkološkega inštituta Ljubljana se za izdelavo mešanic najpogosteje uporablja naslednjih sedem učinkovin: morfinijev sulfat, metoklopramid, deksametazonfosfat, ketamin, midazolam, haloperidol in lidokain. Kljub temu da je priprava takih mešanic pogosta in ustaljena praksa, pa podatkov o stabilnosti in kompatibilnosti takih mešanic s toliko učinkovin v literaturi ne najdemo.

Za preučevanje stabilnosti smo razvili stabilnostno indikativno reverzno-fazno HPLC metodo, kjer smo kromatografsko ločili vseh sedem učinkovin in njihove glavne razpadne produkte. Pri tem smo si pomagali tudi s stresnimi vzorci vsake učinkovine. Ustreznost analizne metode smo potrdili z validacijo, kjer smo potrdili ustrezne validacijske parametre (selektivnost, linearnost, natančnost injiciranja, točnost, ponovljivost in robustnost metode). Stabilnost učinkovin smo spremljali v petih različnih mešanicah (mešanica 3, 4, 5, 6 in 7 učinkovin) tekom 28 dni pri treh različnih pogojih. S tem smo preučili vpliv povišane temperature (37°C) in svetlobe na stabilnost mešanice. Celo stabilnostno študijo smo izpeljali dvakrat. Prvič v enodnevnih elastomernih črpalkah, drugič pa v steklenem vsebniku. Pri študiji v steklenem vsebniku smo mešanice tudi vizualno opazovali. Študija v steklenih vsebnikih je pokazala, da je vseh pet mešanic stabilnih in kompatibilnih pri vseh treh pogojih. Pri stabilnostni študiji v enodnevnih črpalkah so koncentracije učinkovin naraščale tekom študije, kar je posledica izhlapevanja vode skozi cevko črpalke. Opravili smo tudi stabilnostno študijo z mešanico petih učinkovin v sedemdnevni elastomerni črpalki, ki se je praznila pri istih pogojih kot v prejšnjih dveh študijah. Mešanica je bila stabilna ves čas praznjenja. Izhlapevanje vode je bilo v sedemdnevni črpalkah zanemarljivo majhno. Midazolam se je adsorbiral na vsebnik tako v enodnevni kot v sedemdnevni črpalki. To predstavlja inkompatibilnostni problem, saj se je pri 37°C v enodnevni črpalki v enem dnevu adsorbiralo 15,8% učinkovine, pri sedemdnevni črpalki pa tudi pri 37°C ni preseglo 10% adsorpcije. Pretoki vseh testiranih enodnevnih in sedemdnevni črpalk odstopajo od specificiranega pretoka za več kot je dovoljeno ($\pm 10\%$).

SEZNAM OKRAJŠAV

37°C	pogoj shranjevanja: tema, temperatura 37°C in 40% relativna vlažnost
ACN	acetonitril
c	koncentracija
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (High Performance Liquid Chromatography)
hv	pogoj shranjevanja: dnevna svetloba, sobna temperatura (22–26°C) in 36–44% relativna vlažnost
IASP	Mednarodno združenje za proučevanje bolečine (International Association for the Study of Pain)
ICH	Mednarodna konferenca o harmonizaciji (International Conference on Harmonisation)
LAF	laminarni pretok zraka (laminar air flow)
logP	porazdelitveni koeficient
M	molarost [mol/L]
MF	mobilna faza
Mr	molekulska masa
p.a.	za analizo (pro analysi)
pKa	konstanta ionizacije
PVC	polivinil klorid
RSD	relativni standardni odklon
SD	standardni odklon
ST	pogoj shranjevanja: tema, sobna temperatura (22–26°C) in 36–44% relativna vlažnost
T _t	temperatura tališča
UV	ultravijolično
V	volumen
VAS	vizualno analogna lestvica
V _{inj}	volumen injiciranja

1 UVOD

1.1 ZDRAVLJENJE BOLEČINE PRI BOLNIKIH Z RAKOM

1.1.1 Bolečina pri bolnikih z rakom

Bolečina je po definiciji Mednarodnega združenja za proučevanje bolečine (IASP) neprijetna čutna in čustvena zaznava, povezana z dejansko ali potencialno poškodbo tkiva (1). Daleč najpogostejši vzrok za bolečino pri rakavih bolnikih je rak sam. Ostali vzroki za bolečino so lahko povezni z rakom (npr. zaprtje, mišični spazem), povezani z zdravljenjem raka (npr. s kemoterapijo povzročen mukozitis), povzročeni s sočasnimi motnjami (npr. osteoartritis). Rak lahko povzroči bolečino zaradi vraščanja v okoljna mehka tkiva, pritiska na živec, poškodbe živca, razširjanja v kostno tkivo in v visceralne predele ali povečanega intrakranialnega tlaka (2). Bolnik z rakom ima pogosto močno in kronično bolečino, saj je povezana z resno boleznijo, ki močno ogroža njegovo življenje. Bolečina je prisotna pri približno eni četrtini bolnikov z novo diagnosticirano rakavo boleznijo in pri treh četrtinah bolnikov z napredovalo boleznijo. Z ustreznimi zdravili lahko lajšamo bolečino pri 80 do 90% bolnikov. Včasih pa je stanje tako hudo, da bolečine z zdravili ne moremo ustrezno nadzirati (največkrat gre za nevropatsko bolečino). V takih primerih pridejo v poštev druge metode in delo različnih specialistov za lajšanje bolečine (anesteziologi, nevrokirurgi, onkologi ...) (3).

Obvladovanje bolečine je del paliativne oskrbe. Paliativna oskrba je aktivna celostna oskrba bolnika z napredovalo boleznijo, ki se ne odziva več na kurativno zdravljenje. Poleg nadziranja bolečine spada sem tudi obvladovanje drugih motečih simptomov ter lajšanje socialnih, psihičnih in duhovnih težav bolnika ter njegovih bližnjih. Cilj paliativne oskrbe je doseči za bolnika najboljšo možno kvaliteto življenja v dani situaciji in trenutku ter ohranjanje čim večje samostojnosti bolnika. Paliativna oskrba je najbolj učinkovita, ko v njej sodelujejo strokovni delavci iz različnih strok. Ta tim lahko sestavljajo zdravniki, medicinske sestre, fizioterapevt, delovni terapevt, socialni delavec, psiholog, klinični farmacevt, duhovnik in prostovoljci (4).

Merjenje jakosti bolečine lahko poteka na več načinov. Najbolj pogosta je uporaba vizualne analogne lestvice (VAS). Jakost bolečine bolnik oceni tako, da na lestvici od 1 do 10 označi, kako močna je bolečina. Obstajajo pa tudi različni vprašalniki o bolečini in vplivu bolezni na življenjske sposobnosti bolnika. Poznavanje jakosti bolečine je v klinični

praksi zelo pomembno, saj lahko le tako uspešno določimo terapijo in spremljanje le-te (5,6).

Cilji protibolečinskega zdravljenja so: v najkrajšem možnem času doseči, da bolnik nima hujših bolečin ($VAS \leq 3$), da ima bolnik čim manj neželenih učinkov zdravljenja in izboljšanje kakovosti življenja pri bolniku.

1.1.2 Načela zdravljenja bolečine

1.1.2.1 Izbira zdravila (2, 3, 6)

Svetovna zdravstvena organizacija je opredelila način zdravljenja z rakom povzročene bolečine s pomočjo tristopenjske lestvice. Protibolečinsko zdravljenje uvajamo glede na jakost bolečine. V prvi stopnji pri blagi bolečini (VAS 1–3) bolnik dobi neopioidni analgetik in po potrebi še dodatna zdravila. Če je bolečina srednje močna (VAS 4–7) – druga stopnja, zdravimo bolnika s šibkim opioidom. Po potrebi lahko dobi še neopioidni analgetik in dodatna zdravila. V tretji stopnji, ko je bolečina zelo močna (VAS 8–10), dobi bolnik močan opioid ter po potrebi še neopioidni analgetik in dodatna zdravila. Zaradi novih spoznanj v paliativni medicini so bila oblikovana sodobna priporočila. Ta se od tradicionalne tristopenjske lestvice razlikujejo v naslednjih dejanjih:

- direktni prehod iz neopioidov na močne opioide zaradi pričakovanega hitrega stopnjevanja bolečine (opustitev druge stopnje),
- poleg odmerjanja v rednih časovnih intervalih se doda še rešilni odmerek kratkodelujočega opioida za prebijajočo bolečino,
- rotiranje opioidov.

1.1.2.2 Zdravila za zdravljenje bolečine (1, 3, 6)

NEOPIODNI ANALGETIKI

Z njimi zdravimo blago bolečino. Njihova značilnosti je, da imajo učinek zgornje meje. To pomeni, da z večanjem odmerka nad zgornjo mejo ne povečajo protibolečinskega delovanja, povzročajo pa hujše neželene učinke. Kadar jih dodamo opioidom, potrebujemo manjše odmerke opioidov ob enakem protibolečinskem delovanju.

Razdelimo jih v dve kategoriji:

1. nesteroidni antirevmatiki (npr. acetilsalicilna kislina, diklofenak, ketoprofen),
2. ostali neopioidi (npr. paracetamol, metamizol natrij).

OPIOIDNI ANALGETIKI

Opioidni analgetiki so vsa zdravila, ki imajo morfinu podobno delovanje na opioidnih receptorjih. Delimo jih na dve skupini glede na jakost:

1. šibki opioidi (npr. tramadol, kodein),
2. močni opioidi (npr. morfin, metadon, fentanil).

Opioidni analgetiki za razliko od neopioidnih nimajo učinka zgornje meje. Pri šibkih opioidih upoštevamo največje dnevne odmerke, ki jih določajo njihovi neželeni učinki. Pri močnih opioidih pa ni določenega največjega dnevnega odmerka. Odmerjanje močnega opioida določimo glede na individualno reagiranje posameznika. Pravi odmerek morfina in ostalih močnih opioidov je tisti, ki odzame bolečino brez hudih neželenih učinkov.

DODATNA ZDRAVILA S SEKUNDARNIM ANALGETIČNIM UČINKOM

V to skupino spadajo zdravila, ki so registrirana za zdravljenje drugih bolezni, vendar jih lahko uporabljamo pri zdravljenju bolečine v vseh stopnjah rakave bolezni. Ta so:

- antikonvulzivi (karbamazepin, klonazepam), ki so učinkoviti predvsem pri zdravljenju nevropatske bolečine,
- antiaritmiki (meksiletin) za zdravljenje nevropatske bolečine pri bolnikih z rakom,
- triciklični antidepresivi (amitriptilin) za zdravljenje nevropatske bolečine pri bolnikih z rakom,
- kortikosteroidi (deksametazon, metilprednizolon), ki se uporabljajo za lajšanje bolečine zaradi kostnih metastaz, glavobola zaradi povečanega intrakranialnega tlaka, pritiska na hrbtenjačo, periferne živce, pleteže, nateg jetrne kapsule in izboljšajo splošno počutje, apetit, dispnejo,
- lokalni anestetiki (lidokain, bupivakain) za zdravljenje nevropatske bolečine,
- intravenski splošni anestetiki (ketamin) za zdravljenje nevropatske bolečine,
- bisfosfonati (npr. klodronat, alendronat) za lajšanje maligne kostne bolečine,
- klonidin – adrenergični α_2 agonist, ki skupaj z morfijem deluje sinergistično, ko ga apliciramo epiduralno ali intratekalno.

1.1.2.3 Neželeni učinki zdravljenja z močnimi opioidi (1, 3, 6)

Pri bolniku, ki prejema protibolečinsko terapijo z močnim opioidom, se predvsem na začetku zdravljenja lahko pojavijo različni neželeni učinki. Prve dni sta pogosta slabost in

bruhanje. Za lajšanje teh simptomov lahko bolnik jemlje zdravilo z antiemetično učinkovino, kot je na primer metoklopramid. Pri starejših bolnikih se lahko ob jemanju močnih opioidov pojavi tudi zmedenost in neorientiranost. Še eden od neželenih učinkov, ki se bo skoraj zagotovo pojavil, je zaprtje. Najprej poskušamo zaprtje odpraviti z nefarmakološkimi metodami. Če to ne zadošča, pa v terapiji uvedemo tudi redno jemanje odvajal. Lahko se tudi zgodi, da ima bolnik za življenje ogrožajočo zaporo črevesja – ileus. Takrat se opioidi prenehajo jemati. Neželeni učinek je tudi respiratorna depresija oziroma respiratorna odpoved. Še posebej pozorni moramo biti pri bolnikih, ki imajo oslABLJENO respiratorno funkcijo. Če slučajno pride do respiratorne depresije, se bolniku intravensko aplicira morfinski antagonist nalokson. Ostali neželeni učinki so še: srbečica, koprivnica, evforija, nemir in tesnoba, toleranca, lahko tudi odvisnost.

Za večino neželenih učinkov se v nekaj dneh razvije toleranca. Zato je smotrno bolniku to razložiti, da ne bi prenehal jemati zdravila, ker bi si lahko mislil, da mu zdravilo škoduje

Neželene učinke preprečujemo z:

- zmanjšanjem odmerka opioida,
- simptomatskim zdravljenjem neželenih učinkov,
- rotiranjem opioida,
- rotiranjem poti vnosa.

1.1.2.4 Odmerjanje morfina (7)

Pri bolnikih z rakom je za zdravljenje močne bolečine največkrat predpisan morfin, s katerim imamo v klinični praksi največ izkušenj. Stalno in močno bolečino zdravimo s takimi oblikami morfina, ki delujejo dolgo in jih bolnik jemlje redno, ob določeni uri. Pravi odmerek morfina je tisti, ki odvzame bolečino brez hudih neželenih učinkov. Določimo ga s titracijo. Za titracijo pravega odmerka dolgo delujočega morfina (npr. MST) uporabimo kratko delujoči morfin (npr. Servedrol, morfinske kapljice). Začnemo z majhnimi odmerki kratko delujočega morfina, ki jih bolnik jemlje na štiri ure. Če je po 24 urah bolečina še vedno močna, odmerek povečamo. V primeru, da je bolečina po naslednjih 24 urah še vedno prisotna, odmerek zopet povečamo in tako ponavljamo, dokler bolečina ni ustrezno nadzirana. Na koncu odmerek kratko delujočega morfina preračunamo v odmerek dolgo delujočega morfina.

Veliko bolnikov z napredovalim rakom kljub rednemu jemanju zdravil za zdravljenje bolečine, ki vključuje dolgo delujoči morfin, doživlja občasne napade bolečine. Taka

bolečina se imenuje prebijajoča bolečina. Bolnik za lajšanje prebijajoče bolečine poleg dolgo delujočega morfina potrebuje še "rešilni odmerek" kratko delujočega morfina, ki ga lahko vzame po potrebi. Rešilni odmerek predstavlja 5 do 15% dnevnega odmerka morfina.

Pri ukinjanju zdravljenja z močnimi opioidi je potrebno postopoma zmanjševati odmerek, da preprečimo odtegnitveni sindrom.

1.1.2.5 Rotacija opioidov (3)

Farmakogenomske raziskave so pokazale različno odzivnost posameznikov na zdravljenje z različnimi opioidi. Poleg individualnih razlik med bolniki pa na začetek protibolečinskega delovanja, vrh in trajanje analgezije vpliva tudi pot vnosa in izbrana učinkovina. Za zamenjavo opioida se odločimo, če kljub velikim odmerkom izbranega opioida bolečine ne olajšamo, ali če opioid povzroča moteče neželene učinke, kljub njihovemu preprečevanju in zdravljenju. Rotiranje opioidov je smiselno zaradi nepopolne navzkrižne tolerance za analgetične in neželene učinke. Pri menjavi opioida moramo upoštevati primerjalne odmerke opioidov. Novi opioid začnemo uvajati s 30 do 50% manjšim primerjalnim odmerkom starega opioida in nato novi opioid titriramo do želenega kliničnega učinka.

Poleg rotacije različnih opioidnih zdravil pa lahko zamenjamo tudi pot vnosa opioidov. Najbolj primerna pot za zdravljenje kronične bolečine je skozi usta, saj tak način zagotavlja stalno raven zdravila v krvi in ker je tak način za bolnika najbolj preprost in poceni. Če bolnik zdravila ne more zaužiti, je primerna podkožna ali transdermalna aplikacija zdravila. Pri akutnem poslabšanju bolečine dosežemo hiter učinek z dajanjem zdravil v veno. Poznamo še druge poti vnosa opioidnih analgetikov: rektalno, intramuskularno, pod jezik ali na sluznico ustne votline, epiduralno, intratekalno. Pri rotaciji poti vnosa moramo tako kot pri rotaciji opioidov upoštevati ekvivalentne odmerke različnih poti vnosa.

1.1.2.6 Ostali postopki zdravljenja bolečine (3)

Kadar peroralno, subkutano in transdermalno dajanje zdravil bolniku ne olajša bolečine ali nastopajo hudi, moteči neželeni učinki, se poslužimo ostalih specialističnih postopkov zdravljenja bolečine.

ANESTEZIOLOŠKI POSTOPKI

Sem spadajo alternativne poti dajanja analgetikov.

- Blokade perifernih živcev in živčnih korenin z nevromodulacijo in nevrolyzo.
- Dajanje opioidov perispinalno. Dovajanje protibolečinskih učinkovin lahko preko katetra dostavljamo epiduralno ali subarahnoidalno.
- Blokada avtonomnega živčevja.

NEVROKIRURŠKI POSTOPKI

- Nevroablativne metode: kirurška prekinitve živčnih poti za prenos bolečine na nivoju hrbtenjače.
- Nevrostimulativne metode: vstavev elektrod na nivo hrbtenjače in stimulacija živčnih poti, ki so odgovorne za prenos bolečine.

OSTALI KIRURŠKI POSTOPKI

- Dekompresija hrbtenjače: preprečitev nastanka plegije in zmanjšanje bolečine.
- Stabilizacija patoloških zlomov kosti.
- Operacija zapor črevesja: omogoča bolj kakovostno življenje bolnika.

ANTINEOPLASTIČNO ZDRAVLJENJE

- Sistemska kemoterapija pri kemosenzibilnih tumorjih in hormonska terapija pri hormonsko odvisnih tumorjih zmanjšata bolečino.
- Paliativno obsevanje bolečih kostnih metastaz in kompresije hrbtenjače zmanjša bolečino in možnost nevroloških zapletov.

1.2 PODKOŽNE INFUZIJE ZDRAVIL PRI BOLNIKI Z RAKOM

Bolniki z napredovalim rakom in bolniki v terminalnem stadiju bolezni nasploh velikokrat niso zmožni zaužiti zdravila. Razlogi so lahko naslednji: slabost, bruhanje, intestinalna obstrukcija, motnje pri požiranju, malabsorpcija in motnje zavesti. Pri zdravljenju nevropatične bolečine, pa terapija per os lahko ni učinkovita. Za zdravljenje številnih motečih simptomov pri bolnikih z rakom, kot so bolečina, slabost, bruhanje, nemir, strah, težko dihanje, se zato pogosto poslužujemo trajne podkožne infuzije (8).

Kontinuirane podkožne infuzije opioidnih analgetikov so varne in učinkovite za zdravljenje bolečine rakavih bolnikov. Raziskave so pokazale, da kontinuirano podkožno apliciranje morfina izboljša nadzorovanje bolečine in prispeva k manj neželenim učinkom (navzea, sedacija, zaprtje) v primerjavi s peroralnim ali podkožnim bolusnim apliciranjem morfina (9).

Prednosti podkožne infuzije so:

- stalen dotok omogoča stalno koncentracijo zdravila v krvi brez večjih nihanj, kar posledično vodi do manj neželenih učinkov v primerjavi z bolusno aplikacijo zdravil,
- izognemo se pogostemu zbadanju, s tem pa vplivamo na večje ugodje bolnika,
- s kombinacijo več zdravil je mogoče blažiti več simptomov hkrati,
- sistemsko delovanje zdravil omogoča obvladovanje razširjene nevropatske bolečine,
- bolniku omogoča večjo kakovost življenja, ker dopušča zdravljenje na domu, bolnik je bolj mobilni in mu omogoča večjo samostojnost in neodvisnost,
- nadzor je enostaven in ga lahko izvaja poučen bolnik ali njegovi svojci (10).

1.2.1 Učinkovine v podkožnih infuzijah (8, 11)

OPIOIDI

Morfin je glavna učinkovina – zlati standard, ki se uporablja v podkožnih infuzijah in je osnova v protibolečinskih mešanicah za podkožne infuzije. Poleg morfina lahko uporabimo tudi hidromorfon, fentanil, sufentanil in druge opioide. Če se zdravnik odloči za podkožen vnos morfina, mora poznati ekvianalgetične odmerke. Izračunani odmerek morfina danega pod kožo je praviloma trikrat manjši od odmerka morfina danega per os. Ker pa moramo upoštevati individualne razlike med bolniki, je treba ustrezen odmerek morfina iztitrirati. Najbolje je uporabljati morfin v obliki sulfata namesto morfinijevega klorida, ker je njegova kompatibilnost z drugimi zdravili v analgetski mešanici preverjena in ker so na razpolago viala z večjo vsebnostjo učinkovine, kar farmacevtu olajša delo pri pripravi protibolečinske mešanice.

ZDRAVILA ZA LAJŠANJE NEVROPATSKE BOLEČINE

Zaradi vraščanja tumorja v živce in živčne pleteže ali zaradi zdravljenja raka s kemoterapijo, operacijo ali obsevanjem se lahko pri bolniku pojavi nevropatska bolečina. Za zdravljenje le-te opioidni analgetiki ne zadostujejo. Učinkovine, ki se uporabljajo za ta namen, so **ketamin**, **lidokain** in **deksametazon**.

ZDRAVILA ZA LAJŠANJE DRUGIH SIMPTOMOV

Velikokrat se za lajšanje različnih simptomov v mešanico doda še druge učinkovine:

- **metoklopramid** kot antiemetik,
- **midazolam** kot sedativ,
- **haloperidol** kot sedativ in antiemetik,
- **deksametazon** (kortikosteroid), ki poleg lajšanja nevropatske bolečine zmanjšuje vnetje in oteklino ob živcu, izboljša splošno počutje, apetit in deluje antiemetično.

Zelo redko se v mešanicah znajdejo še: ranitidin, oktretid, levomepromazin in granisetron.

1.2.2 Vrste črpalk

Kontinuirano podkožno dovajanje zdravil dosežemo z uporabo različnih črpalk. Na tržišču so na voljo različne črpalke. Te delimo na:

- mehanske črpalke na vzmet,
- Graseby MS26 črpalke (podobne so mehanskim, le da delujejo na baterijo),
- elektronske črpalke PCA,
- elastomerne (balonske) črpalke (8).

1.2.2.1 Elastomerne (balonske) črpalke

To so črpalke, ki so sestavljene iz zaščitnega ohišja in elastomernega silikonskega balona, ki služi kot rezervoar tekočine za infundiranje zdravil. Balon služi tudi kot črpalka, ki z enakomernim krčenjem pošilja tekočino kontinuirano v sistem preko plastične kanile v podkožje bolnika. Tako ni potrebe napajanja z baterijami ali drugimi viri energije. Iz balona v ohišju vodi cevka. Na koncu cevke je poseben nastavek, ki uravnava hitrost pretoka. Tam je nameščen zamašek. Črpalka ima tudi odprtino za polnjenje, ki je tudi zaprta z zamaškom. Poznamo elastomerne črpalke različnih proizvajalcev. V lekarni

Onkološkega inštituta Ljubljana se največ uporabljajo črpalke proizvajalcev Baxter in Diafuser. Črpalke se ločijo glede na pretok in glede na čas uporabe, ki je omejen s celotnim volumnom tekočine. Pretoki, ki jih poznamo, so: 0,5, 1,5 in 2,0 mL/h. Glede na trajanje infuzije pa jih razdelimo na: enodnevne, dvodnevne, petdnevne in sedemdnevne. Te črpalke so za enkratno uporabo in se jih ne sme ponovno napolniti (8).

Na sliki 1 sta prikazani enodnevna in sedemdnevna elastomerna črpalka proizvajalca Baxter, katere smo uporabili pri stabilnostni in kompatibilnostni študiji.



Slika 1: Enodnevna (zgoraj) in sedemdnevna (spodaj) elastomerna črpalka

Na pretok tekočine iz črpalke vplivajo naslednji dejavniki: viskoznost tekočine, temperatura nastavka za reguliranje hitrosti pretoka in višina nastavljene črpalke glede na nastavek za reguliranje hitrosti pretoka. Zaradi teh dejavnikov vsak proizvajalec v navodilih definira pogoje polnjenja, postopek nastavitve in uporabo črpalke ter dovoljeno odstopanje od specificirane vrednosti pretoka. V navodilih proizvajalca (Baxter) za elastomerne črpalke, katere smo uporabili v naši stabilnostni študiji, je navedeno, da lahko črpalke dostavijo nominalni volumen v $\pm 10\%$ območju od nominalnega dostavnega časa,

kar praktično pomeni, da lahko povprečni pretok odstopa za največ $\pm 10\%$ od specificiranega pretoka (12).

Ackermann in sodelavci (2007) so primerjali in vrednotili tri elastomerne in eno mehansko črpalko. Vse črpalke so bile enodnevnne. Preučevali so tudi vpliv naslednjih parametrov na pretok: temperatura, viskoznost tekočine, višina nastavljene črpalke glede na nastavek za reguliranje hitrosti pretoka in sama variabilnost tega nastavka. Rezultati so pokazali, da so se vse črpalke spraznile prej kot v 24 urah, kar je specificirana vrednost. Te vrednosti so bile od 17 do 22 ur. To pomeni, da je bil pri vseh črpalkah pretok večji od predpisanega. Mehanska črpalka je pokazala najmanjšo variabilnost pretoka in je bila edina črpalka, katere pretok je bil znotraj območja navedenega od proizvajalca skozi celotno trajanje infuzije. Vse ostale tri elastomerne črpalke tega niso izpolnile. Študija je pokazala, da obstaja velika variabilnost med različnimi črpalkami različnih proizvajalcev (13).

Prednosti elastomerne črpalke so:

- majhna teža,
- za delovanje ne potrebuje energije,
- enostavna uporaba za bolnike in svojce, ki jo lahko uporabljajo doma,
- bolnik ne more vplivati na pretok in s tem prekoračiti odmerka,
- enostavna priprava,
- so relativno poceni.

Slabosti:

- ne moremo vplivati na pretok,
- pretok se upočasni, če pride do ovir (kolenčenje kanile, edem in infiltrat na mestu vboda kanile ...), s tem pa se zmanjša učinkovitost dane infuzije,
- po napolnitvi koncentracije zdravilne učinkovine ne moremo več spreminjati (ob spremembi simptomatike),
- so le za enkratno uporabo,
- pri večdnevni črpalkah ni natančne kontrole nad količino infundirane tekočine, ker količine niso označene na ohišju črpalke (8).

1.3 PRIPRAVA IN UPORABA PROTIBOLEČINSKIH MEŠANIC V ELASTOMERNIH ČRPALKAH ZA PODKOŽNO APLIKACIJO

1.3.1 Priprava in postopek polnjenja

Priprava protibolečinskih mešanic se začne, ko v lekarno prejmemo naročilnico iz ambulate za analgezijo. Na naročilnici je napisana receptura za en dan za izdelavo črpalke za podkožno aplikacijo. Naročilnica vsebuje podatke o bolniku (ime in priimek, številko popisa bolnika), ime oddelka, kamor pošljemo izdelano analgetično mešanico, datum in uro naročila, zahtevan datum izdelave, podatke o primerni elastomerni črpalki, podpis zdravnika, ki je predpisal recepturo, in diplomirane sestre, ki je naročilo poslala.

Celotni volumen za posamezen tip elastomernih črpalk je:

- enodnevna črpalka, pretok 2 mL/h: celotni volumen = 50 mL,
- dvodnevna črpalka, pretok 2 mL/h: celotni volumen = 100 mL,
- petdnevna črpalka, pretok 2 mL/h: celotni volumen = 250 mL,
- sedemdnevna črpalka, pretok 1,5 mL/h: celotni volumen = 259 mL,
- sedemdnevna črpalka, pretok 0,5 mL/h: celotni volumen = 84 mL.

Odmerki posameznih zdravil so podani za en dan. Izračunamo odmerek za zahtevano število dni in preračunamo v volumen posamezne raztopine za injiciranje. Izračunamo tudi volumen fiziološke raztopine, in sicer tako, da od celotnega volumna elastomerne črpalke odštejemo volumen raztopin vseh zdravil.

Analgetične mešanice smejo pripravljati le zaposleni z ustreznim znanjem o aseptičnem delu. To so lahko farmacevti ali farmacevtski tehniki (14).

VSTOP OSEBJA

Pred vstopom v prostor z brezprašno komoro si temeljito umijemo roke s tekočim milom do komolca in razkužimo z razkužilom za roke. Rok po razkuževanju ne brišemo. Pri delu v brezprašni komori ne nosimo nakita, dolge lase spnemo. Na glavo si nadenemo zaščitno pokrivalo, oblečemo zaščitno haljo in zaščitno masko. Nadenemo si zaščito za obuvalo, prestopimo črto, ki loči predprostor s čistim prostorom z brezprašno komoro in si nadenemo sterilne nepudrane rokavice. Vstopimo v prostor za aseptično izdelavo analgetičnih mešanic (15).

VNOS ZDRAVIL IN OSTALEGA POTROŠNEGA MATERIALA

Na voziček si pripravimo zdravila in drug potrošni material, ki ga najpogosteje uporabljamo pri izdelavi aseptičnih pripravkov. Opioidne analgetike (narkotike) lekarna shranjuje strogo ločene od ostalih zdravil v posebnih kovinskih omarah – trezorjih, ki morajo biti zavarovane pred dostopom nepooblaščenih oseb. Ampule in drug potrošni material vzamemo iz sekundarne embalaže (kartonske škatle). Material in zdravila prebrišemo in prebrizgamo z dezinficiensom (70% izopropilni alkohol ali 70% n-propanol) in zložimo na čist voziček, ki ga zapeljemo v prostor za aseptično pripravo. Material in zdravila zložimo v omare. Na tak način si pripravimo približno tedensko zalogo zdravil in materiala. V prostor za aseptično pripravo ne vnašamo kartonskih škatel (15).

DELO V PROSTORU ZA ASEPTIČNO IZDELAVO ANALGETIČNIH MEŠANIC

Analgetične mešanice pripravljamo izključno v LAF komori (prostor stopnje čistosti A), v čistem prostoru (prostor stopnje čistosti C). Med delom si rokavice večkrat razkužimo. Pri delu v komori je zelo pomembno počasno in enakomerno gibanje. S sunkovitimi gibi se namreč moti laminarni pretok zraka. Pribor za delo (ampule, stekleničke s fiziološko raztopino, elastomerne črpalke, brizge, igle in ostali pribor) prebrišemo s sterilnimi neprašnimi krpami, prepojenimi z denaturiranim 70% etanolom ali izopropilnim alkoholom brez spor v deionizirani vodi, in jih postavimo v komoro. V komori naj bo samo najnujnejši pribor. Nepotrebn material moti laminarni pretok, ustvarja se turbulenca, tako se izniči glavni namen komore, to je aseptična priprava.

Pribor, ki ga uporabljamo pri izdelavi analgetičnih raztopin in ki nima sterilne sekundarne ovojnine, odlagamo na sterilno podlogo ali čim bolj plitek sterilen pladenj, ki pa ne sme biti iz kartona oz. papirja. Ta naj bo na desnem ali levem robu komore, da ne motimo pretoka zraka in da ne kontaminiramo delovnega pulta. Oster odpadni material, kot na primer igle, dele ampul ... odlagamo v za to ustrezen sterilni vsebnik, ostalo pa odlagamo na podlogo ali pladenj (15).

S steklenice 10% lidokainijevega klorida odstranimo aluminijasto zaporko, s platenke fiziološke raztopine odstranimo aluminijasto folijo in obrišemo z dezinfekcijskim robčkom, ki vsebuje izopropilni alkohol ter namestimo vbodni sistem. Pripravimo si elastomerno črpalčko, zapremo sponko na cevki in odstranimo zamašek iz odprtine za polnjenje. Z brizgo preko vbodnega sistema iz platenke s fiziološko raztopino odmerimo preračunano količino fiziološke raztopine in jo počasi vbrizgamo skozi odprtino za

polnjenje v elastomerno črpalko. Ampulirana zdravila odpremo in z iglo v brizgo odmerimo preračunano količino zdravila. Nato skozi odprtino za polnjenje na elastomerni črpalki dodamo preračunane količine vseh zahtevanih zdravil. Posebna previdnost je potrebna, kadar imamo v pripravku zdravila, ki v visokih koncentracijah niso kompatibilna med seboj. V takem primeru dodamo najprej eno od teh zdravil, nato ostala zdravila s fiziološko raztopino in nazadnje še drugo problematično zdravilo. Kompatibilnost zdravil je prikazan v preglednici I (14).

Preglednica I: Kompatibilnost učinkovin (14)

	metoklopramid	morfin	levomepromazin	midazolam	deksametazon	ranitidin	haloperidol	oktreotid	ketamin	lidokain
metoklopramid	C	C	C	C	X	N	C	X	C	C
morfin	C	X	C	C	C	C	C	C	C	C
levomepromazin	C	C	X	C	X	X	N	X	X	X
midazolam	C	C	C	X	N	N	C	X	C	C
deksametazon	X	C	X	N	X	C	N	C	C	C
ranitidin	C	C	X	N	C	X	X	X	X	X
haloperidol	C	C	N	C	N	X	X	X	C	C
oktreotid	X	C	X	X	C	X	X	X	X	X
ketamin	X	C	X	C	X	X	C	X	X	C
lidokain	C	C	X	C	X	X	C	X	C	X

X – ni podatka; C – kompatibilno; N – nekompatibilno

Ko napolnimo elastomerno črpalko z vsemi predpisanimi zdravili, zapremo odprtino za polnjenje z zamaškom. Odpremo sponko na cevki in počakamo, da raztopina priteče do nastavka na koncu cevke. Nato sponko zapremo in zamašimo priključek z zamaškom.

Črpalko signiramo. Na signaturo vpišemo uro in datum priprave in se podpišemo. Drugo signaturo nalepimo v dnevnik in vpišemo porabljeni material. Po končanem delu LAF komoro očistimo s sterilno neprašno krpo, prepojeno z denaturiranim 70% etanolom ali izopropilnim alkoholom brez spor v deionizirani vodi (14).

Na signaturi črpalk morajo biti označeni naslednji podatki:

- priimek in ime bolnika,
- ime oddelka, ki je analgetično mešanico naročil,
- zaščiteno ali nelastniško ime vseh zahtevanih zdravil,
- odmerki zdravil v miligramih in preračunani volumni v mililitrih,
- datum priprave analgetične mešanice,
- pretok črpalke (0,5 mL/h, 1,5 mL/h ali 2 mL/h) in zahtevano število dni (1 dan, 2 dni, 5 dni ali 7 dni),
- podpis osebe, ki je izdelala analgetično mešanico,
- podpis odgovornega farmacevta, ki je kontroliral pripravo.

Signaturo napišemo v dvojniku. Eno izpolnjeno signaturo prilepimo na črpalko, napolnjeno z analgetično mešanico, drugo signaturo prilepimo v dnevnik priprave analgetičnih mešanic za podkožno dajanje zdravil. Napolnjeno elastomerno črpalko shranjujemo zaščiteno pred svetlobo (16).

1.3.2 Postopek nastavitve podkožne infuzije (8)

Preden nastavimo podkožno infuzijo, bolniku razložimo postopek. S tem dosežemo njegovo privolitev in sodelovanje. Najprimernejša vbodna mesta za nastavitve podkožne infuzije so: predel v zgornjem delu prsnega koša pod ključnico, na trebuhu in pri nemirnih bolnikih na hrbtu. Manj priporočena mesta so: nadlaht, sprednja stran stegna in ledveni predel. Ko izberemo ustrezno mesto, ga aseptično očistimo. Vstavimo podkožno kanilo in jo fiksiramo. Za fiksiranje uporabimo transparentno folijo. Le-ta prepreči izpad kanile, koži omogoči dihanje, preprečuje vdor bakterij in vode in s tem bolniku omogoča izvajanje osebne higiene brez nevarnosti okužbe. Na kanilo priključimo elastomerno črpalko in s tem vzpostavimo kontinuirano podkožno infuzijo. Na nalepko zapišemo datum in uro nastavitve ter izpolnimo dokumentacijski list.

1.3.3 Negovalni postopki (8)

Za doseg učinkovitega zdravljenja je potrebno bolnike in svojce dobro poučiti o sami črpalke, njenem delovanju in posebnostih tega načina zdravljenja. Ti napotki so naslednji: Enkrat dnevno je potrebno pregledati mesto vboda. Opazujemo lego kanile in izgled ter barvo kože (morebitna rdečina, infiltrat). Dvakrat dnevno je treba preveriti delovanje črpalke. Preverja se praznjenje balona. Pri tem si pomagamo tako, da na ohišju črpalke ob vsaki kontroli označimo mesto do koder sega balon s tekočino. Na delovanje črpalke je treba biti še posebej pozoren, kadar se ob sicer urejeni terapiji ponovno pojavijo simptomi. V primeru nepravilnega delovanja naj bolniki ali svojci pokličejo patronažno medicinsko sestro ali dežurnega zdravnika. Najprej preverimo delovanje črpalke s tem, da odklopimo črpalke s kanile in počakamo, če iz sistema priteče kapljica tekočine. Če pri tem ne ugotovimo nepravilnosti, zamenjamo kanilo.

Bolnike in svojce naučimo tudi, kako naj ocenjujejo bolečino, učinkovitost terapije in da naj bodo pozorni tudi na morebitne neželene učinke terapije.

1.4 STABILNOST IN KOMPATIBILNOST

1.4.1 Stabilnost (17, 18)

Za zagotavljanje ustrezne kakovosti, varnosti in učinkovitosti farmacevtskih izdelkov je zelo pomembno in ključno testiranje stabilnosti. Stabilnost zdravila definiramo kot sposobnost farmacevtskega izdelka, da ohranja svoje lastnosti med transportom, pri skladiščenju in uporabi znotraj specifikacijskih mej skozi čas roka uporabnosti. Splošno velja, da je zdravilo stabilno, če se jakost oziroma vsebnost učinkovine v predpisanem času ne zmanjša za več kot 10 %. Strožje zahteve veljajo za tista zdravila, pri katerih so razpadni produkti bolj toksični ali dražljivi kot sama učinkovina. Kadar je v zdravilu več zdravilnih učinkovin, se stabilnost zdravila določa glede na hitrost razpada najmanj stabilne spojine. Procese, ki vplivajo na stabilnost zdravila, delimo na: kemijske, fizikalne in mikrobiološke.

KEMIJSKA STABILNOST

Vsaka učinkovina mora ohranjati kemijsko identiteto in jakost znotraj določenih mej skozi čas roka uporabnosti. Pri kemijski razgradnji nastanejo nove spojine. Kemijski razpad učinkovine v zdravilu se pogosto pokaže kot izguba v jakosti delovanja. V nekaterih primerih so lahko razpadni produkti celo toksični. Na splošno kemijske reakcije lažje potekajo v tekočem agregatnem stanju kot v trdnem, zato se resnejši stabilnostni problemi pogosteje pojavljajo v tekočih farmacevtskih oblikah. Najpogostejši kemijski reakciji, ki vplivata na razgradnjo učinkovine, sta oksidacija in hidroliza. Ostale so še: dehidracija, izomerizacija, racemizacija, polimerizacija, fotokemična reakcija, z radiacijo inducirane reakcije, dekarboksilacija.

Dejavniki, ki lahko vplivajo na kemijsko stabilnost, so: pH, splošna kislinska in bazna kataliza, ionska moč, narava topila, koncentracija učinkovine, pomožne snovi, peroksidi, težke kovine, kisik, ogljikov dioksid, voda, temperatura, ionizirana radiacija, mehanski procesi. Kemijsko stabilnost lahko povečamo z ustreznim uravnavanjem teh dejavnikov.

FIZIKALNA STABILNOST

Zdravilo mora v času roka uporabnosti ohranjati svoje prvotne fizikalne lastnosti, vključno z izgledom, okusom, enakomernostjo vsebnosti, raztapljanjem, suspendibilnostjo ... Pri fizikalni razgradnji se spremenijo fizikalne lastnosti zdravila. Veliko zdravil je kompleksnih fizikalno-kemijskih sistemov, ki so lahko podvrženi različnim fizikalnim spremembam med obdobjem od priprave do aplikacije zdravila. Fizikalne reakcije lahko vodijo do zmanjšanja biološke uporabnosti in učinkovitosti zdravila ter vplivajo na razne lastnosti zdravila, kot so disperzibilnost, sprejemljivost za bolnika, priročnost za uporabo. Primeri fizikalnih nestabilnosti: hlapenje sestavin, sprememba v vsebnosti vode, sorpcija, sprememba kristalnih lastnosti (sprememba kristalne oblike, rast kristalov, kristalizacija v raztopini), obarjanje.

MIKROBIOLOŠKA STABILNOST

Zdravilo mora skozi svoj rok uporabnosti ohraniti tudi sterilnost oziroma odpornost proti rasti mikroorganizmov v okviru določenih zahtev. Tekoče farmacevtske oblike (raztopine, suspenzije, emulzije) so še posebej dobro gojišče za bakterije. Razrast bakterij pa se lahko pojavi tudi v trdnih farmacevtskih oblikah, ki vsebujejo nekaj vode. Kontaminacija produkta z bakterijami, plesnimi ali kvasovkami se lahko pojavi med izdelavo, distribucijo

shranjevanjem ali uporabo zdravila. Razrast mikroorganizmov v zdravilu ni sprejemljiv iz dveh razlogov. Prvi je ta, da je lahko prisotnost patogenih bakterij, kvasovk, plesni ali endotoksinov zelo nevarna za bolnika, še posebej pri intravenski aplikaciji zdravila. Drugi razlog pa je, da kontaminacija z nepatogenimi mikroorganizmi lahko privede do kvarjenja zdravila. Zato se za preprečitev razrasti mikroorganizmov velikokrat uporabljajo konzervansi.

1.4.2 Inkompatibilnost (18)

TERAPEVTSKA INKOMPATIBILNOST

Za terapevtsko inkompatibilnost uporabljamo sinonim interakcije med zdravili. To so farmakodinamske ali farmakokinetične interakcije, ki nastajajo *in vivo* po aplikaciji zdravila. Farmakodinamske interakcije se zgodijo med dvema učinkovinama, ki imata podobno ali antagonistično farmakološko delovanje ali neželene učinke. Pri farmakokinetičnih interakcijah pa ena učinkovina vpliva na absorpcijo, distribucijo, metabolizem ali ekskrecijo druge učinkovine. Take interakcije so lahko povezane tudi s fizikalno-kemijskimi interakcijami v telesu, kot so vezava na proteine, kelacija, nastajanje kompleksov, adsorpcija.

FIZIKALNO-KEMIJSKA INKOMPATIBILNOST

To so interakcije, ki se zgodijo *in vitro* med učinkovinami in drugimi komponentami zdravila med pripravo, shranjevanjem in aplikacijo zdravila. Interakcije, ki lahko vplivajo na biološko uporabnost, učinkovitost ali toksičnost, so: učinkovina–učinkovina, učinkovina–pomožna snov, pomožna snov–pomožna snov, učinkovina–ovojnina, pomožna snov–ovojnina. Te interakcije lahko povzročijo spremembe v fizikalno-kemijskih lastnostih in stabilnosti. Fizikalno-kemijsko inkompatibilnost lahko zaznamo kot spremembe v: barvi, vonju, okusu, motnosti, obarjanju, koagulaciji, rasti kristalov, agregaciji, strjevanju, utekočinjenju, ločitvi faz. Nekatere interakcije pa ostanejo skrite in jih lahko zaznamo s fizikalno ali kemijsko analizo. Primer take interakcije je sorpcija učinkovine na ovojnino.

Tipi fizikalno-kemijskih inkompatibilnosti so: obarjanje neioniziranih baz ali kislin, obarjanje zaradi redčenja raztopine, ki vsebuje kosolvent, obarjanje zaradi izsoljevanja, ionske interakcije, nastajanje kompleksov, učinek pomožnih snovi na stabilnost

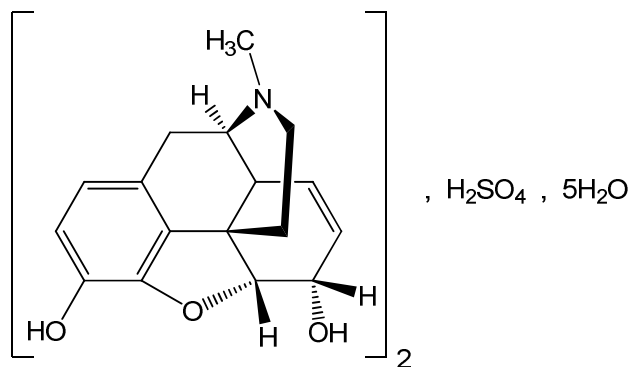
učinkovine, adsorpcija na trdne delce, sorpcija na ovojnino in filtre, odpuščanje iz ovojnine, prehajanje skozi ovojnino (12).

1.4.3 Fizikalno-kemijske lastnosti in stabilnost učinkovin

V nadaljevanju bomo predstavili fizikalno-kemijske in stabilnostne lastnosti tistih učinkovin, katere najpogosteje uporabljajo v lekarni na Onkološkem inštitutu Ljubljana za izdelavo protibolečinskih mešanic v elastomernih črpalkah za podkožno aplikacijo. Te učinkovine smo uporabili v stabilnostni in kompatibilnostni študiji. Pri nekaterih stabilnostnih študijah nismo navedli analizne metode za določevanje stabilnosti, ker literatura teh podatkov ne vsebuje.

1.4.3.1 Morfinijev sulfat

Morfinijev sulfat (morphini sulfas), $C_{34}H_{40}N_2O_{10}S \cdot 5H_2O$



Slika 2: Struktura morfinijevega sulfata pentahidrata

Fizikalno-kemijske lastnosti: (18, 19, 20, 21, 22)

Morfinijev sulfat je bel ali skoraj bel kristaliničen prašek. Je brez vonja ali skoraj brez vonja. Pri daljši izpostavitvi na svetlobi potemni.

Mr = 758,8 g/mol

$T_f = 254\text{--}256^\circ\text{C}$

Topnost: Morfinijev sulfat je topen v vodi, zelo težko topen v etanolu (96 %) in praktično netopen v toluenu.

pKa = 7,9

logP (oktanol/pH 7,4) = 1,42

pH (raztopina za injiciranje) = 2,5–6,0

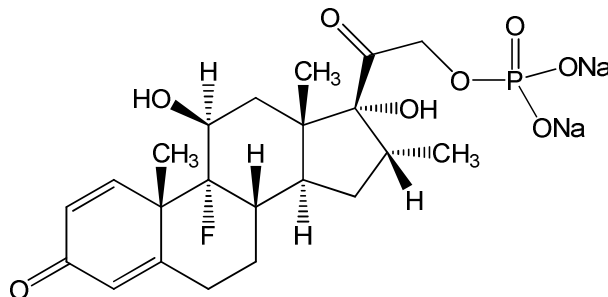
Stabilnost:

Raztopina morfinijevega sulfata je bistra brezbarvna raztopina. Raztopina mora biti shranjena pri sobni temperaturi, zaščitena pred zamrzovanjem (zaradi obarjanja) in svetlobo. Pri raztopinah v polimernih vsebnikih lahko pri povišani temperaturi izhlapeva voda in posledično se zviša koncentracija morfina. Raztopina morfinijevega sulfata potemni pri daljši izpostavitvi svetlobi. Razpad morfina nastane zaradi oksidacijske reakcije, pri kateri sta glavna produkta psevdomorfin in morfin-*N*-oksid, v razmerju 9:1. Razpad morfina katalizirajo kisik, svetloba, ultravijolična radiacija, železovi ioni in organske nečistote. Razpad morfina pospeši prisotnost kisika in višji pH, medtem ko imata temperatura in svetloba manjši vpliv (23).

V študiji so Nahata in sodelavci (1992) analizirali raztopino morfinijevega sulfata s koncentracijo 1 mg/mL v 0,9% NaCl, ki vsebuje tudi 0,9% benzilni alkohol. Raztopino so shranjevali zaščiteno pred svetlobo in analizirali s HPLC po 91 dneh. Rezultati so pokazali obstojnost pri temperaturi shranjevanja 4°C in 4% upad vsebnosti pri 22°C. Walker in sodelavci (1989) so ugotovili, da koncentracija morfinijevega sulfata s koncentracijo 10 mg/mL v 0,9% NaCl v steklenem vsebniku pri 23°C po 30 dneh pade na 96,4% (23). Duafala in sodelavci (1990) pa so preučevali stabilnost morfinijevega sulfata v infuzijskem sistemu (Intermate 200) in elastomerni črpalki (Baxter) pri temperaturi 4 in 24°C. Koncentraciji morfinijevega sulfata sta bili 15 in 2 mg/mL. Za redčenje so uporabili vodo za injekcije. Pri infuzijskem sistemu, napolnjenem s 100 mL raztopine, so ugotovili obstojnost oziroma minimalen upad vsebnosti po 15 dneh shranjevanja pri 4, 24 in 31°C. Pri nekaterih elastomernih črpalkah, napolnjenih s 50 mL raztopine, pa so po 12 dneh opazili padec koncentracije morfinijevega sulfata za 5% in več. Opravljena je bila študija, kjer je bilo tudi ugotovljeno, da se morfinijev sulfat (0,5 mg/mL) v 5% dekstrozi in 0,9% NaCl po dveh tednih in rahlem stresanju pri temperaturi 35°C ne veže oziroma ne adsorbira v elastomerni črpalki (Baxter) (21).

1.4.3.2 Natrijev deksametazonfosfat

Natrijev deksametazonfosfat (dexamethasoni natrii phosphas), $C_{22}H_{28}FNa_2O_8P$



Slika 3: Struktura natrijevega deksametazonfosfata

Fizikalno-kemijske lastnosti: (18, 19, 20, 21, 24, 25)

Natrijev deksametazonfosfat je bel ali rahlo rumen zelo higroskopen kristaliničen prašek.

$M_r = 516,4 \text{ g/mol}$

$T_f = 233\text{--}235^\circ\text{C}$

Topnost: Natrijev deksametazonfosfat je lahko topen v vodi, težko topen v 96% etanolu, praktično netopen v metilen kloridu.

$pK_{a1} = 1,89$; $pK_{a2} = 6,4$

$\log P$ (oktanol/pH 7,4) = 0,51

pH (raztopina za injiciranje) = 7–8,5

Stabilnost:

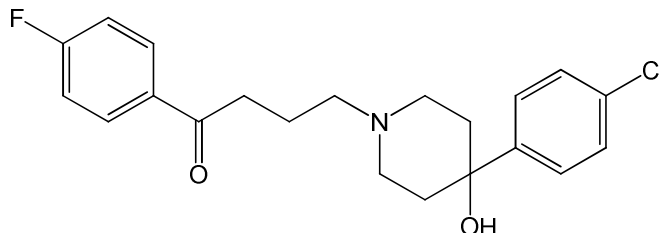
4 mg/mL raztopina natrijevega deksametazonfosfata je bistra in brezbarvna, medtem ko je 24 mg/mL raztopina bistra, brezbarvna do rahlo rumena. Raztopina naj se shranjuje zaščitena pred svetlobo in zamrzovanjem. Natrijev deksametazonfosfat je termolabilen, zato ga ne smemo avtoklavirati (21). Glavni razpadni produkt natrijevega deksametazonfosfata je deksametazon (26). Poleg tega je bila opravljena študija, kjer so ugotovili, da natrijev deksametazonfosfat oksidativno razpada, kar je bilo dokazano v 18 od 114 vzorcev. Glavna oksidativna produkta v beli oborini sta bila 16 α - in 16 β -metil-17-keton (18).

V naslednji študiji so raztopino natrijevega deksametazonfosfata s koncentracijo 1 mg/mL, ki so jo razredčili z 0,9% NaCl, shranjevali 28 dni v 10-mL sterilnih steklenih vialah pri 4 in 22°C. S HPLC analizo so ugotovili, da ni razpadel oziroma le malo. Raztopino natrijevega deksametazonfosfata so za 4 tedne izpostavili temperaturi v območju od 26 do

38°C, da bi simulirali poletne pogoje. Ugotovili so, da učinkovina v teh pogojih ne razpada. Raztopina natrijevega deksametazonfosfata s koncentracijo 0,8 mg/mL v 5% dekstrozi in 0,9% NaCl, shranjena 24 ur pri sobni temperaturi v elastomerni črpalki, je stabilna (21).

1.4.3.3 Haloperidol

Haloperidol (haloperidolum), C₂₁H₂₃ClNO₂



Slika 4: Struktura haloperidola

Fizikalno-kemijske lastnosti: (18, 19, 20, 21)

Haloperidol je bel ali rahlo rumen prašek.

Mr = 375,9 g/mol

T_f = 148,0–149,4°C

Topnost: Haloperidol je praktično netopen v vodi, težko topen v 96% etanolu, metanolu in metilen kloridu. Ker je haloperidol praktično netopen v vodi, se v raztopini za injiciranje uporablja v obliki soli z mlečno kislino (haloperidolijev laktat).

pK_a = 8,3

logP (oktanol/pH 7,4) = 4,3

pH zdravila (raztopina za injiciranje) = 3–3,8

Stabilnost:

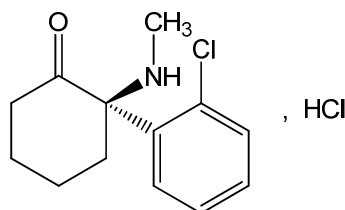
Raztopina za injiciranje, ki vsebuje haloperidolijev laktat, naj bo shranjena pri kontrolirani sobni temperaturi in zaščitena pred svetlobo. Izogibamo se zamrzovanju in temperaturam nad 40°C.

Raztopina haloperidolijevega laktata s pH nad 3 je pri sobni temperaturi in 40°C stabilna do pet let. Razpad učinkovine in obarvanje raztopine se opazi pri izpostavitvi naravni svetlobi. Narejena je bila tudi raziskava, kjer so raztopino haloperidola (0,5 mg/mL) pripravili v 1% mlečni kislini z in brez dodatka 0,1% metil-p-hidroksibenzoata.

Spreminjali so različne pogoje shranjevanja: temperaturo, svetlobo, koncentracijo kisika, material vsebnika. Raztopino so shranjevali 9 mesecev. Ugotovili so, da razpad haloperidola ni znoten, vendar je bil pospešen ob prisotnosti kisika in svetlobe in je bil večji v plastičnem vsebniku kot v steklenem. Dva razgradna produkta sta bila detektirana v manjših količinah s tankoplastno kromatografijo, ki pa nista bila identificirana (18). V drugi raziskavi je bilo ugotovljeno, da je raztopina haloperidolijevega laktata v 0,9% NaCl pri koncentracijah od 1 do 3 mg/mL nekompatibilna, saj takoj nastane oborina. Pri koncentracijah od 0,1 do 0,75 mg/mL pa je kompatibilna, saj po 7 dneh opazovanja pri 21°C ni bilo vizualnih sprememb (21).

1.4.3.4 Ketaminijev klorid

Ketaminijev klorid (ketamini hydrochloridum) C₁₃H₁₇Cl₂NO



Slika 5: Struktura ketaminijevega klorida

Fizikalno-kemijske lastnosti: (19, 20, 21, 27, 28)

Ketaminijev klorid je bel ali skoraj bel kristaliničen prašek.

Mr = 274,2 g/mol

T_f = 262–263°C

Topnost: Ketaminijev klorid je lahko topen v vodi in metanolu ter topen v 96% etanolu.

pK_a = 7,5

logP (oktanol/pH 7,4) = 2,9

pH (raztopina za injiciranje) = 3,5–5,5

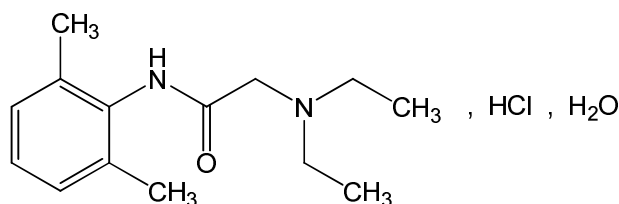
Stabilnost:

Raztopina za injiciranje, ki vsebuje ketaminijev klorid, je brezbarvna do rahlo rumena. Čeprav lahko pri daljši izpostavitvi na svetlobi potemni, to ne vpliva na jakost zdravila. Raztopina naj bo shranjena pri kontrolirani sobni temperaturi in zaščitena pred svetlobo.

Ketaminijev klorid je zelo stabilna učinkovina. Opravljena je bila študija, kjer je bila raztopina ketaminijevega klorida 10 mg/mL, razredčena v vodi za injekcije, pakirana v 1-mL polipropilenske brizge in shranjena pri temperaturi 25°C. Raztopina je po 30 dneh ostala bistra. S HPLC analizo pa niso odkrili razpada učinkovine (21). Stucki in sodelavci (2008) pa so v študiji preučevali kemijsko stabilnost 1 mg/mL ketaminijevega klorida v 0,9% NaCl v polipropilenskih brizgah. Vzorce so shranjevali 12 mesecev pri temperaturah 4, 25 in 40°C. S stabilnostno indikativno kapilarno elektroforezo so ugotovili, da se je jakost zmanjšala za manj kot 8% (29).

1.4.3.5 Lidokainijev klorid

Lidokainijev klorid (lidocaini hydrochloridum), C₁₄H₂₃ClN₂O, H₂O



Slika 6: Struktura lidokainijevega klorida hidrata

Fizikalno-kemijske lastnosti: (18, 19, 20, 21, 30)

Lidokainijev klorid je bel ali skoraj bel kristaliničen prašek.

Mr = 288,8 g/mol

T_i = 77–78°C

Topnost: Lidokainijev klorid je zelo lahko topen v vodi in lahko topen v 96% etanolu.

pK_a = 8,01

logP (oktanol/pH 7,4) = 2,1

pH (raztopina za injiciranje) = 5,0–7,0

Stabilnost:

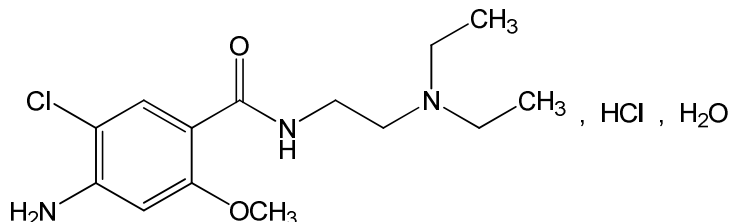
Raztopina za injiciranje z lidokainijevim kloridom naj bo shranjena pri kontrolirani sobni temperaturi in zaščitena pred visoko temperaturo in zamrzovanjem. Raztopina lidokainijevega klorida je zelo stabilna. Tudi pri ekstremnih vrednostih pH in visokih temperaturah je hidroliza do 2,6-ksilidina in *N,N*-dietilglicina zelo počasna. Če do hidrolize

pride, pa ta lažje poteka v kislem kot v alkalnem mediju. Učinkovina ne razpada z oksidacijo (18).

Narejena je bila študija, kjer so 1% raztopini lidokainijevega klorida uravnali pH z natrijevim bikarbonatom na tri različne vrednosti, in sicer na 6,8, 7,2 in 7,4. Pri pH 6,8 po 27. dneh ni bilo upada koncentracije. Pri pH 7,2 je začetna koncentracija ostala nespremenjena do 19. dneva, do 27. dneva pa je ta padla na 88%. Nastala je bela oborina. Pri pH 7,4 se je med 5. in 15. dnevom izgubilo 23% učinkovine. Zopet je nastala bela oborina. To pomeni, da pri višjih vrednostih pH pride do obarjanja lidokaina. V naslednji študiji so testirali stabilnost lidokainijevega klorida v 0,9% NaCl. Raztopina s koncentracijo 2 mg/mL je po 14 dnevih pri 25°C ostala nespremenjena. Tudi 0,515 mg/mL lidokainijev klorid po 21 dneh ni razpadel v temperaturnem območju od 20 do 24°C. Izguba koncentracije 1 in 8 mg/mL te učinkovine s HPLC analizo po 48 urah pri sobni temperaturi je bila nična oziroma minimalna. V naslednji raziskavi so preučevali adsorpcijo lidokainijevega klorida v elastomerni črpalki (Baxter). Koncentracija je bila 4 mg/mL, nosilni raztopini pa 5% dekstroza in 0,9% NaCl. Po dveh tednih shranjevanja pri 35°C in rahlem mešanju je bila količina, ki se je vezala na elastomer, manj kot 1% (21).

1.4.3.6 Metoklopramidijev klorid

Metoklopramidijev klorid (metoclopramidii hydrochloridum), $C_{14}H_{23}Cl_2N_3O_2 \cdot H_2O$



Slika 7: Struktura metoklopramidijevega klorida hidrata

Fizikalno-kemijske lastnosti: (18, 19, 20, 21, 31)

Metoklopramidijev klorid je bel ali skoraj bel kristaliničen prašek.

$M_r = 354,3$ g/mol

$T_f = 182,5-184^\circ\text{C}$

Topnost: Metoklopramidijev klorid je zelo lahko topen v vodi, lahko topen v alkoholu in zmerno topen v metilen kloridu.

$pK_{a1} = 0,6$; $pK_{a2} = 9,3$

$\log P$ (oktanol/pH 7,4) = 2,62

pH (raztopina za injiciranje) = 2,5–6,5

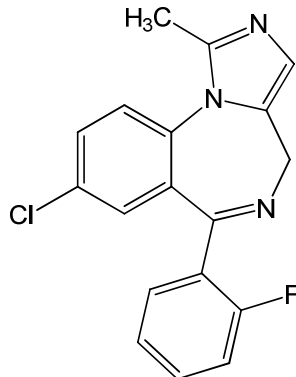
Stabilnost:

Raztopina metoklopramidijevega klorida za injiciranje je bistra in brezbarvna. Priporočeno je shranjevanje pri sobni temperaturi in zaščiteno pred zamrzovanjem ter zaščiteno pred svetlobo, saj je metoklopramidijev klorid fotosenzibilen. Pri izpostavitvi raztopine svetlobi, se le-ta obarva. Učinkovina je stabilna v pH območju od 2 do 9 (21). Metoklopramid razpada s hidrolizo. Pri tem nastaja 2-dietilaminitilamin in drugi razpadni produkti (18).

Stabilnost metoklopramidijevega klorida (5 mg/mL) so preučevali v 3-mL plastični infuzijski črpalki (MiniMed). Preučevali so fizikalno in kemijsko stabilnost (s HPLC metodo). Analiza po sedmih dneh pri temperaturi shranjevanja 32°C je pokazala, da je raztopina fizikalno stabilna in da ni razpada učinkovine oziroma je ta minimalen. Pri temperaturi 23°C pa je bila raztopina fizikalno in kemijsko stabilna 60 dni. Tudi v tem primeru je bil razpad učinkovine ničen oziroma minimalen. Učinkovina je bila fizikalno in kemijsko stabilna tudi pri temperaturi 4°C in času shranjevanja 90 dni. V naslednji študiji so preučevali stabilnost metoklopramidijevega klorida (4 mg/mL) v elastomerni črpalki (Medflo) s HPLC metodo. Učinkovina je bila stabilna pod naslednjimi pogoji shranjevanja: v 5% dekstrozi po 24 urah pri sobni temperaturi in dveh tednih zamrznitve ter v 0,9% NaCl po 24 urah pri sobni temperaturi in štirih tednih zamrznitve (21).

1.4.3.7 Midazolam

Midazolam (midazolamum), $C_{18}H_{13}ClFN_3$



Slika 8: Struktura midazolama

Fizikalno-kemijske lastnosti: (19, 20, 21, 32, 33)

Midazolam je bel ali rumenkast kristaliničen prašek.

$M_r = 325,8 \text{ g/mol}$

$T_f = 158\text{--}160^\circ\text{C}$

Topnost: Midazolam je praktično netopen v vodi, lahko topen v acetonu in 96% etanolu in topen v metanolu. Zaradi slabe topnosti v vodi je midazolam v raztopini za injiciranje v obliki soli s HCl.

$pK_a = 6$

$\log P \text{ (oktanol/pH } 7,4) = 4,33$

pH zdravila (raztopina za injiciranje) = 2,9–3,7

Stabilnost:

Raztopina midazolamijevega klorida je brezbarvna do rahlo rumena. Priporočeno je shranjevanje pri sobni temperaturi in zaščiteno pred svetlobo. Izpostavitve komercialne injekcije z midazolamijevim kloridom (Roche) svetlobi za štiri mesece je privedla do obarvanja raztopine v rumeno že po enem mesecu in razpad učinkovine za 8% po štirih mesecih. Zaščita pred svetlobo je torej pomembna za stabilnost skozi daljše obdobje. Pri kratkotrajnem shranjevanju pa zaščita pred svetlobo ni potrebna (21). Eden izmed glavnih razpadnih produktov, ki nastanejo po fotolizi, je *N*-dezalkilflurazepam (34).

Kar nekaj stabilnostnih študij je bilo narejenih z raztopino midazolamijevega klorida v 0,9% NaCl, ki pa so prinesle dokaj različne rezultate. Pri prvi študiji so učinkovino s koncentracijo 0,5 mg/mL 30 dni shranjevali v temi pri 23°C in 4°C. S HPLC analizo so ugotovili, da razpada učinkovine ni bilo. Razpada učinkovine ni bilo tudi pri naslednji študiji, kjer so isto koncentracijo shranjevali 36 dni pri 4, 24 in 40°C, zaščiteno pred svetlobo. Tudi tukaj so za analitiko uporabili HPLC metodo. V drugi študiji so učinkovino s koncentracijo 1 mg/mL 10 dni shranjevali pri 23°C, zaščiteno pred svetlobo in izpostavljeno fluorescenčni svetlobi. Vizualno je bila raztopina kompatibilna, razpad učinkovine, ugotovljen s HPLC analizo, pa največ 5%. Isto koncentracijo učinkovine in enako analizno metodo so uporabili tudi pri tretji študiji, kjer je bila raztopina vizualno kompatibilna po 49 dneh pri 4 in 40°C pri fluorescenčni svetlobi ter pri 20°C, zaščiteno pred svetlobo. Razpad učinkovine je bil od 4 do 6%. Četrta študija pa kaže na velik razpad učinkovine, saj je bil razpad, ugotovljen s HPLC metodo, le-te pri koncentracijah 0,1, 0,5 in 1 mg/mL pri sobni temperaturi po 24 urah, od 8 do 10% (21).

Zanimive študije so bile narejene tudi glede adsorpcije midazolama. Midazolam (Roche) 40 µg/mL v 0,9% NaCl se ni adsorbiral po 24 urah pri 21°C, zaščiteno pred svetlobo v PVC, steklenih in polietilenskih vsebnikih. Naslednja raziskava je pokazala, da se midazolam (Roche) 30 µg/mL v 0,9% NaCl ali 5% dekstrozi ni adsorbiral na PVC vsebnikih po 72 urah pri 20°C. Ko pa so spremenili pH iz 4,3–4,8 na pH 7 s fosfatnim pufrom, so bile izgube precejšnje. Po eni uri je bila izguba 8%, po šestih urah 20% in po 24 urah 46%. Narejena je bila še ena študija, kjer so preučevali adsorpcijo midazolama (Roche) 1 mg/mL v 0,9 % NaCl v PVC vrečkah. Po 10 dneh shranjevanja pri 23°C se je zaradi adsorpcije koncentracija zmanjšala za približno 5%. Koncentracije so spremljali s HPLC metodo (21).

1.4.4 Stabilnostne in kompatibilnostne študije

1.4.4.1 Stabilnost in kompatibilnost mešanic dveh učinkovin

V preglednici II so zbrani kompatibilnostni podatki za vse kombinacije dveh učinkovin, ki smo jih opisali v prejšnji točki (poglavje 1.4.3).

Preglednica II: Kompatibilnost mešanic dveh učinkovin (13, 34, 35, 36)

	metoklopramid	morfinijev sulfat	midazolam	deksametazonfosfat	haloperidol	ketamin	lidokain
metoklopramid	XXX	C	C	C	C	C	C
morfinijev sulfat	C	XXX	C	C	R	C	C
midazolam	C	C	XXX	N	C	C	C
deksametazonfosfat	C	C	N	XXX	N	C	C
haloperidol	C	R	C	N	XXX	C	C
ketamin	C	C	C	C	C	XXX	C
lidokain	C	C	C	C	C	C	XXX

C – kompatibilno; N – nekompatibilno; R – različni podatki

Deksametazonfosfat – midazolam

Opravljeni sta bili dve študiji, kjer so preučevali 6 kompatibilnostnih mešanic (21). Sestava le-teh je prikazana v preglednici III.

Preglednica III: Sestava kompatibilnostnih mešanic (deksametazonfosfat in midazolam)

mešanica	koncentracija [mg/mL]		kompatibilnost
	deksametazonfosfat	midazolam	
1	0,25 in 4	0,3125	DA
2	0,25	0,625	DA
3	0,5	0,625 in 0,9375	NE
4	0,25	0,9375	NE
5	4	1	NE
6	4	5	NE

Vse mešanice so bile redčene z 0,9% NaCl. Prva mešanica je ostala bistra po 48 urah. Natrijev deksametazonfosfat ni razpadel po 48 urah, koncentracija midazolamijskega klorida pa se je zmanjšala za več kot 10% v 24 urah pri sobni temperaturi. Tudi v drugi mešanici ni bilo vizualnih sprememb in razpada natrijevega deksametazonfosfata po 48 urah. Razpad midazolamijskega klorida pa je bil po 48 urah pri sobni temperaturi 7%. Pri prvi in drugi mešanici so koncentracije učinkovin določevali s HPLC metodo. Tretja mešanica je takoj postala motna. V četrti mešanici pa so se pri nekaterih vzorcih tvorili kristali znotraj 48 ur po mešanju teh dveh učinkovin. Mešanica 5 in 6 sta bili narejeni na Y-strani injiciranja (Y-site of injection). To pomeni, da sta dve različni raztopini za injiciranje tekli vsaka skozi svojo cevko in se nato združili skupaj v eno cevko (na Y strani injiciranja). Razmerje teh dveh raztopin za injiciranje na Y strani je bilo 1:1. Pri peti mešanici se je takoj pojavila motnost, oborina pa se je pojavila v 8 urah. Pri šesti mešanici pa se je bela oborina pojavila takoj.

V splošnem velja pravilo, da so raztopine učinkovin s podobnim pH bolj kompatibilne med seboj kot tiste, pri katerih se pH močno razlikuje. Raztopina z natrijevim deksametazonfosfatom ima alkalen pH in zato povzroča kompatibilnostne probleme, saj je večina raztopin soli učinkovin kislih. Zaradi tega je priporočljivo, da se natrijev

deksametazonfosfat doda nazadnje že razredčeni raztopini mešanic preostalih soli učinkovin, da se izognemo tveganju inkompatibilnosti (35).

Morfinijev sulfat – haloperidol

Opravljeni sta bili dve raziskavi, kjer so preučevali kompatibilnost 3 mešanic (21). Sestava le-teh je prikazana v preglednici IV.

Preglednica IV: Sestava kompatibilnostnih mešanic (morfinijev sulfat in haloperidol)

mešanica	koncentracija [mg/mL]		kompatibilnost
	morfinijev sulfat	haloperidol	
1	5 in 10	5	NE
2	20	2	NE
3	1	0,2	DA

V prvi mešanici se je takoj pojavila motnost, ki je čez čas postala kristalinična oborina haloperidola in parabenov, v drugi mešanici pa se je ob mešanju tvorila bela oborina haloperidola. Obe mešanici sta bili pripravljene v brizgi in sta nekompatibilni. Tretja mešanica je bila narejena na Y-strani injiciranja (Y-site of injection). Raztopini so zmešali v razmerju 1:1. Ta mešanica pa je bila kompatibilna, saj ni bilo sprememb v motnosti ali povečanju delcev v raztopini v 48 urah pri 22°C.

1.4.4.2 Stabilnost in kompatibilnost mešanice treh ali več učinkovin

Nergro in sodelavci (2002) so naredili študijo, kjer so preučevali kompatibilnost mešanic dveh, treh, štirih in petih učinkovin. Učinkovine in njihove koncentracije v mešanici so bile:

1. morfinijev klorid 5 mg/mL (1,68 mg/mL),
2. midazolamijev klorid 1,5 mg/mL (0,5 mg/mL),
3. haloperidolijev laktat 0,62 mg/mL (0,21 mg/mL),
4. butilskopolamin 5 mg/mL (1,68 mg/mL),
5. natrijev deksametazonfosfat 1,33 mg/mL (0,44 mg/mL),
6. metoklopramidijev klorid 3,33 mg/mL (1,11 mg/mL),
7. tramadol 33,33 mg/mL (11,18 mg/mL).

Prve oziroma višje koncentracije so tiste, ki simulirajo kombinacijo učinkovin v petdnevni infuzijski črpalki (50 mL). Koncentracije v oklepajih, ki so nižje, pa simulirajo mešanico v sedemdnevni infuzijski črpalki (250 mL). Kompatibilnost so preverjali s spremembo barve, motnosti in/ali obarjanjem mešanice.

Ugotovili so, da so nekompatibilne vse tiste mešanice, kjer je poleg natrijevega deksametazonfosfata prisoten še midazolamijski klorid in/ali haloperidolijev laktat. pH vrednosti raztopin za injiciranje midazolamijskega klorida in haloperidolijevega laktata sta bili 3,28 in 3,24. Za natrijev deksametazonfosfat pa je bila ta vrednost 7,65. Razlog za obarjanje je lahko bil zmanjšanje topnosti deksametazonfosfata, ker se je znižal pH raztopine (36).

V stabilnostni študiji sta Vermeire in Remon (1999) preučevala stabilnost in kompatibilnost mešanic treh učinkovin. Učinkovine in njihove najvišje končne koncentracije v mešanici so bile naslednje:

1. mešanica: morfinijev klorid (41,66 mg/mL), natrijev deksametazonfosfat (0,34 mg/mL) ter midazolam (0,42 mg/mL) ali haloperidol (0,42 mg/mL),
2. mešanica: morfinijev klorid (23,81 mg/mL), natrijev deksametazonfosfat (0,23 mg/mL) ter midazolam (0,48 mg/mL) ali haloperidol (0,48 mg/mL).

Vse mešanice so shranjevali 28 dni pri 22°C, zaščiteno pred svetlobo. Pri prvi mešanici ni bilo vidnih nobenih sprememb tekom študije. Pri drugi mešanici pa je pri nekaterih vzorcih prišlo do tvorbe majhnih kristalov na dnu vsebnika. Ti kristali so nastali zaradi majhne spremembe v sobni temperaturi in v prisotnosti delčkov praha v raztopini, ki delujejo kot kristalizacijska jedra. HPLC analiza na koncu je pokazala, da je po 28 dneh ostalo v mešanicah vsaj 96% midazolama, 98% haloperidola, 97% natrijevega deksametazonfosfata in vsaj 99,5% morfinijevega klorida (34).

1.4.4.3 Stabilnost in kompatibilnost protibolečinskih mešanic v prenosni črpalki

Narejeno je bilo tudi nekaj stabilnostnih študij protibolečinskih mešanic v prenosnih črpalkah, ki se uporabljajo za epiduralno aplikacijo.

Wulf in sodelavci (1994) so preučevali stabilnost mešanice morfinijevega klorida, bupivakainijevega klorida in klonidinijskega klorida v prenosni črpalki. S HPLC analizo so

ugotovili, da se je koncentracija teh treh učinkovin stalno povečevala in po 90 dneh dosegla od 112 do 116% začetne koncentracije. Najverjetnejši razlog za to je bilo izhlapevanje. Različne temperature shranjevanja niso imele vpliva na stabilnost mešanice. Obenem niso zaznali vizualnih sprememb mešanice (sprememba barve, obarvanje) (37).

Hildebrand in sodelavci (2003) so preučevali stabilnost in kompatibilnost morfinijevega sulfata in klonidinijevega klorida v prenosni infuzijski črpalki s HPLC metodo. Učinkovini so shranjevali 90 dni pri 37°C. Njihove ugotovitve so bile, da koncentraciji obeh učinkovin ostaneta nad 94% začetnih koncentracij. Pri višjih koncentracijah morfina v mešanici so opazili rahlo rumeno obarvanje raztopine po pripravi mešanice, ki pa je ves čas študije ostala nespremenjena. To obarvanje je nastalo zaradi oksidativnih razpadnih produktov morfina, to sta predvsem psevdomorfin in morfin-*N*-oksid. Drugih vizualnih sprememb mešanic ni bilo (38).

Classen in sodelavci (2004) so v študiji testirali stabilnost mešanice morfinijevega sulfata, bupivakainijevega klorida in klonidinijevega klorida v prenosni infuzijski črpalki. Vzorce so shranjevali 90 dni pri 37°C, zaščiteni pred svetlobo. Vse učinkovine so bile stabilne, saj so njihove koncentracije dobljene s HPLC analizo po 90 dneh ostale nad 96%. Tudi pri tej študiji so opazili obarvanje raztopine iz brezbarvne v rahlo rumeno, in sicer med 30. in 60. dnevom opazovanja. Drugih vizualnih sprememb v mešanici niso opazili (39).

2 NAMEN DELA

Rakave bolnike v terminalnem stadiju pogosto spremlja močna bolečina. Protibolečinske mešanice za podkožno aplikacijo so pri teh bolnikih bistvenega pomena, saj jim ustrezno lajšajo bolečino in izboljšajo kakovost življenja. Mešanice so sestavljene iz več zdravilnih učinkovin, ki so lahko iz iste ali iz različnih terapevtskih skupin zdravilnih učinkovin, in se individualno prilagajajo vsakemu bolniku posebej. Tudi v lekarni na Onkološkem inštitutu Ljubljana izdelujejo takšne mešanice, ki jih polnijo v elastomerne balonske črpalke.

V literaturi najdemo stabilnostne in kompatibilnostne podatke za 2 učinkovini. Za 3 ali več učinkovin je takih podatkov malo. Še manj pa je bilo narejenih stabilnostnih študij za več učinkovin v elastomernih črpalkah. V lekarni na Onkološkem inštitutu Ljubljana izdelujejo mešanice, kjer se lahko pojavi tudi do 6 učinkovin. Čeprav so take mešanice vsakdanja praksa, pa stabilnostnih in kompatibilnostnih podatkov ne najdemo v literaturi.

Namen našega dela je razviti in optimizirati stabilnostno indikativno HPLC metodo za spremljanje stabilnosti mešanice vseh sedmih zdravilnih učinkovin, ki se najpogosteje pojavljajo v mešanicah (morfinijev sulfat, metoklopramid, deksametazonfosfat, midazolam, ketamin, haloperidol, lidokain). Za ustrezno selektivnost od morebitnih razpadnih produktov si bomo pomagali z analizo stresnih vzorcev naših učinkovin. Primernost naše metode bomo ovrednotili z validacijskimi testi.

Nato bo sledila stabilnostna študija. Preučevali bomo 5 različnih mešanic (mešanica 3, 4, 5, 6 in 7 učinkovin) pri treh različnih pogojih shranjevanja (vpliv svetlobe in temperature). Najprej bomo opravili stabilnostno študijo v enodnevnih elastomernih črpalkah, nato pa še v steklenih vsebnikih. Pri tem bomo tudi vizualno opazovali mešanice in bili pozorni na morebitne inkompatibilnosti. Nazadnje bomo spremljali mešanico 5 učinkovin v sedemdnevni elastomernih črpalkah pri treh različnih pogojih shranjevanja. Za razliko od študije v enodnevnih črpalkah bomo sedemdnevne črpalke pustili teči in tako čim boljše simulirali realne pogoje. Obenem se bomo soočili tudi s problematiko elastomernih črpalk (npr. odstopanje pretoka od specificirane vrednosti).

Na Onkološkem inštitutu Ljubljana se pripravlja knjižica navodil za polnjenje in uporabo protibolečinskih mešanic za elastomerne črpalke, ki bo na voljo vsemu zdravstvenemu osebju (zdravnikom, farmacevtom, medicinskim sestram) v Sloveniji. Pri tem projektu bodo koristni tudi podatki, ki jih bomo pridobili v tej stabilnostni in kompatibilnostni študiji.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Zdravila (raztopine za injiciranje)

- lidokainijev klorid 10%, polni Klinični center Ljubljana, serija 7579, uporabno do 22.06.2010,
- natrijev klorid 9 mg/mL, raztopina za infundiranje Braun, proizvajalec Braun, serijska št.: 9506A231, uporabno do 11/2012,
- MSI 200 mg Mundipharma[®] 200 mg/ 10 mL raztopina za injiciranje, učinkovina: morfinijev sulfat, proizvajalec Mundipharma, serijska št.: 10048462, uporabno do 12/2011,
- MSI 20 mg Mundipharma[®] 20 mg/ 1 mL raztopina za injiciranje, učinkovina: morfinijev sulfat, proizvajalec Mundipharma, serijska št.: 10048461, uporabno do 11/2011,
- Haldol[®] raztopina za injiciranje, 5 mg/ 1 mL, učinkovina haloperidol, proizvajalec Krka, serijska št.: A46078 0109, uporabno do 01/2014,
- Dexamethasone Krka 4 mg/ 1 mL raztopina za injiciranje, učinkovina deksametazonfosfat, proizvajalec Krka, serijska št.: A46802 0709, uporabno do 07/2014,
- Reglan[®] 10 mg/ 2 mL raztopina za injiciranje, učinkovina metoklopramidijev klorid, proizvajalec Alkaloid Skopje, serijska št.: 10456 0708, uporabno do 07/2011,
- Ketanest[®] S 25 mg/mL raztopina za injiciranje, učinkovina ketaminijev klorid, proizvajalec Pfizer, serijska št.: 9NP001, uporabno do 10/2011,
- Midazolam Torrex, 5 mg/mL raztopina za injiciranje, učinkovina midazolam, proizvajalec Torrex Chiesi, serijska št.: M6S391, uporabno do 02/2012.

3.1.2 Naprave in pribor

- vorteks Lab dancer (IKA),
- pH meter MA 5736 (Iskra),
- magnetno mešalo HI 190M (HANNA instruments),
- digitalna tehtnica AB54-S (Mettler Toledo),
- tehtnica EXACTA 300 ES,
- tehtnica EXACTA 2200 ES,
- ultrazvočna kadička Sonis 4 (Iskra pio d.o.o.),
- sistem za pripravo miliQ vode (Millipore),
- vodna kopel WB 13 (Kambič Anton),
- klimatska komora Vötsch VC 4034,
- termometer in higrometer TFA Swiss Precision Sensor,
- hladilnik LTH,
- zamrzovalnik Gorenje,
- sistem za filtriranje Sartorius,
- celulozno - acetatni filter z velikostjo por 0,2 μm (Sartorius),
- avtomatske pipete: 20-200 μL in 200-1000 μL (Eppendorf), nastavki za pipete,
- epice, plastične epruvete za centrifugiranje, 2-mL in 5-mL vialne,
- stekleni inventar: čaše, merilne bučke, kapalke, tehtiči, merilni valji, polnilne pipete,
- ostalo: spatula, škarje, papir, označevalec besedila, Parafilm M[®],
- HPLC sistem Agilent 1200/1100 Series:
 - kvarterna črpalka (1100 Series),
 - razplinjevalec (1100 Series),
 - avtomatski vzorčevalnik (1200 Series),
 - termostat za kolono (1200 Series),
 - UV detektor (1100 Series),
 - ChemStation programska oprema,
- kromatografske kolone:
 - ZORBAX Eclipse Plus C18, 150 \times 4,6 mm, 5 μm , Agilent Technologies,
 - Synergi Fusion-RP, 250 \times 4,60 mm, 4 μm , Phenomenex[®],

- Luna C18(2) 100A, 250 × 4,60 mm, 5 μm, Phenomenex[®],
- enodnevne elastomerne črpalke Baxter singleday infusor C1071, pretok 2 mL/h,
- sedemdnevne elastomerne črpalke Baxter infusor LV C1087K, pretok 1,5 mL/h,
- injekcijske brizge (1 mL, 2,5 mL, 10 mL, 30 mL, 60 mL), igle,
- preobleka za delo v aseptični komori (sterilna obutev, plašč, pokrivalo, rokavice, obrazna maska),
- pribor za delo v aseptični komori (dezinficiens, sterilne neprašne krpe).

3.1.3 Topila, raztopine, reagenti

- metanol CHROMASOLV[®], CH₃OH, 1L = 0,79 kg, Mr = 32,04 g/mol, Sigma-Aldrich[®],
- acetonitril CHROMASOLV[®] CH₃CN, 1L = 0,78 kg, Mr = 41,05 g/mol, Sigma-Aldrich[®],
- KH₂PO₄ (kalijev dihidrogenfosfat) – p.a.; Mr = 136,09 g/mol, Merck,
- Na₂HPO₄ (dinatrijev hidrogenfosfat) – p.a.; Mr = 141,96 g/mol, Merck,
- H₃PO₄ (ortofosforjeva kislina, 85 %) – p.a., Mr = 98,00 g/mol, Merck,
- HCl (klorovodikova kislina) – Titrisol[®] - p.a.; za 1 M raztopino, Merck,
- NaOH (natrijev hidroksid) – p.a., Titrisol[®]; za 1 M raztopino, Merck,
- H₂O₂ (vodikov peroksid), 30 % raztopina, 100 mL, Fluka,
- C₈H₁₇NaSO₄ (natrijev oktilsulfat) Mr = 232,28 g/mol, Merck,
- puferska raztopina pH = 7,00 (fosfat), KEFOLAB d.o.o.,
- puferska raztopina pH = 4,00 (fosfat), KEFOLAB d.o.o.,
- miliQ voda, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana.

3.2 RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA HPLC METODE

3.2.1 Priprava vodne mobilne faze

Pufer 1:

Pufer smo pripravili tako, da smo natehtali 680,5 mg KH₂PO₄ in ga kvantitativno prenesli v 1-L merilno bučo, ga raztopili v miliQ vodi in dopolnili do oznake ter dobro premešali. Koncentracija pripravljene raztopine je bila 5 mmol/L. Nato smo z uporabo 85% H₃PO₄ po

kapljicah uravnali pH pufra na vrednost 3,70. Puffer smo nato filtrirali s pomočjo vakuumskega filtrirnega sistema preko celulozno-acetatnega filtra z velikostjo por 0,2 μm . Nazadnje smo puffer degazirali, tako da smo steklenico s pufrom dali v ultrazvočno kadičko za 15 minut.

Puffer 2:

Puffer smo pripravili tako, da smo natehtali 1420 mg Na_2HPO_4 in ga kvantitativno prenesli v 2-L merilno bučo, ga raztopili v miliQ vodi in dopolnili do oznake ter dobro premešali. Koncentracija pripravljene raztopine je bila 5 mmol/L. Nato smo z uporabo 85% H_3PO_4 po kapljicah uravnali pH pufra na vrednost 6,80. Puffer smo nato filtrirali s pomočjo vakuumskega filtrirnega sistema preko celulozno-acetatnega filtra z velikostjo por 0,2 μm . Nazadnje smo puffer degazirali, tako da smo steklenico s pufrom dali v ultrazvočno kadičko za 15 minut.

Puffer 3:

Puffer smo pripravili tako, da smo natehtali 355 mg Na_2HPO_4 in 290 mg natrijevega oktilsulfata ter vse skupaj kvantitativno prenesli v 500-mL merilno bučo. Nato smo to raztopili v miliQ vodi in dopolnili do oznake ter dobro premešali. Koncentracija pripravljene Na_2HPO_4 je bila 5 mmol/L, koncentracija natrijevega oktilsulfata pa 2,5 mmol/L. Nato smo z uporabo 85% H_3PO_4 po kapljicah uravnali pH pufra na vrednost 6,80. Puffer smo nato filtrirali s pomočjo vakuumskega filtrirnega sistema preko celulozno-acetatnega filtra z velikostjo por 0,2 μm . Nazadnje smo puffer 15 minut degazirali v ultrazvočni kadički.

0,01% H_3PO_4 :

Raztopino smo pripravili iz 85% H_3PO_4 , in sicer tako, da smo 59 μL te osnovne raztopine odpipetirali v 500-mL bučko in nato z miliQ vodo dopolnili do oznake ter dobro premešali. Raztopina je imela pH 2,95. Tudi to vodno mobilno fazo smo degazirali 15 minut.

3.2.2 Priprava stresnih vzorcev

Stresne vzorce smo pripravljali v epicah. Stresno smo testirali vsako posamezno učinkovino, in sicer pri petih različnih pogojih: sobna temperatura (22–26°C), povišana temperatura (80°C), bazični medij, kisli medij, dodatek vodikovega peroksida. Tako smo dobili 35 stresnih vzorcev. Vzorce smo pripravili tako, da smo za določeno učinkovino pri vseh pogojih dali isti volumen zdravil (raztopin), ki vsebuje to učinkovino (preglednica V). Za testiranje pri sobni temperaturi in pri temperaturi 80°C (vodna kopel) smo vzorce pripravili tako, da smo vsaki raztopini za injiciranje dodali 0,9% NaCl do skupnega volumna 1 mL. Za testiranje v kisljih pogojih smo vsaki raztopini za injiciranje dodali 500 µL 1 M HCl in nato še 0,9% NaCl do 1 mL. Pred analizo smo vzorec nevtralizirali s 500 µL 1 M NaOH. Za testiranje v bazičnih pogojih pa smo vsaki raztopini za injiciranje dodali 500 µL 1 M NaOH in nato še 0,9% NaCl do 1 mL. Pred analizo smo vzorec nevtralizirali s 500 µL 1 M HCl. Zadnji pogoj stresnega testiranja pa je bil dodatek vodikovega peroksida. Priprava teh vzorcev je bila takšna, da smo vsaki raztopini za injiciranje dodali 100 µL 30% H₂O₂ in 0,9% NaCl do 1 mL. Vse vzorce smo pustili pod temi pogoji en teden in jih nato analizirali.

Preglednica V: Osnovne koncentracije učinkovin v zdravilu in volumni zdravil (raztopin) v stresnih vzorcih

učinkovina	osnovna koncentracija [mg/mL]	volumen v stresnih vzorcih [µL]
morfinijev sulfat	20	100
deksametazonfosfat	4	100
metoklopramid	5	200
ketamin	25	80
midazolam	5	100
haloperidol	5	100
lidokain	100	40

3.2.3 Razvoj kromatografskih pogojev

V preglednici VI so predstavljene nekatere ključne metode s kromatografskimi pogoji, ki smo jih uporabili pri razvoju in optimizaciji končne metode.

Preglednica VI: Kromatografski pogoji metod uporabljeni pri razvoju metode

metoda	kolona	program MF	vodna faza MF	V _{inj}	T	λ	Φ
1	Luna C18(2)	10–95% ACN v 20 min	5 mmol/L fosfatni pufer, pH = 3,70	1	25	210	1
2	Luna C18(2)	20–50% ACN v 20 min	5 mmol/L fosfatni pufer, pH = 3,70	1	25	210	1
3	Luna C18(2)	5–10% ACN v 5 min; 10–30% ACN v 5–15 min; 30–50% ACN v 15–20 min	0,01% H ₃ PO ₄ , pH = 2,95	1	25	210	1
4	Synergi Fusion-RP	5–10% ACN v 5 min; 10–20% ACN v 5–20 min; 20–50% ACN v 20–25 min	0,01% H ₃ PO ₄ , pH = 2,95	1	25	210	1
5	Synergi Fusion-RP	40–80% ACN v 15 min; 80% ACN 15–25 min	5 mmol/L fosfatni pufer, pH = 6,80	1	25	210	1
6	ZORBAX Eclipse Plus C18	20–35% ACN v 20 min; 35–50% ACN v 20–25 min	5 mmol/L fosfatni pufer + 2,5 mmol Na oktilsulfat, pH = 6,80	1	25	210	1
7	ZORBAX Eclipse Plus C18	25–40% ACN v 10 min; 40–50% ACN v 10–20 min; 50% ACN 20–25 min	5 mmol/L fosfatni pufer + 2,5 mmol Na oktilsulfat, pH = 6,80	1	25	210	1
8	ZORBAX Eclipse Plus C18	25–40% ACN v 10 min	5 mmol/L fosfatni pufer + 2,5 mmol Na oktilsulfat, pH = 6,80	1	25	210	1
9	ZORBAX Eclipse Plus C18	20–40% ACN v 10 min; 40–50% ACN v 10–20 min	5 mmol/L fosfatni pufer, pH = 6,80	1	25	210	1
10	ZORBAX Eclipse Plus C18	20–30% ACN v 5 min; 30–50% ACN v 5–10 min; 50–60% ACN v 10–20 min	5 mmol/L fosfatni pufer, pH = 6,80	1	40	210	1
11	ZORBAX Eclipse Plus C18	15–30% ACN v 5 min; 30–45% ACN v 5–7 min; 45–55% ACN v 7–13 min	5 mmol/L fosfatni pufer, pH = 6,80	1	40	210	1,5
12	ZORBAX Eclipse Plus C18	15–25% ACN v 5 min; 25–45% ACN v 5–7 min; 45% ACN 7–4 min	5 mmol/L fosfatni pufer, pH = 6,80	1	40	210	1,5
13	ZORBAX Eclipse Plus C18	20% ACN 5 min; 20–45% ACN v 5–7 min; 45% ACN 7–14 min	5 mmol/L fosfatni pufer, pH = 6,80	1	45	240	1,5
14	ZORBAX Eclipse Plus C18	20% ACN 5 min; 20–45% ACN v 5–7 min; 45% ACN 7–14 min	5 mmol/L fosfatni pufer, pH = 6,80	0,5	40	254	1,5
15	ZORBAX Eclipse Plus C18	20% ACN 5 min; 20–45% ACN v 5–7 min; 45% ACN 7–14 min	5 mmol/L fosfatni pufer, pH = 6,80	5	40	254	1,5

V_{inj} – volumen injiciranja [μL] λ – valovna dolžina detektorja [nm]

T – temperatura kolone [°C] Φ – pretok mobilne faze [mL/min]

3.2.4 Končni kromatografski pogoji HPLC metode

- kolona ZORBAX Eclipse Plus C18, 150 × 4,6 mm, 5 μm,
- temperatura kolone: 40°C,
- mobilna faza: 5 mmol/L fosfatni pufer, pH = 6,80 in acetonitril,
- gradientni program mobilne faze: 20% acetonitrila od 0 do 5 min; od 20 do 45% acetonitrila od 5 do 7 min; 45% acetonitrila od 7 do 14 min,
- pretok mobilne faze: 1,5 mL/min,
- valovna dolžina UV detektorja: 254 nm,
- volumen injiciranja: 5 μL (pri validaciji tudi 0,5 μL).

3.3 VREDNOTENJE HPLC METODE

3.3.1 Priprava vzorcev za validacijo

Validacijo smo izvedli tako, da smo validirali dve različni mešanici (mix-A in mix-B). V preglednicah VII in VIII je prikazana sestava mešanic mix-A in mix-B.

Preglednica VII: Sestava validacijske mešanice mix-A

učinkovina	začetna koncentracija [mg/mL]	volumen raztopine za validacijo [mL]	končna koncentracija [mg/mL]
morfinijev sulfat	20	1,8	7,2
deksametazonfosfat	4	0,72	0,576
metoklopramid	5	0,96	0,96
NaCl	–	1,52	–

Preglednica VIII: Sestava validacijske mešanice mix-B

učinkovina	začetna koncentracija [mg/mL]	volumen raztopine za validacijo [mL]	končna koncentracija [mg/mL]
ketamin	25	0,96	4,8
midazolam	5	0,48	0,48
haloperidol	5	0,72	0,72
lidokain	100	2,4	48
NaCl	–	0,44	–

Vsako mešanico smo pripravili trikrat (tri paralele). Mešanico smo pripravili tako, da smo raztopine za injiciranje z različnimi učinkovinami odpipetirali v 5-mL stekleno vialo. Za izdelavo umeritvene premice smo pripravili sedem raztopin različnih koncentracij (za vsako paralelo mix-A in mix-B), tako da smo odvzeli alikvote 250, 375, 500, 625, 750, 875 in 1000 μL osnovne raztopine in jih redčili v 2-mL stekleni viali z 0,9% NaCl do skupnega volumna 1 mL. Viale smo nato premešali. Vsak vzorec smo injicirali dvakrat razen vzorca 625 μL prve paralele pri obeh mešanicah, katerega smo injicirali šestkrat. Nato smo injiciranje vseh vzorcev po istem postopku ponovili še drugi in tretji dan.

Celoten tridnevni postopek validacije smo izvajali dvakrat. Prvič smo analizirali neredčene vzorce. V_{inj} je bil 0,5 μL (metoda 14). Pri drugi validaciji smo vse vzorce pred injiciranjem redčili in premešali. Redčili smo jih v razmerju 1:10, tako da smo 100 μL vzorca dodali 900 μL 0,9% NaCl. Te vzorce smo injicirali z V_{inj} 5 μL (metoda 15).

3.3.2 Vrednotenje validacijskih parametrov HPLC metode (40)

V okviru validacije smo po ICH smernicah ovrednotili selektivnost, linearnost, natančnost injiciranja, točnost, ponovljivost metode, meddnevno ponovljivost in robustnost metode.

Selektivnost

Metoda je selektivna takrat, kadar so vrhovi na kromatogramu analiziranih komponent vzorca jasno ločeni, oziroma se ne prekrivajo in ne prihaja do interferenc med komponentami. Da bi potrdili selektivnost, smo analizirali mobilno fazo brez učinkovin, stresne vzorce in mešanico treh (mix-A) in štirih (mix-B) učinkovin. Iz posnetih kromatogramov smo primerjali ločljivost kromatografskih vrhov in tako ovrednotili selektivnost naše analizne metode.

Linearnost

Linearnost je sposobnost metode, da znotraj določenega intervala zagotavlja rezultate, ki so premosorazmerni s koncentracijo preiskovane snovi v vzorcu. V ta namen določimo regresijsko premico najmanjših kvadratov odvisnosti testnih rezultatov od koncentracije preiskovane substance. Rezultat regresijske analize eksperimentalnih podatkov je umeritvena premica z enačbo $y = bx + a$, pri čemer je y odziv (površina ali višina kromatografskih vrhov), a odsek na ordinati in b naklon premice. Korelacijo med odzivom in koncentracijo podajamo s Pearsonovim koeficientom (r) oziroma determinacijskim koeficientom (r^2), ki ima pri popolni linearni povezavi vrednost 1, v realnih sistemih pa se poskušamo čim bolj približati vrednosti 1. Za ugotavljanje linearnosti ICH smernice priporočajo najmanj 5 koncentracij.

Mi smo izdelali umeritveno premico iz sedmih točk z metodo najmanjših kvadratov odklonov povprečnih odzivov v odvisnosti od koncentracij pripravljenih vzorcev. Za vsako učinkovino v mešanici smo določili pripadajočo enačbo umeritvene premice, linearno območje in determinacijski koeficient, za katerega smo si postavili mejo $r^2 \geq 0,99$.

Natančnost injiciranja

Natančnost injiciranja je stopnja skladanja med posameznimi odzivi pri večkratni ponovitvi analize istega vzorca. Merilo za natančnost je standardni odklon (SD) in relativni standardni odklon (RSD), ki se ga izračuna po enačbah 1 in 2. Kriterij za natančnost injiciranja je $RSD \leq 2\%$.

Enačba 1: Standardni odklon Enačba 2: Relativni standardni odklon, izražen v odstotkih

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (1) \qquad RSD = \frac{100}{x} \cdot \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2)$$

\bar{x} : srednja vrednost odzivov

x_i : odziv (višina ali površina)

n : število meritev

V našem primeru smo natančnost injiciranja vrednotili tako, da smo vzorec točke 625 μL iz umeritvene premice prve paralele pri mix-A in mix-B šestkrat zaporedoma injicirali in izračunali relativni standardni odklon.

Ponovljivost metode

Ponovljivost metode je stopnja skladanja med posameznimi odzivi pri večkratni pripravi enakih vzorcev. ICH smernice Q2(R1) priporočajo oceno ponovljivosti pri treh različnih koncentracijah, ki pokrivajo specificirano območje (tri različne koncentracije in tri ponovitve pri vsaki od njih). Kriterij za ponovljivost metode je $RSD \leq 2\%$.

Mi smo ponovljivost metode vrednotili tako, da smo za obe validacijski mešanici pripravili tri paralelke. Po analizi vzorcev smo primerjali rezultate med paralelami za vsako učinkovino posebej pri vseh koncentracijskih točkah. Rezultate smo nato podali s povprečnim RSD za vsako učinkovino.

Meddnevna ponovljivost

Meddnevno ponovljivost smo vrednotili tako, da smo celoten postopek validacije vseh parametrov izpeljali trikrat, in sicer tri dni zapored. Nato smo za vsako učinkovino pri vseh koncentracijskih točkah primerjali rezultate med dnevi in jih vrednotili s povprečnim RSD za vsako učinkovino. Kriterij za meddnevno ponovljivost je $RSD \leq 2\%$.

Točnost

Točnost ali pravilnost rezultatov je merilo za ujemanje rezultatov z dejansko vrednostjo. Pri tem ugotavljamo odstopanje povprečja dobljenih rezultatov od dejanske vrednosti. Iz enačbe umeritvene premice analizirane spojine izračunamo koncentracijo, ki ustreza izmerjenemu odzivu (površini ali višini), ter na osnovi te izračunamo razliko med znano količino analizirane spojine in količino, izračunano iz umeritvene premice. Tudi pri točnosti ICH smernice Q2(R1) priporočajo oceno točnosti pri treh različnih koncentracijah, ki pokrivajo specificirano območje (tri različne koncentracije in tri ponovitve pri vsaki od njih). Podatke predstavimo kot razliko med izmerjenimi in pravimi vrednostmi.

Točnost izračunamo po enačbi 3.

Enačba 3: Izračun točnosti

$$\text{točnost [\%]} = (C_i / C_t) \times 100 \quad (3)$$

C_t – teoretična (deklarirana) koncentracija

C_i – izmerjena koncentracija

Iz izmerjenih odzivov smo z enačbo umeritvene premice izračunali koncentracije za vsako učinkovino. Nato smo po enačbi 3 izračunali točnost čez celotno območje linearosti (7 koncentracijskih točk) za vsako učinkovino posebej. Pravilnost rezultatov smo podali kot interval med najnižjo in najvišjo vrednostjo točnosti. Točnost naj bo v območju $100 \pm 2\%$.

Robustnost

Robustnost je definirana s stopnjo ponovljivosti rezultatov, dobljenih z analizo istih vzorcev pri različnih pogojih analize.

Robustnost metode je občutljivost analiznega postopka na spremembe različnih faktorjev.

Ustrezna robustnost metode je bila potrjena že med razvojem metode, ko smo spreminjali različne faktorje kot so sestava mobilne faze, temperatura kolone, pretok mobilne faze ... (preglednica VI).

V okviru robustnosti smo opredelili tudi stabilnost vzorčnih raztopin, in sicer z zamrzovanjem in odmrzovanjem vzorcev (freeze store). Vzorce smo analizirali pred zamrzovanjem in po odtajanju in rezultate ovrednotili. Kriterij ustreznosti smo opredelili kot največji odstop koncentracij pred zamrzovanjem in po odtajanju $\leq 2\%$.

3.4 STABILNOSTNE IN KOMPATIBILNOSTNE ŠTUDIJE

3.4.1 Stabilnostna in kompatibilnostna študija v enodnevnih elastomernih črpalkah

Enodnevne elastomerne črpalke s pretokom 2 mL/h smo napolnili v brezprašni komori v aseptičnem prostoru v lekarni na Onkološkem inštitutu Ljubljana. Pri postopku polnjenja smo se držali pravil, ki so opisana v poglavju 1.3.1. Volumen mešanice v črpalki je bil 50 mL. Pripravili smo mešanico 7, 6, 5, 4 in 3 učinkovin (v nadaljevanju mix-7, mix-6, mix-5, mix-4, mix-3). Sestavo petih različnih mešanic v enodnevnih elastomernih črpalkah prikazujeta preglednici IX in X. Vsako mešanico smo napolnili v 3 elastomerne črpalke (za tri različne pogoje), se pravi, da smo napolnili 15 enodnevnih elastomernih črpalk.

Preglednica IX: Volumen posameznega zdravila, ki vsebuje določeno učinkovino v posamezni mešanici v enodnevnih elastomernih črpalkah

sestava mešanic	mix-7	mix-6	mix-5	mix-4	mix-3
V (morfinijev sulfat) [mL]	12	13	15	15	15
V (deksametazonfosfat) [mL]	3	6	–	6	–
V (metoklopramid) [mL]	8	–	8	–	8
V (ketamin) [mL]	6	8	8	–	–
V (midazolam) [mL]	3	4	4	4	–
V (haloperidol) [mL]	2	6	–	6	–
V (lidokain) [mL]	16	13	15	–	20
V (NaCl) [mL]	–	–	–	19	7

Preglednica X: Koncentracija posamezne učinkovine v posamezni mešanici pri stabilnostni študiji v enodnevnih elastomernih črpalkah in steklenih vsebnikih

sestava mešanic	mix-7	mix-6	mix-5	mix-4	mix-3
c (morfinijev sulfat) [mg/mL]	4,8	5,2	6	6	6
c (deksametazonfosfat) [mg/mL]	0,24	0,48	–	0,48	–
c (metoklopramid) [mg/mL]	0,8	–	0,8	–	0,8
c (ketamin) [mg/mL]	3	4	4	–	–
c (midazolam) [mg/mL]	0,3	0,4	0,4	0,4	–
c (haloperidol) [mg/mL]	0,2	0,6	–	0,6	–
c (lidokain) [mg/mL]	32	26	30	–	40

Vsako mešanico v elastomerni črpalki smo izpostavili naslednjim trem pogojem:

1. **hv** – dnevna svetloba, sobna temperatura (22–26°C) in 36–44% relativna vlažnost
2. **ST** – tema, sobna temperatura (22–26°C) in 36–44% relativna vlažnost
3. **37°C** – tema, temperatura 37°C in 40% relativna vlažnost

Protibolečinske mešanice smo vzorčili ob času 0 ter po 1, 2, 4, 7, 10, 14, 21 in 28 dneh. Pred prvim vzorčenjem ob času 0 smo pustili, da se je izteklo približno 5 mL raztopine. Tako smo izpraznili in sprali cevko na koncu elastomerne črpalke, kjer so bili ostanki prve raztopine, s katero smo pričeli polnitev. Vzorčenje je potekalo tako, da smo odstranili zamašek na koncu cevke in pustili, da se je v epico izteklo približno 1 mL tekočine. To tekočino smo s pipeto prenesli v 2-mL stekleno vialo in jo dali zamrzniti na -20°C do analize. Pri vsakem vzorčenju smo opazovali tudi morebitne spremembe v raztopini (obarjanje, sprememba barve). Pred analizo smo vzorce odtajali in jih redčili v razmerju 1:10, in sicer tako, da smo v 2-mL vialo odpipetirali 100 µL vzorca in 900 µL 0,9% NaCl. Po stresanju vial smo vzorce analizirali. Pri vseh študijah smo rezultate koncentracij podajali v odstotkih glede na koncentracijo prve meritve ob času 0.

3.4.2 Stabilnostna in kompatibilnostna študija v steklenih vsebnikih

Enakih 5 mešanic z istimi koncentracijami kot v stabilnostni študiji v enodnevnih elastomernih črpalkah (preglednica X) smo preučevali tudi v steklenem vsebniku. Vsebniki so bile 5-mL steklene viale. Z vsako mešanico smo napolnili 3 viale. Volumni zdravil v mešanicah so bili 10-krat manjši kot pri stabilnostni študiji v enodnevnih elastomernih črpalkah (poglavje 3.3.1) in so prikazani v preglednici XI.

Preglednica XI: Volumen posameznega zdravila, ki vsebuje določeno učinkovino v posamezni mešanici v steklenih vsebnikih

sestava mešanic	mix-7	mix-6	mix-5	mix-4	mix-3
V (morfinijev sulfat) [mL]	1,2	1,3	1,5	1,5	1,5
V (deksametazonfosfat) [mL]	0,3	0,6	–	0,6	–
V (metoklopramid) [mL]	0,8	–	0,8	–	0,8
V (ketamin) [mL]	0,6	0,8	0,8	–	–
V (midazolam) [mL]	0,3	0,4	0,4	0,4	–
V (haloperidol) [mL]	0,2	0,6	–	0,6	–
V (lidokain) [mL]	1,6	1,3	1,5	–	2,0
V (NaCl) [mL]	–	–	–	1,9	0,7

Mešanice smo pripravili tako, da smo zgoraj navedene količine odpipetirali v vialo in na koncu premešali. Pri zaporedju dodajanja zdravil v mešanico smo se držali navodil, ki so opisana v poglavju 1.3.1. Tudi tukaj smo nato vsako mešanico izpostavili istim trem pogojem (hv, ST, 37°C) in tudi časi vzorčenja so bili isti kot pri študiji v elastomernih črpalkah (poglavje 3.3.1). Vzorčenje je potekalo tako, da smo odpipetirali 500 µL vzorca v epico in jo dali zamrzniti na -20°C. Pred analizo smo vzorce odtajali, jih redčili z 0,9% NaCl v razmerju 1:10 in premešali. Pri tej študiji v steklenih vsebnikih smo bili še posebej pozorni na vizualne spremembe mešanic in morebitne inkompatibilnosti, saj je bilo zaradi materiala vsebnika to lažje opazovati.

3.4.3 Preučevanje izhlapevanja vode v enodnevnih elastomernih črpalkah

Mešanico, s katero smo napolnili dve enodnevni elastomerni črpalke s pretokom 2 mL/h, smo pripravili na naslednji način: v 100-mL bučko smo odpipetirali 1,6 mL raztopine ketamina (25 mg/mL) in 1,6 mL raztopine metoklopramida (5 mg/mL). Nato smo z 0,9% NaCl dopolnili do oznake ter dobro premešali. Koncentracija teh dveh učinkovin v mešanici je bila 0,4 mg/mL za ketamin in 0,08 mg/mL za metoklopramid. Nato smo mešanico teh dveh učinkovin prelili v čašo. Črpalkama smo odstranili zamaška iz odprtine za polnjenje. Iz čaše smo s 60-mL brizgo odvzeli 50 mL in napolnili prvo elastomerno črpalko in nato še enkrat odvzeli 50 mL in napolnili še drugo. Po polnjenju smo odprtino za polnjenje zaprli z zamaškom. Črpalke sta bili izpostavljeni dvema različnima pogojema, in sicer prva pri ST in druga pri 37°C. Obe črpalke sta bili zaščiteni pred svetlobo. Elastomerni črpalke smo tehtali prazni pred polnjenjem, po prvem vzorčenju ob času 0 ter po 1, 2, 3, 6, 7, 9, 13, 20, 28 in 29 dneh. Vzorčenje je potekalo tako, da smo odstranili zamašek na koncu cevke in pustili, da se v epico izteče približno 0,5–1 mL tekočine. Po koncu vzorčenja smo nastavek na koncu cevke zaprli z zamaškom. Pri obeh črpalkah smo odvzeli 3 vzorce. Prvi je bil takoj po napolnitvi ob času 0, druga dva pa po 29 dneh. Takrat smo takoj, ko smo odstranili zamašek na koncu cevke, nastavili epico in pustili, da se nateče približno 0,5 mL vzorca. Zatem smo črpalko pustili teči približno tri ure in to raztopino zavrgli. Nato smo še drugič nastavili novo epico in odvzeli približno 1 mL vzorca. Vzorce smo do analize zamrznili pri -20°C. Pred analizo vzorcev nismo redčili.

3.4.4 Preučevanje iztekajočih se enodnevnih elastomernih črpalk

Najprej smo stehali dve prazni enodnevni elastomerni črpalke s pretokom 2 mL/h. Nato smo vsako napolnili s 60 mL 0,9% NaCl. Črpalke smo napolnili tako, da smo 60-mL brizgo nastavili preko vbodnega sistema na vsebnik s fiziološko raztopino, izbrizgali 60 mL in napolnili črpalko skozi odprtino za polnjenje. Po polnjenju smo odprtino zaprli z zamaškom. Napolnjeni črpalke smo zopet stehali. Zatem smo odprli zamašek na koncu cevke elastomerne črpalke in vstavili cevko v 500-mL bučo. Bučo smo zaprli s parafilmom. Tako je raztopina kontinuirano tekla iz črpalke v bučo. Takoj zatem smo ta dva sistema (buča + parafilm + elastomerna črpalka) stehali. To je bila meritev ob času 0.

Nato smo ti dve črpalki izpostavili dvema različnima pogojem: ST in 37°C. Po 24 urah smo sistema še enkrat stehtali. Takrat smo stehtali tudi same elastomerne črpalke, da smo lahko izračunali povprečni pretok praznjenja črpal. Celoten poizkus smo nato še enkrat ponovili.

3.4.5 Stabilnostna in kompatibilnostna študija v iztekajočih se sedemdnevnih elastomernih črpalkah in preučevanje le-teh

V brezprašni komori v aseptičnem prostoru v lekarni na Onkološkem inštitutu Ljubljana smo napolnili tri sedemdnevne elastomerne črpalke s pretokom 1,5 mL/h. Postopek polnjenja smo opisali v poglavju 1.3.1. Vse tri črpalke smo napolnili z isto mešanico petih učinkovin (mix-5b). Volumen posamezne raztopine za injiciranje in koncentracije učinkovin v končni mešanici prikazuje preglednica XII.

Preglednica XII: Volumen posameznega zdravila z določeno učinkovino in končna koncentracija učinkovin v mešanici mix-5b v sedemdnevni elastomerni črpalki

učinkovina	volumen raztopine [mL]	končna koncentracija [mg/mL]
morfinijev sulfat	35	2,70
metoklopramid	28	0,54
ketamin	28	2,70
midazolam	14	0,27
lidokain	70	27,0
NaCl	84	–

Volumen mešanice v posamezni črpalki je bil 259 mL. Tehtanje črpalke smo opravili pred napolnitvijo (prazne) in po napolnitvi. Nato smo odprli zamašek na koncu cevke in prvič vzorčili ob času 0. Vzorčili smo tako, da smo vstavili cevko v plastično epruveto in pustili da izteče približno 0,5–1 mL. Medtem pa smo plastično epruveto zaprli s parafilmom. Po prvem vzorčenju smo cevko namestili v 500-mL bučo in zaprli s parafilmom. Te tri iztekajoče se črpalke smo izpostavili trem različnim pogojem: hv, ST in 37°C.

Vzorci smo jemali ob času 0 ter po 1, 2, 5, 6, 7 in 8 dneh pri pogoju hv in ST. Pri pogoju 37°C pa smo jemali vzorce v istih časovnih intervalih, vendar samo do 6. dne. Med vsakim vzorčenjem smo bučo zaprli z zamaškom in jo stehali. Ko so se elastomerne črpalke dokončno izpraznile, smo vzeli vzorec tudi iz buče. Pred vsakim vzorčenjem, smo sisteme (buča + parafilm + elastomerna črpalka) stehali. Stehali smo tudi plastične epruvete (tako prazne kot z vzorcem), prazne buče, zamaške, parafilm. Vzorce smo dali zamrzniti na -20°C. Pred analizo smo jih odtajali in z 0,9% NaCl redčili v razmerju 1:10.

Obenem smo izračunali tudi povprečni pretok vsake elastomerne črpalke. To smo naredili tako, da smo maso iztečene raztopine pri zadnji točki tehtanja pretvorili v volumen in delili s časom.

3.4.6 Preučevanje izhlapevanja vode v sedemdnevni elastomerni črpalki

Z 0,9% NaCl smo napolnili tri sedemdnevne elastomerne črpalke s pretokom 1,5 mL/h. Črpalke smo napolnili s 60-mL brizgo. Brizgo smo preko vbodnega sistema namestili na vsebnik s fiziološko raztopino in izbrizgali raztopino ter jo izpraznili v elastomerno črpalko. To smo naredili večkrat, tako da smo vsako črpalko napolnili do 259 mL. Zatem smo na vsaki črpalki zaprli odprtino za polnjenje z zamaškom. Odstranili smo zamašek na koncu cevke dokler ni pritekla prva kapljica raztopine in nato z zamaškom zaprli odprtino. Črpalke smo nato izpostavili trem različnim pogojem: hv, ST in 37°C.

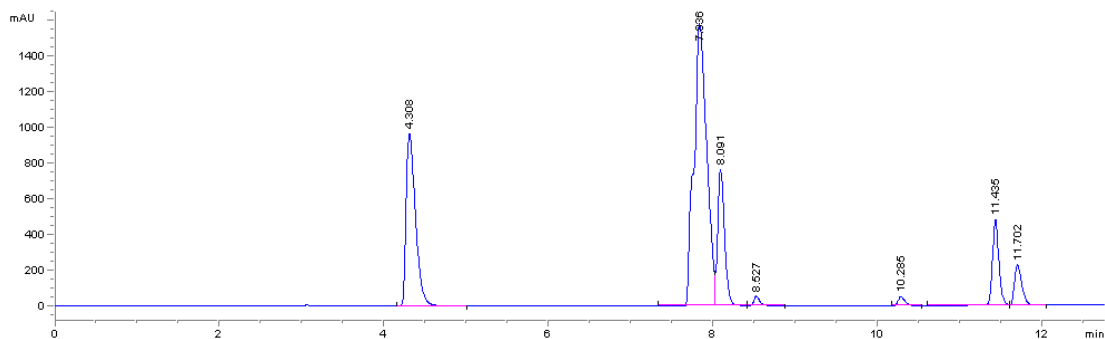
Črpalke smo tehtali pred napolnitvijo, takoj po napolnitvi ob času 0 ter 1, 2, 5, 6, in 7 dni po napolnitvi.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA HPLC METODE

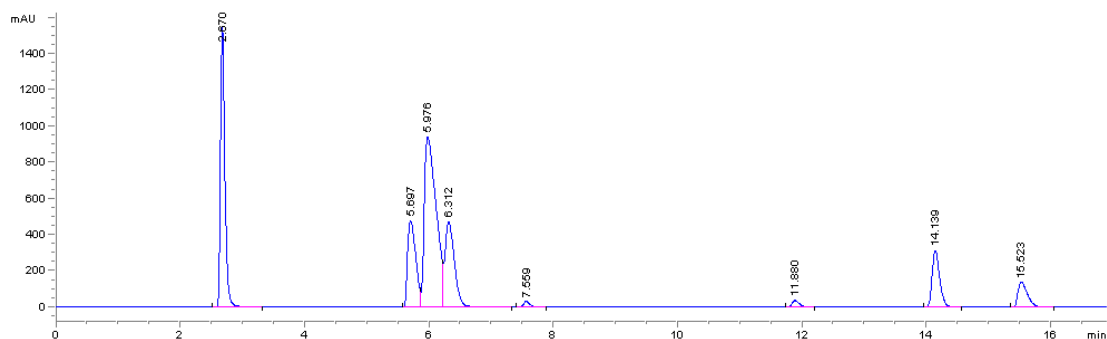
Rezultat razvoja in optimiziranja metode je predstavljen na kromatogramih, ki so prikazani na slikah od 9 do 24. Analizne metode s kromatografskimi pogoji, ki smo jih uporabili pri razvoju metode, so opisane v preglednici VI.

Na začetku smo se odločili, da uporabimo kolono Luna C18(2). Razlog za izbiro te kolone je bil ta, da imamo 7 strukturno precej različnih spojin, ki smo jih hoteli kromatografsko ločiti. Luna C18 je univerzalna kolona in je primerna za ločitev strukturno različnih spojin. Razvoj metode smo začeli tako, da smo z metodo 1 analizirali vsako zdravilo s posamezno učinkovino posebej. Pri tem smo ugotovili, da se pri analizi midazolama pojavi poleg glavnega kromatografskega vrha še en manjši vrh (potencialni razpadni produkt midazolama). Zato se pojavlja na kromatogramih analize mešanice 7 učinkovin 8 kromatografskih vrhov. Na sliki 9 je prikazan kromatogram mešanice vseh sedmih učinkovin, analiziran z metodo 1.



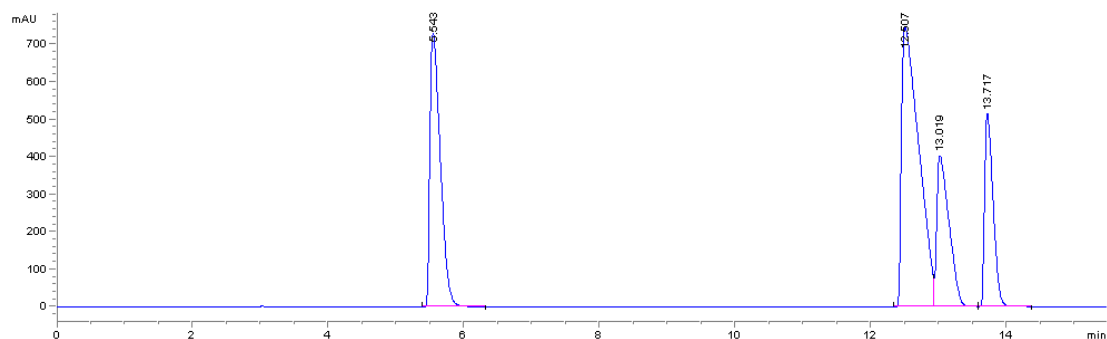
Slika 9: Kromatogram mešanice sedmih učinkovin, analiziran z metodo 1

Na sliki 10 je prikazan kromatogram analize mešanice z metodo 2. Vrstni red 8 kromatografskih vrhov od najkrajšega do najdaljšega retencijskega časa je bil: morfijev sulfat, ketamin, lidokain, metoklopramid, potencialni razpadni produkt midazolama, deksametazonfosfat, midazolam, haloperidol. Pri tej metodi je bila problematična ločitev vrhov ketamina, lidokaina in metoklopramida, saj so združeni.

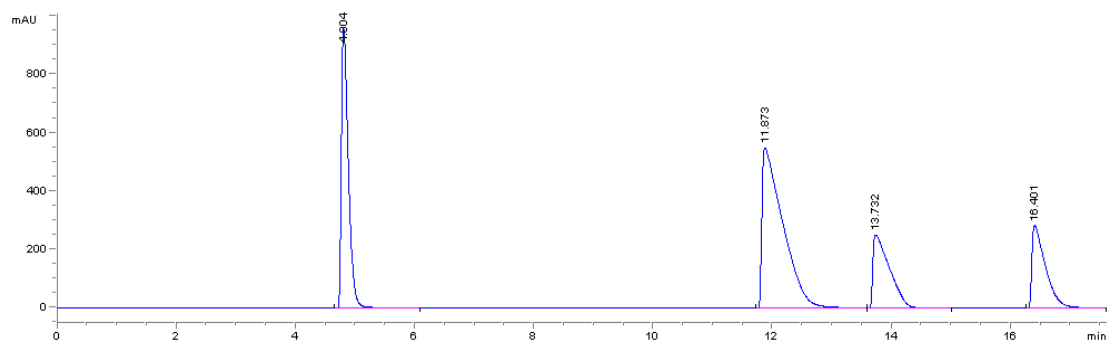


Slika 10: Kromatogram mešanice sedmih učinkovin, analiziran z metodo 2

Opisan trojček učinkovin smo skušali ločiti. Tako smo z metodo 3 in 4 analizirali mešanico teh treh učinkovin in morfinijevega sulfata. Kromatogrami so predstavljeni na slikah 11 in 12. Metoda 4, pri kateri smo zamenjali kolono, je boljša od metode 3, vendar se pri vseh 4 vrhovih pojavi rep (tailing).



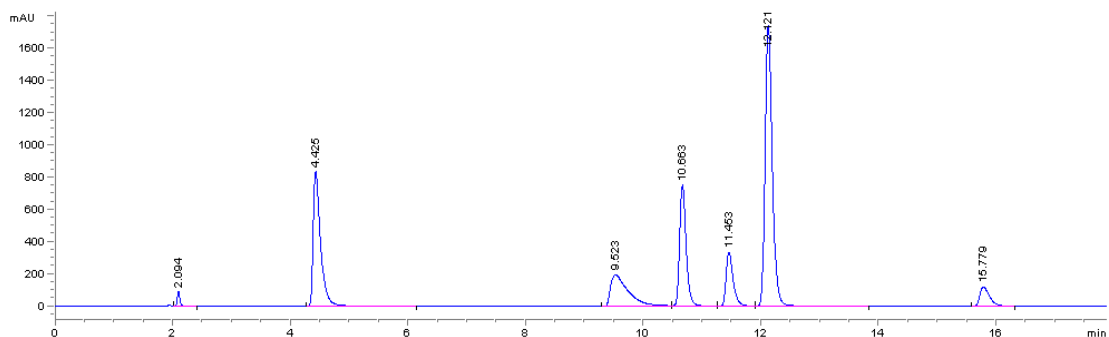
Slika 11: Kromatogram mešanice štirih učinkovin, analiziran z metodo 3



Slika 12: Kromatogram mešanice štirih učinkovin, analiziran z metodo 4

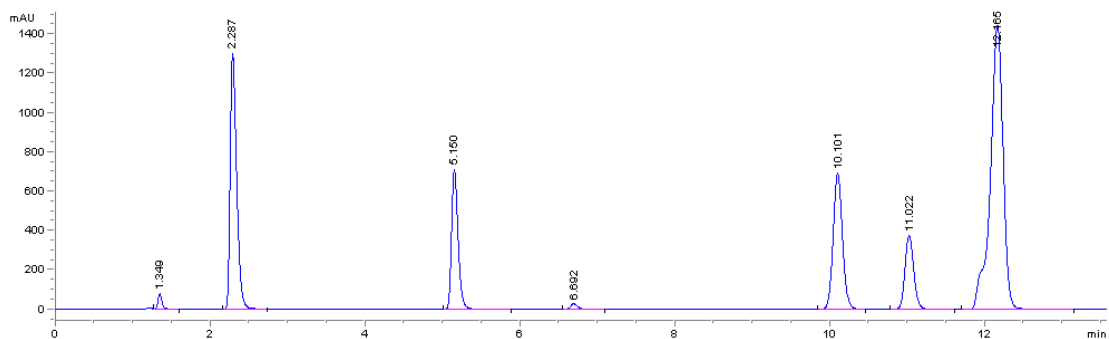
Z metodo 5 je nastal kromatogram, prikazan na sliki 13. Tukaj smo injicirali mešanico sedmih učinkovin. Pri tej metodi se na kromatogramu ni pojavil potencialni razpadni produkt midazolama. Zaradi menjave kolone se je vrstni red učinkovin na kromatogramu

spremenil. Pri metodi 5 je bilo zaporedje kromatografskih vrhov učinkovin naslednje: deksametazonfosfat, morfinijev sulfat, metoklopramid, ketamin, midazolam, lidokain in haloperidol. Pri tem kromatogramu so bili vsi vrhovi ločeni. Pri nekaterih učinkovinah so nas motili repi (tailing) vrhov. Pri metoklopramidu (3. vrh) je ta še posebej izrazit.



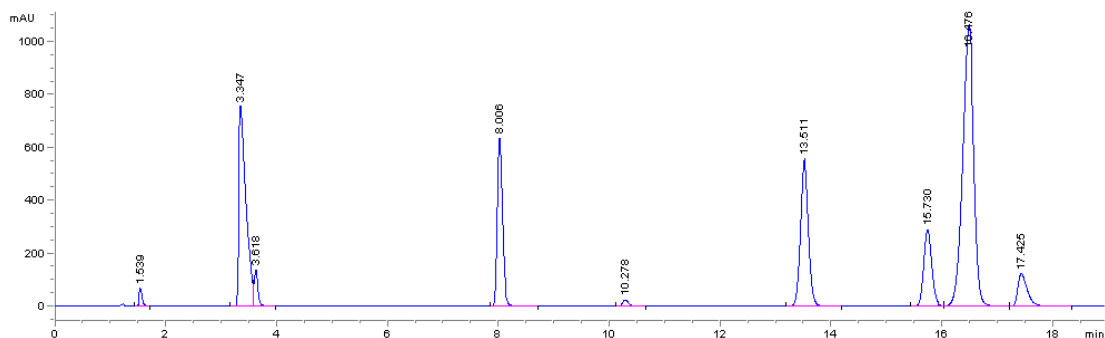
Slika 13: Kromatogram mešanice sedmih učinkovin, analiziran z metodo 5

Nato smo še enkrat zamenjali kolono. Veliko naših preučevanih spojin ima bazičen center. Sklepali smo, da se med bazičnimi centri in stacionarno fazo kolone pojavljajo interakcije in zaradi tega nastanejo repi (tailing) vrhov. Odločili za kolono ZORBAX Eclipse Plus C18, ki je bolj primerna za bazične spojine. V mobilno fazo smo dodali natrijev oktilsulfat. To je "ion pairing" reagent, ki smo ga prav tako dodali z namenom, da bi se izognili nastanku repov kromatografskih vrhov. Tako smo z metodo 6 analizirali mešanico 7 učinkovin. Na sliki 14 vidimo rezultat te metode. Zopet se je pojavilo 8 vrhov (tudi potencialni razpadni produkt midazolama). Vrstni red učinkovin je ostal isti. Edino potencialni razpadni produkt midazolama se je pojavil med metoklopramidom in ketaminom na 4. mestu. Repov kromatografskih vrhov ni bilo več, sta pa bila združena zadnja dva vrhova.



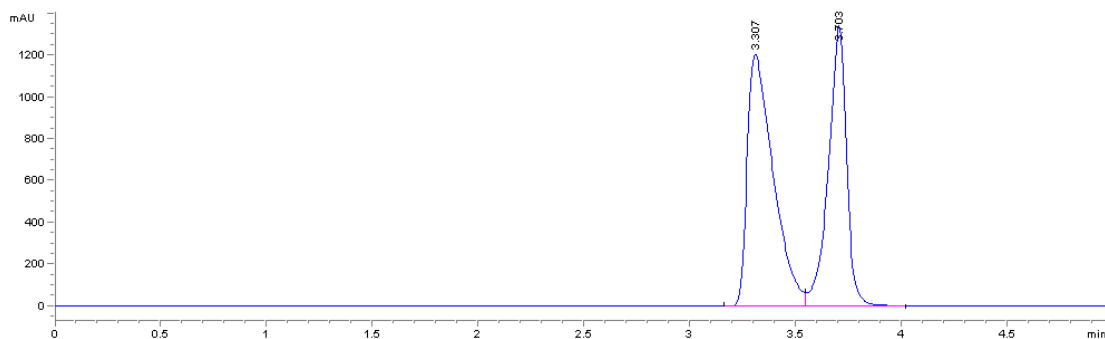
Slika 14: Kromatogram mešanice sedmih učinkovin, analiziran z metodo 6

Po nekaj poskusih spremembe gradientnega programa mobilne faze smo prišli do metode 7. Kromatogram na sliki 15 prikazuje rezultat te metode. Haloperidol smo uspešno premaknili k daljšim retencijskim časom in tako sta bila zadnja dva vrhova ločena. Pojavil pa se je nov problem. Pri kromatografskem vrhu morfina se je združen z njim pojavil še en manjši vrh. Ugotovili smo, da manj intenziven vrh izhaja iz raztopine morfinijevega sulfata.



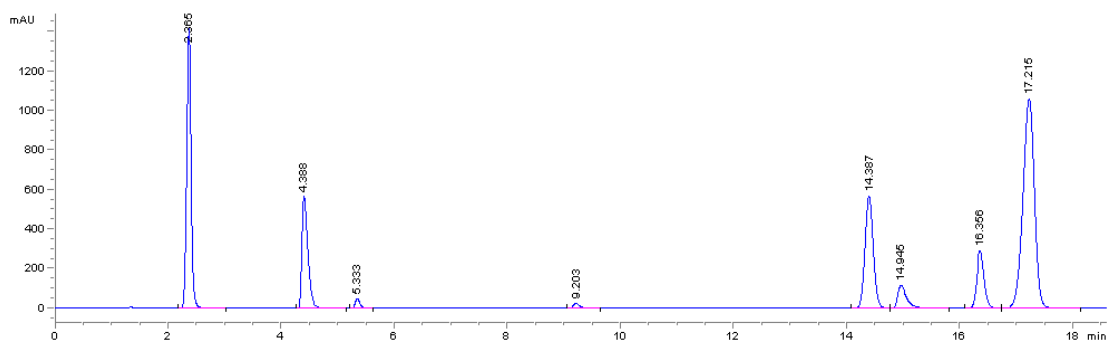
Slika 15: Kromatogram mešanice sedmih učinkovin, analiziran z metodo 7

Z injiciranjem raztopine morfinijevega sulfata smo poizkusili ločiti ta dva vrhova z različnimi programi gradientnega pretoka mobilne faze. Ugotovili smo, da se razmerje površin teh dveh vrhov pri različnih gradientnih programih spreminja. Ko smo pri pogojih metode 8 dobili kromatogram (slika 16), je bila površina obeh vrhov v približnem razmerju 50:50. Pri prejšnjem kromatogramu (slika 15) pa je bil drugi morfinski vrh precej manjši od prvega. Oba vrha smo analizirali na masnem spektrofotometru in ugotovili, da oba vrhova pripadata morfinu. Najverjetneje gre za kakšno interakcijo z natrijevim oktilsulfatom v mobilni fazi, saj se kasneje ob ukinitvi tega reagenta ta razcep morfinskega vrha ni nikoli več pojavil.



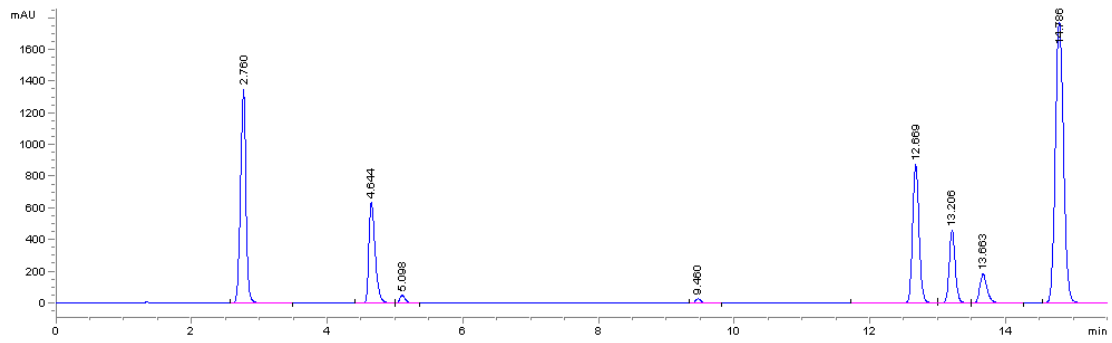
Slika 16: Kromatogram morfinijevega sulfata, analiziran z metodo 8

Po nekajkratnih poizkusih smo prišli do metode 9 in kromatograma na sliki 17. Pojavil se je nov vrstni red učinkovin, ki se v nadaljevanju ni več spremenil. Končno zaporedje kromatografskih vrhov je bilo: morfinijev sulfat, metoklopramid, deksametazonfosfat, potencialni razpadni produkt midazolama, ketamin, midazolam, haloperidol in lidokain.

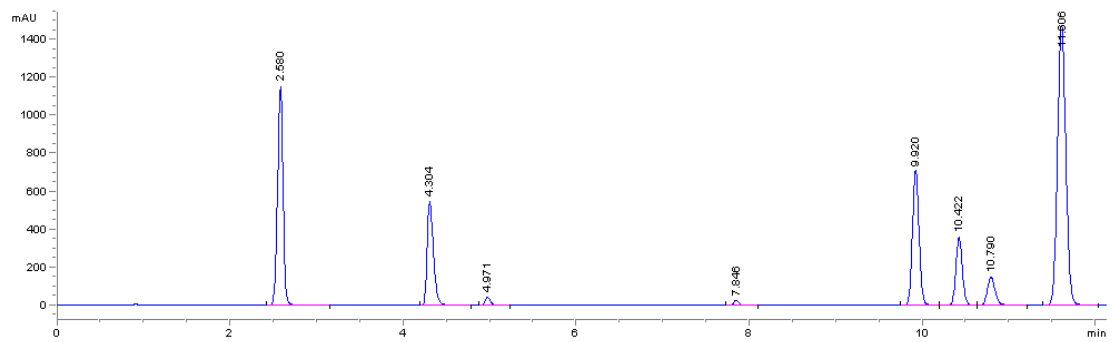


Slika 17: Kromatogram mešanice sedmih učinkovin, analiziran z metodo 9

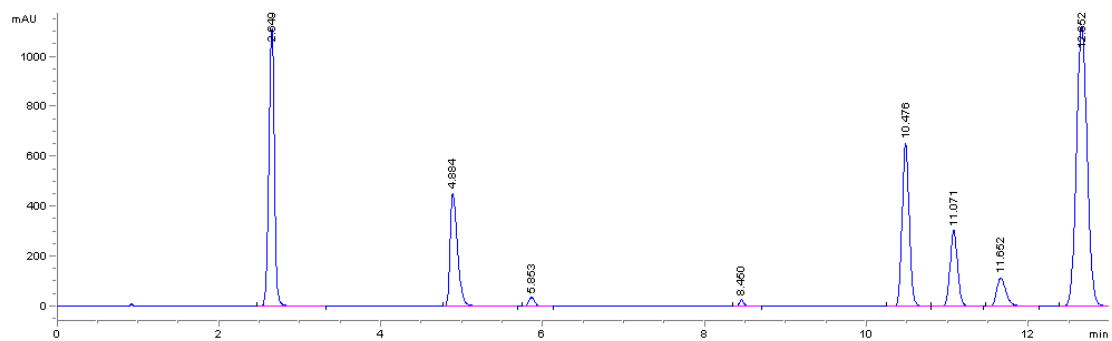
Nato pa smo z metodami od 10 do 15 prišli do naše končne metode, kjer smo z manjšimi spremembami skušali izboljšati ločljivost metode. Slike od 18 do 22 prikazujejo kromatograme končnega optimiziranja naše metode. V zadnjem delu razvoja smo povišali temperaturo kolone, da so vrhovi postali bolj ozki in simetrični. Povečali smo pretok mobilne faze in s tem ob ustrezni ločljivosti zmanjšali čas analize. Spreminjali smo tudi valovno dolžino detektorja. Izbrali smo tako valovno dolžino, da se končno razmerje odzivov učinkovin med seboj niso preveč razlikovali zaradi velike razlike koncentracij v preiskovanih mešanicah. Problematičen je bil predvsem lidokain, saj so njegove koncentracije v protibolečinskih mešanicah in posledično tudi v nekaterih mešanicah v naši stabilnostni študiji celo več kot 100-krat večje kot koncentracije nekaterih drugih učinkovin. Zadnji dve metodi se razlikujeta le v volumnu injiciranja, ki smo jih uporabili pri validaciji.



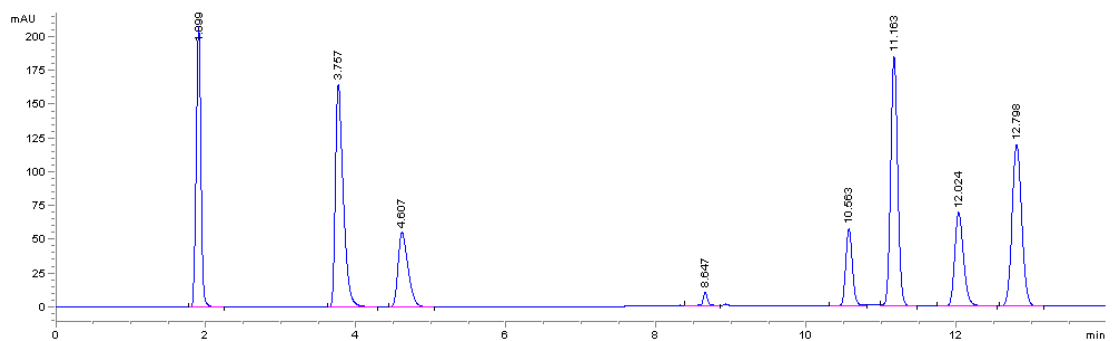
Slika 18: Kromatogram mešanice sedmih učinkovin, analiziran z metodo 10



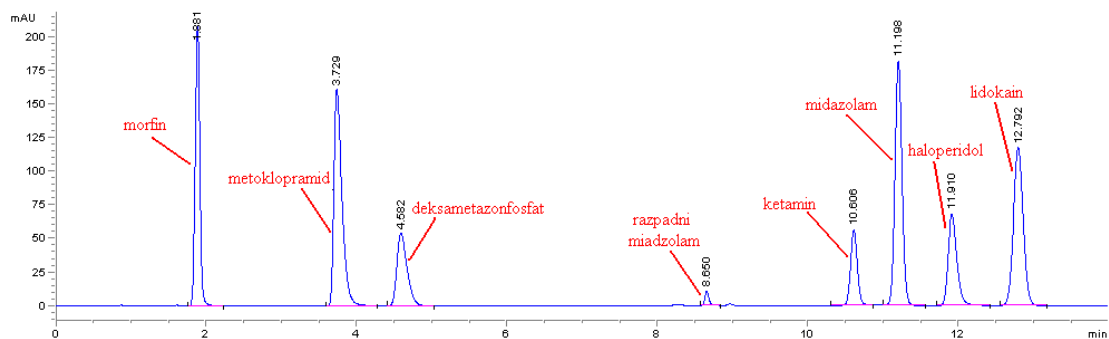
Slika 19: Kromatogram mešanice sedmih učinkovin, analiziran z metodo 11



Slika 20: Kromatogram mešanice sedmih učinkovin, analiziran z metodo 12

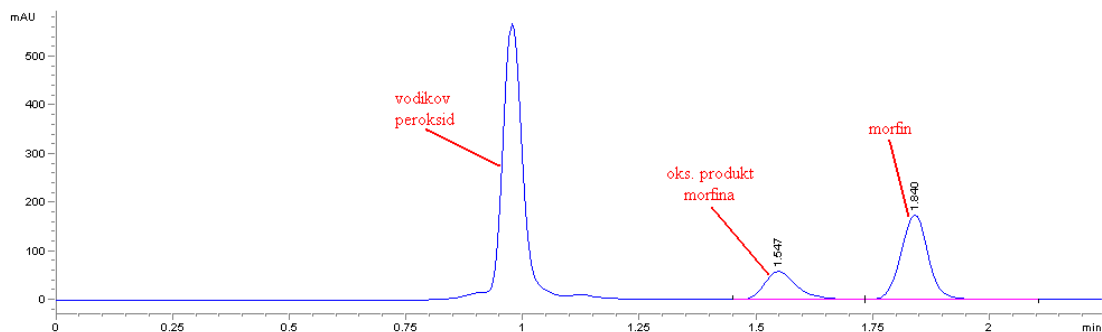


Slika 21: Kromatogram mešanice sedmih učinkovin, analiziran z metodo 13



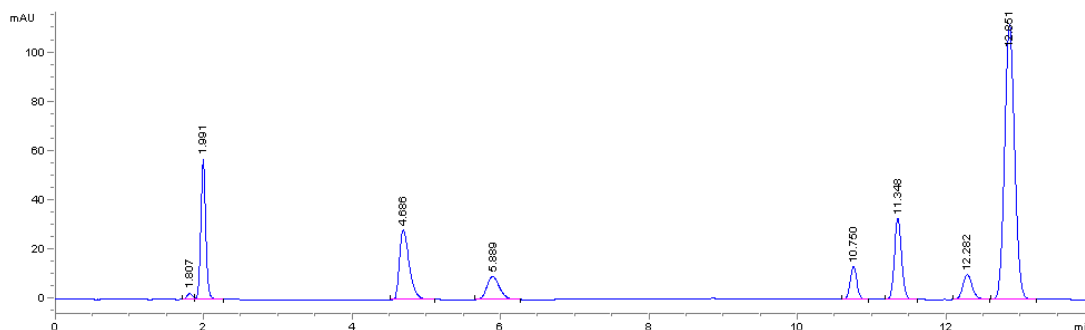
Slika 22: Kromatogram mešanice sedmih učinkovin, analiziran z metodo 14

Pozorni smo bili tudi na morebitne razpadne produkte učinkovin, ki smo jih dobili s stresnim testiranjem, in njihovo ločitev od ostalih vrhov. Primer takšne učinkovine je morfín in njegov oksidacijski razpadni produkt, ki se kasneje pojavlja v stabilnostni študiji. Ločitev morfína in njegovega oksidacijskega razpadnega produkta pri stresnem vzorcu morfínijskega sulfata z vodikovim peroksidom s končno metodo prikazuje kromatogram na sliki 23.



Slika 23: Kromatogram stresnega vzorca morfínijskega sulfata z vodikovim peroksidom, analiziran z metodo 14

Kromatogram na sliki 24 prikazuje mešanico sedmih učinkovin pri stabilnostni študiji v steklenem vsebniku pri pogoju hv po 21 dneh, kjer je s končno metodo ločenih vseh sedem učinkovin ter oksidacijski produkt morfínijskega sulfata ($t_r = 1,8$ min).



Slika 24: Kromatogram stabilnostne študije mešanice sedmih učinkovin, izpostavljene svetlobi po 21 dneh in analiziran z metodo 15.

Pojav oborine pri stresnih vzorcih

Pri pripravi stresnih vzorcev so se pri štirih vzorcih pojavile oborine. Te oborine so se pojavile pri midazolamu, haloperidolu, ketaminu in metoklopramidu ob dodatku baze (1 M NaOH). To potrjuje navedbe iz literature (poglavje 1.4.4.1) in razlog za inkompatibilnostne probleme midazolama in haloperidola z deksametazonfosfatom, ki ima edini od naših preiskovanih učinkovin v zdravilu (raztopini za injiciranje) bazičen pH. Ostale raztopine za injiciranje s preiskovanimi učinkovinami pa imajo kisel pH. Pri dodatku kisline (1 M HCl) do obarjanja učinkovin ni prišlo (tudi ne pri deksametazonfosfatu). Zato je priporočljivo, da se deksametazonfosfat doda nazadnje k že razredčeni raztopini ostalih učinkovin, saj se tako zmanjša vpliv bazičnega pH raztopine deksametazonfosfata in posledično tudi nastanek morebitnih inkompatibilnosti.

4.2 VREDNOTENJE HPLC METODE

Vrednotenje analizne metode je zaključek, s katerim potrdimo primernost in zanesljivost izbrane metode za predvideno analitsko uporabo. Ovrednotiti je potrebno vsako novo analizo metodo ne glede na to, ali smo jo razvili sami, ali smo navodila za izvedbo metode dobili iz literature. Obseg same validacije je odvisen od kategorije analizne metode in je podan v farmakopejah in ICH smernicah za validacijo analiznih metod.

Validacijo smo opravili v dveh mešanicah (mix-A in mix-B). Validacije v mešanici vseh sedmih učinkovin ne bi mogli izvesti, ker bi bile končne koncentracije v mešanici prenizke glede na nekatere mešanice, ki se pojavljajo v naši študiji. V mix-A so tiste 3 učinkovine, ki so prve na kromatogramu. V mix-B pa so zadnje 4 učinkovine na kromatogramu. To je

dobro z vidika selektivnosti, saj lahko določamo selektivnost med sosednjimi kromatografskimi vrhovi. Obenem pa se nam precej skrajša čas analize za mix-A.

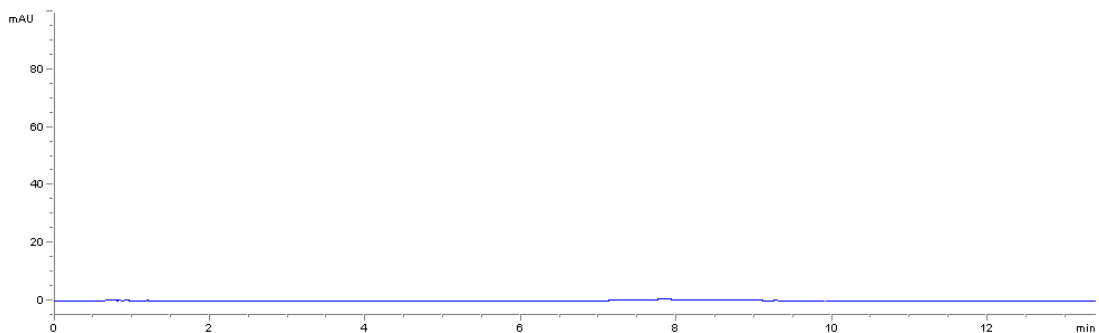
Celotno validacijo smo izvedli dvakrat. Razlika med prvo in drugo validacijo je bila v tem, da smo pri prvi injicirali neredčene vzorce in je bil V_{inj} 0,5 μ L (metoda 14), pri drugi validaciji pa smo vzorce redčili v razmerju 1:10, V_{inj} pa je bil 10-krat večji, se pravi 5 μ L (metoda 15). Razlike parametrov obeh metod so prikazane v preglednici XIII.

Preglednica XIII: Povprečni validacijski parametri vseh sedmih učinkovin v validacijskih mešanic pri metodi 14 in metodi 15

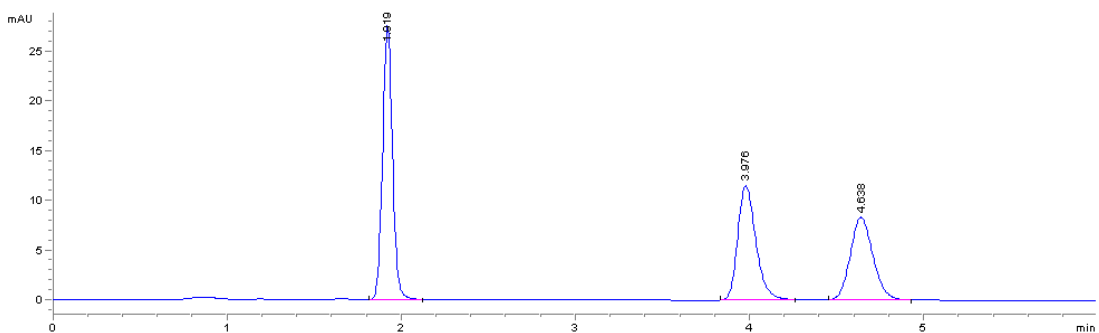
metoda	mešanica	natančnost injiciranja RSD [%]	ponovljivost metode RSD [%]	meddnevna ponovljivost RSD [%]	r^2
14	mix-A	1,04	2,08	2,04	0,9973
	mix-B	1,13	2,60	2,04	0,9968
15	mix-A	0,35	1,80	0,89	0,9992
	mix-B	0,20	1,43	0,45	0,9992

Pri primerjavi rezultatov validacije med metodo 14 in metodo 15 vidimo, da so prav vsi parametri boljši pri slednji (preglednica XIII). Čeprav je V_{inj} 0,5 μ L nekonvencionalen, smo to metodo vseeno vrednotili. Glavni razlog je bil ta, da smo skušali razviti tako metodo, kjer bi bilo prisotno čim manj človeškega faktorja in posledično napak. Zato smo se skušali izogniti redčenju vzorcev in smo direktno injicirali vzorce. Ker pa so koncentracije učinkovin visoke, je moral biti zato V_{inj} majhen. Na koncu se je izkazalo, da je V_{inj} premajhen in je zato posledično slabša natančnost injiciranja. Slaba natančnost injiciranja pa je vzrok tudi za ostale slabše parametre validacije. Kljub redčenju je tako boljša metoda 15. V preglednici XIV so navedeni validacijski parametri za vsako učinkovino posebej, ki smo jo validirali z metodo 15. Selektivnost te metode pa je prikazana na slikah od 25 do 27.

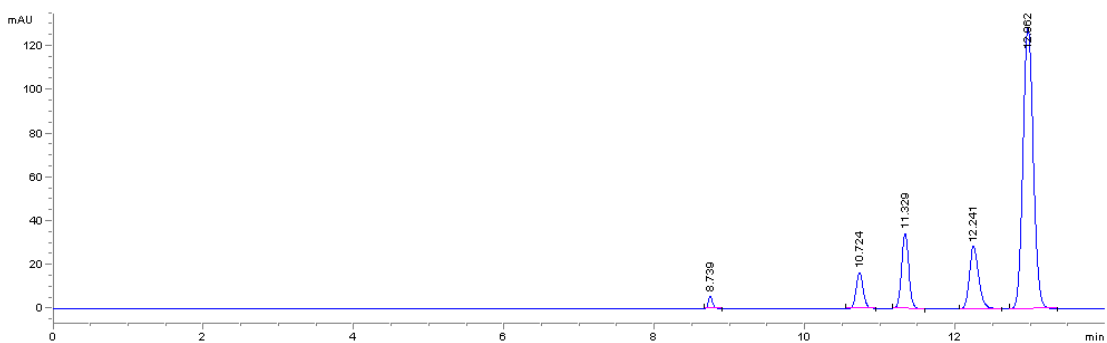
Na slikah od 25 do 27 so kromatogrami analize slepega vzorca (0,9% NaCl), mix-A in mix-B, ki dokazujejo selektivnost metode.



Slika 25: Kromatogram slepega vzorca, analiziran z metodo 15



Slika 26: Kromatogram mix-A, analiziran z metodo 15



Slika 27: Kromatogram mix-B, analiziran z metodo 15

Selektivnost metode smo potrdili z injiciranjem slepega vzorca, mix-A in mix-B ter s predhodno analizo stresnih vzorcev. Vsi kromatografski vrhovi so jasno ločeni.

Preglednica XIV: Validacijski parametri učinkovin pri metodi 15

učinkovina	enačba premice	r^2	Območje linearnosti [mg/ml]	natančnost injiciranja RSD [%]
morfinijev sulfat	$y = 55,219x - 1,6438$	0,9997	1,8–7,2	0,16
deksametazonfosfat	$y = 504,06x - 3,149$	0,9996	0,576–0,144	0,22
metoklopramid	$y = 317,4x - 3,798$	0,9996	0,96–0,24	0,18
ketamin	$y = 27,987x + 0,1935$	0,9999	4,8–1,2	0,16
midazolam	$y = 650,45x + 7,6776$	0,9996	0,48–0,12	0,09
haloperidol	$y = 476,32x - 0,7276$	0,9999	0,72–0,18	0,09
lidokain	$y = 32,607x + 7,5217$	0,9999	12–48	0,12
	ponovljivost metode RSD [%]	točnost [%]	meddnevna ponovljivost RSD [%]	shranjevanje pri zamrzovanju [%]
morfinijev sulfat	1,78	98,9–101,4	0,47	99,7
deksametazonfosfat	1,46	98,5–101,6	1,30	100,1
metoklopramid	1,63	98,4–101,6	0,65	100,2
ketamin	1,19	99,1–101,4	0,40	99,8
midazolam	1,52	98,3–101,1	0,25	99,8
haloperidol	0,92	98,7–101,1	0,21	100,0
lidokain	1,08	98,9–101,3	0,32	99,8

Linearnost metode je zelo dobra, saj je pri vseh učinkovinah determinacijski koeficient $r^2 \geq 0,99$. Prav tako je dobra tudi natančnost injiciranja, saj pri nobeni učinkovini RSD ne preseže 0,3%. Povprečni RSD pri ponovljivosti metode pri nobeni učinkovini ne preseže vrednosti 1,8%, kar ustreza zahtevam. Tudi pri meddnevni ponovljivosti so rezultati dobri, saj razen deksametazonfosfata, ki ima povprečni RSD 1,3%, nobena učinkovina ne preseže vrednosti tega parametra za več kot 0,7%. Točnost metode je ustrezna, saj pri vseh učinkovinah nobena izmerjena koncentracija ne odstopa od deklarirane za več kot $100 \pm 1,7\%$. Robustnost smo ovrednotili s shranjevanjem pri zamrzovanju (freeze store).

Vrednost odstopanja rezultatov analize pred zamrzovanjem in po odtajanju nobene od učinkovin ne preseže 0,3%, kar prav tako ustreza zahtevam.

Iz validacijskih parametrov je razvidno, da je uporabljena analizna metoda primerna za vrednotenje stabilnosti mešanic učinkovin.

4.3 STABILNOSTNE IN KOMPATIBILNOSTNE ŠTUDIJE

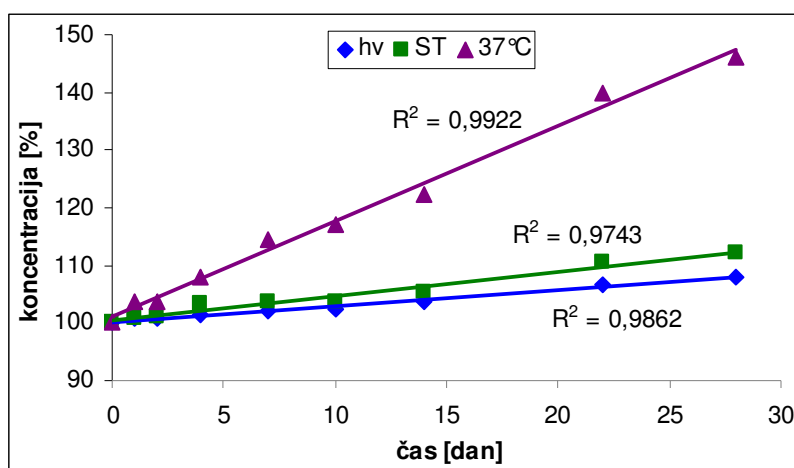
4.3.1 Stabilnostna in kompatibilnostna študija v enodnevnih elastomernih črpalkah

Mešanice 3, 4, 5, 6 in 7 učinkovin smo izbrali zato, da bi videli, kako število učinkovin v mešanici vpliva na njeno stabilnost in kompatibilnost. Pri mešanici 3, 5 in 6 učinkovin (mix-3, mix-5, mix-6) smo sestavo mešanic izbrali na osnovi statistično obdelanih receptov, izdanih v lekarni na Onkološkem inštitutu Ljubljana v obdobju od 24.3.2009 do 26.11.2009. Izbrali smo najbolj tri najbolj pogoste predpisane mešanice za določeno število učinkovin (3, 5 in 6). Sestavo mešanice 4 učinkovin (mix-4) smo izbrali na podlagi inkompatibilnostnih podatkov, saj vsebujejo vse 4 učinkovine, med katerimi so bile v literaturi navedene inkompatibilnosti. Za mešanico 7 učinkovin (mix-7) pa smo se odločili zato, ker s tem zajamemo vse morebitne interakcije med vsemi preiskovanimi učinkovinami. Iz statistične obdelave receptov smo dobili tudi podatke za koncentracijsko območje posamezne učinkovine. Težili smo k temu, da smo izbrali najvišje možne koncentracije posameznih učinkovin iz tega območja za sestavo mešanic (worst case).

Rezultati stabilnostne študije mešanice treh učinkovin v enodnevni elastomerni črpalki pri vseh treh pogojih so prikazani v preglednici XV. Na sliki 28 je še grafično prikazano spreminjanje koncentracije morfinijevega sulfata v tej mešanici pri vseh treh pogojih shranjevanja (hv, ST in 37°C). Takšen trend naraščanja se je pojavil pri vseh petih mešanicah v črpalkah pri vseh učinkovinah razen pri midazolamu.

Preglednica XV: Koncentracije učinkovin pri različnih pogojih shranjevanja v mix-3 v enodnevni elastomerni črpalki, izražena v odstotkih glede na začetno koncentracijo

dan	morfinijev sulfat			metoklopramid			lidokain		
	hv	ST	37°C	hv	ST	37°C	hv	ST	37°C
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100,7	100,8	102,6	100,6	100,7	102,6	100,4	100,6	102,7
2	100,9	101,1	103,7	100,8	101,0	103,8	100,7	100,9	103,7
4	101,4	103,2	107,9	101,0	103,5	108,4	101,0	103,1	108,1
7	102,2	103,7	114,5	101,5	103,7	114,9	101,7	103,4	114,6
10	102,3	103,8	116,9	101,3	103,6	116,8	101,8	103,4	116,7
14	103,6	105,4	122,4	103,2	105,0	122,6	103,1	105,1	122,2
21	106,5	110,5	139,7	106,4	110,0	140,5	106,6	110,1	139,7
28	108,1	112,1	146,2	107,9	114,9	146,7	108,0	114,6	146,2



Slika 28: Koncentracija morfinijevega sulfata v mix-3 v enodnevni elastomerni črpalki pri treh pogojih shranjevanja v odvisnosti od časa

Rezultati študije so nas presenetili. Pri vseh učinkovinah (razen midazolama) v vseh mešanica in pri vseh treh pogojih je koncentracija s časom naraščala. Najmanj je naraščala koncentracija učinkovin v črpalkah, katere smo shranjevali pri hv. Po 28. dneh je bila koncentracija učinkovin v črpalkah, shranjene pri hv, okoli 108%. Koncentracije v črpalkah, shranjene pri ST, so naraščale malce hitreje. Tukaj je bila končna koncentracija učinkovin okoli 114%. Najhitreje so naraščale koncentracije učinkovin pri 37°C. Koncentracija učinkovin v teh pogojih se je na koncu povzpela do približno 146%.

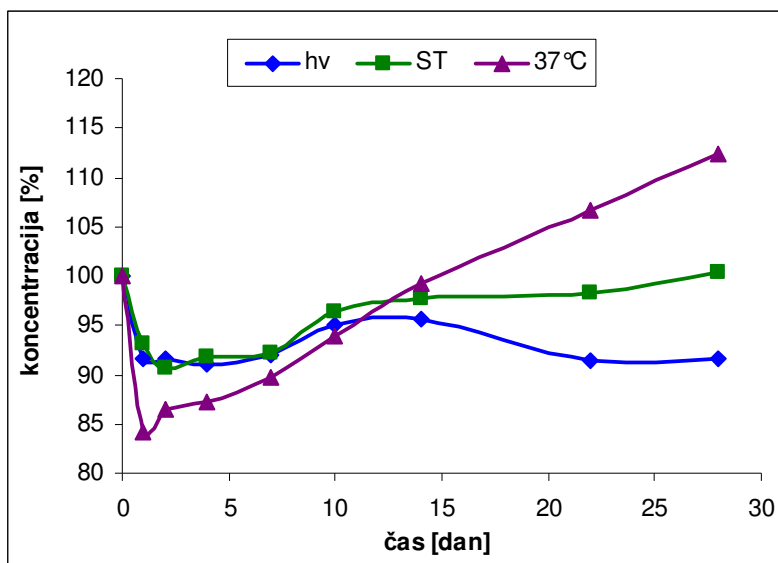
Sklepali smo, da je za tak porast koncentracij učinkovin krivo izhlapevanje vode. K takem sklepanju sta nas pripeljali dve dejstvi. Prvo je bilo to, da je bil pri vseh petih črpalkah, ki so bile shranjene pri 37°C, manjši volumen raztopine kot pri črpalkah shranjenih pri hv in ST. To smo očitno videli po napolnjenosti balonov v črpalkah. Med črpalkami shranjenih

pri hv in ST ni bilo vidne razlike v napolnjenosti. Črpalke smo tudi stehtali in ugotovili, da so tiste, shranjene pri povišani temperaturi, precej lažje (za približno 8 g) od tistih, shranjenih pri hv in ST. Drugi razlog našega sklepanja pa je bil v samem rezultatu. Voda hitreje izhlapeva pri povišani temperaturi in zato je pri 37°C končna koncentracija toliko večja kot pri ostalih dveh pogojih. Črpalke, ki so bile shranjene na svetlobi (hv), so bile ves čas študije ob oknu. Razlog, zakaj je bilo tam malenkost manjše izhlapevanje vode kot pri črpalakah shranjene v temi (ST) v istem prostoru je lahko ta, da je bila povprečna sobna temperatura malo nižja ob oknu kot v omari, kjer smo shranjevali črpalke v temi.

Koncentracije midazolama so pri vseh mešanicah, kjer je bil midazolam prisoten, nakazovale podoben trend kot v mix-5, ki ga prikazuje preglednica XVI in slika 29.

Preglednica XVI: Koncentracije midazolama v črpalci v mix-5 v enodnevni elastomerni črpalci pri treh pogojih shranjevanja, izražene v odstotkih

dnevi	hv	ST	37°C
0	100	100	100
1	91,6	93,1	84,2
2	91,6	90,7	86,6
4	91,0	91,8	87,2
7	91,9	92,2	89,7
10	95,0	96,3	93,8
14	95,7	97,7	99,2
22	91,5	98,3	106,7
28	91,6	100,3	112,4

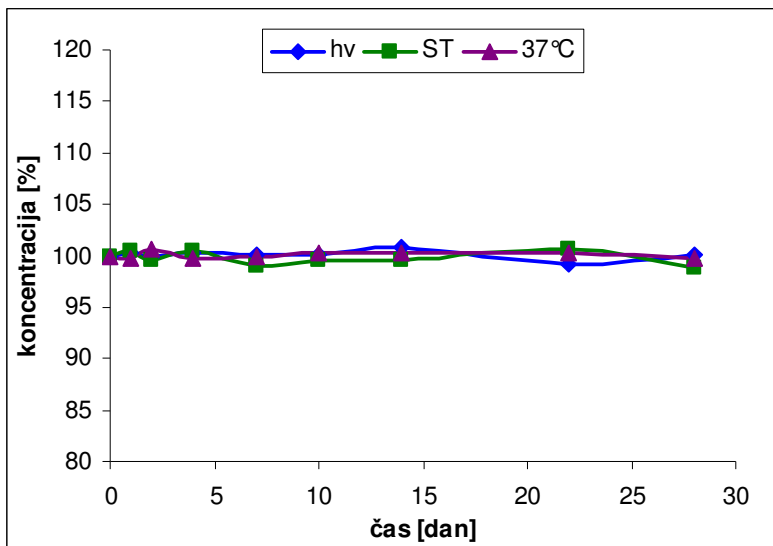


Slika 29: Koncentracija midazolama v mix-5 v enodnevni elastomerni črpalci pri treh pogojih shranjevanja v odvisnosti od časa

Koncentracije midazolama so že po prvem dnevu padle za približno 7–15% in nato nihale okoli te vrednosti, pri 37°C pa so po začetnem padcu koncentracije naraščale, kar je posledica izhlapevanja vode. Posumili smo, da bi lahko midazolam razpadal, ali se adsorbiral na vsebnik. Bolj verjetna se nam je zdela adsorpcija zaradi hitrega upada koncentracije že po prvem dnevu in ker pri tem ni nastajal razpadni produkt midazolama.

4.3.2 Stabilnostna in kompatibilnostna študija v steklenih vsebnikih

V preglednicah od XVII do XXI so predstavljeni rezultati stabilnostne študije v steklenih vsebnikih, in sicer procentualne koncentracije učinkovin glede na začetno koncentracijo za vsako učinkovino v mešanici pri vseh treh pogojih pri devetih časovnih točkah. Na sliki 30 pa so grafično prikazane koncentracije lidokaina v mix-7 tekom študije pri vseh treh pogojih shranjevanja.



Slika 30: Koncentracija lidokaina v mix-7 v steklenem vsebniku pri treh pogojih shranjevanja v odvisnosti od časa

Preglednica XVII: Koncentracije učinkovin v mix-7 v steklenem vsebniku, izražene v procentih

dan	morfinijev sulfat			metoklopramid			deksametazonfosfat			midazolam			ketamin			haloperidol			lidokain			
	hv	ST	37°C	hv	ST	37°C	hv	ST	37°C	hv	ST	37°C	hv	ST	37°C	hv	ST	37°C	hv	ST	37°C	
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100,5	101,3	99,8	100,5	100,8	99,6	101,1	101,4	99,1	100,3	100,9	99,4	99,8	100,3	99,5	100,5	100,2	100,9	100,2	100,4	99,7	
2	100,3	99,4	100,1	100,3	98,8	100,2	100,6	99,0	98,6	100,2	98,8	99,5	100,0	100,0	100,2	100,5	99,2	98,5	100,0	99,5	100,6	
4	100,6	100,4	99,6	100,7	100,3	99,6	100,0	100,2	100,6	100,4	100,9	99,9	100,1	100,1	100,1	100,6	100,3	100,6	100,3	100,4	99,8	
7	100,4	99,2	99,5	100,3	98,9	99,8	98,5	99,6	98,6	99,8	99,5	99,7	100,0	99,8	99,7	99,7	99,5	100,5	100,0	99,0	99,9	
10	100,4	99,6	100,0	100,3	99,3	100,2	97,4	99,1	100,5	99,6	100,2	100,7	99,8	99,5	100,1	98,9	99,3	102,0	100,1	99,5	100,2	
14	100,3	99,6	99,5	100,5	99,4	99,8	99,2	99,5	97,3	100,8	100,3	100,7	100,0	99,7	100,3	100,4	98,6	99,4	100,9	99,6	100,4	
21	99,1	99,4	100,4	99,3	99,1	100,1	96,9	99,6	99,2	99,1	100,4	100,0	99,1	99,6	100,4	98,1	99,9	101,4	99,2	100,6	100,4	
28	99,6	99,9	99,2	100,0	99,8	99,2	98,9	99,9	95,8	100,4	99,2	99,2	99,8	99,4	100,0	100,4	99,0	98,9	100,1	98,8	99,7	

Preglednica XVIII: Koncentracije učinkovin v mix-6 v steklenem vsebniku, izražene v procentih

dan	morfinijev sulfat			deksametazonfosfat			midazolam			ketamin			haloperidol			lidokain					
	hv	ST	37°C	hv	ST	37°C	hv	ST	37°C	hv	ST	37°C	hv	ST	37°C	hv	ST	37°C			
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100,9	100,5	100,3	99,9	101,2	98,2	100,6	100,5	100,6	100,0	100,7	100,3	100,7	100,4	99,6	99,7	100,7	100,3			
2	99,7	99,0	99,6	99,7	99,5	99,9	99,3	99,3	99,6	99,4	99,0	99,4	100,6	99,0	99,5	100,3	99,3	99,6			
4	100,2	99,5	99,6	99,1	100,0	99,6	99,6	99,5	100,0	99,6	99,4	100,6	99,1	100,1	99,5	99,4	99,6	99,4			
7	99,3	99,8	99,4	98,3	99,1	99,5	98,8	100,1	99,9	98,7	99,7	99,6	99,1	99,6	99,8	98,3	100,0	99,6			
10	99,8	100,4	100,1	98,7	101,1	98,5	99,2	100,6	100,8	99,3	100,1	99,6	99,7	100,6	99,7	98,9	100,4	99,6			
14	101,1	99,4	99,9	98,7	99,7	99,6	100,2	99,8	100,8	100,3	99,1	100,8	100,1	99,5	100,8	99,8	99,7	101,3			
21	99,2	100,2	100,3	96,9	99,6	99,2	99,3	100,6	100,9	99,8	100,0	100,3	98,1	99,9	101,4	99,2	100,6	100,4			
28	100,3	100,2	100,1	98,9	99,8	95,8	100,4	99,2	99,2	99,8	99,4	100,0	100,4	99,0	98,9	100,1	98,8	99,7			

Preglednica XIX: Koncentracije učinkovin v mix-5 v steklenem vsebniku, izražene v procentih

dan	morfinijev sulfat			metoklopramid			midazolam			ketamin			lidokain		
	hv	ST	37°C	hv	ST	37°C	hv	ST	37°C	hv	ST	37°C	hv	ST	37°C
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100,9	101,4	98,7	100,2	99,4	98,8	101,7	99,5	99,4	100,5	99,6	98,7	100,8	99,6	98,8
2	99,8	101,0	99,6	99,9	100,8	99,1	99,7	100,1	98,7	99,5	99,8	99,1	99,7	100,0	99,0
4	99,7	99,4	101,2	99,9	99,6	101,8	99,9	99,7	99,3	99,5	99,5	100,1	99,8	99,5	100,3
7	99,7	99,3	98,7	99,6	99,2	98,7	99,1	99,8	98,5	100,0	99,3	98,8	100,0	99,3	98,7
10	99,3	100,1	98,5	99,1	100,0	98,9	99,0	99,9	98,8	99,1	99,8	99,0	99,1	99,9	99,0
14	99,8	99,7	98,7	99,8	100,0	101,8	99,5	100,3	99,0	99,7	100,1	99,2	99,8	100,0	99,2
21	99,7	99,6	99,5	99,7	100,1	99,4	99,0	101,0	99,9	100,1	99,3	99,9	100,0	99,0	99,7
28	99,9	100,3	98,9	99,5	98,7	100,9	99,1	100,1	99,7	100,1	100,4	99,4	99,9	100,1	99,8

Preglednica XX: Koncentracije učinkovin v mix-4 v steklenem vsebniku, izražene v procentih

dan	morfinijev sulfat			deksametazonfosfat			midazolam			haloperidol		
	hv	ST	37°C	hv	ST	37°C	hv	ST	37°C	hv	ST	37°C
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	99,4	100,0	99,4	98,3	100,6	98,6	99,3	100,4	99,3	99,4	100,2	99,4
2	99,9	100,3	98,6	98,7	100,4	98,4	99,9	100,6	98,4	100,2	99,8	99,7
4	99,8	100,3	98,7	98,6	99,9	98,9	99,7	99,8	98,5	100,1	99,6	100,1
7	101,6	100,2	99,1	99,6	99,6	98,0	101,1	100,5	99,2	100,7	100,2	99,7
10	100,1	100,2	99,0	98,2	98,2	95,8	100,4	101,5	99,3	100,2	102,0	99,3
14	100,1	101,0	99,3	97,9	99,3	97,0	100,6	101,2	99,7	99,4	100,7	100,1
21	99,5	101,6	99,7	97,1	99,5	95,3	101,1	102,1	99,5	100,2	101,2	99,6
28	99,5	99,6	99,9	97,7	100,0	95,2	101,3	99,9	100,5	101,0	99,1	100,7

Preglednica XXI: Koncentracije učinkovin v mix-3 v steklenem vsebniku, izražene v procentih

dan	morfinijev sulfat			metoklopramid			lidokain		
	hv	ST	37°C	hv	ST	37°C	hv	ST	37°C
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	99,6	100,0	100,1	99,3	101,2	100,0	99,5	100,4	100,0
2	99,5	99,0	99,1	99,0	99,6	99,5	99,4	99,0	99,4
4	101,6	99,8	99,8	101,0	100,3	99,9	101,3	99,7	99,9
7	100,2	100,6	99,7	99,8	101,0	99,5	99,9	100,4	99,5
10	100,2	100,2	100,0	99,6	100,6	100,2	99,9	100,1	100,4
14	99,5	99,9	100,3	98,8	100,4	100,4	99,3	100,0	100,6
21	100,1	99,4	100,9	99,1	100,2	101,4	100,2	99,5	101,4
28	99,6	100,4	99,0	98,2	99,5	99,5	99,8	100,4	99,8

Preglednica XXII: Koncentracije učinkovin v mix-5b v sedemdnevni iztekajoči se elastomernih črpalkah, izražene v procentih

dan	morfinijev sulfat			metoklopramid			midazolam			ketamin			lidokain		
	hv	ST	37°C	hv	ST	37°C	hv	ST	37°C	hv	ST	37°C	hv	ST	37°C
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	99,7	100,3	100,9	99,9	100,4	100,8	100,4	100,7	94,8	99,8	100,5	101,1	99,8	100,4	101,1
2	98,5	100,6	101,1	98,6	100,6	101,1	96,2	96,9	93,8	98,7	100,9	101,4	98,6	100,7	101,3
5	100,0	101,0	100,3	100,0	100,9	99,9	96,3	95,0	92,8	100,0	101,1	100,6	101,2	101,0	100,5
6	100,9	100,9	101,1	101,4	100,9	101,3	95,4	94,4	90,0	100,9	101,3	101,6	100,9	101,1	101,7
7	100,6	101,0		100,8	100,8		95,1	93,5		100,7	101,1		100,5	101,0	
8	101,1	100,8		101,9	100,5		94,9	92,6		101,5	100,9		101,4	100,8	
buča	99,3	101,8	101,5	98,6	101,3	101,5	96,3	96,9	95,4	100,4	100,9	101,4	99,4	100,8	101,6

Na osnovi presenetljivih rezultatov stabilnostne in kompatibilnostne študije v enodnevnih elastomernih črpalkah (poglavje 4.3.1), smo ponovili stabilnostno in kompatibilnostno študijo v steklenih vsebnikih, da bi se izognili izhlapevanju vode.

Ta študija nam je pokazala, da so vse mešanice stabilne in kompatibilne. Le pri deksametazonfosfatu smo opazili rahel upad koncentracije v vseh mešanicah, kjer je bil prisoten (mix-7, mix-6 in mix-4). Trend upadanja koncentracije skozi čas se je pojavil pri shranjevanju pri hv, kjer je bila najnižja koncentracija učinkovine 96,9% ter pri 37°C, kjer je bila najnižja koncentracija učinkovine 95,2%. Pri ST koncentracija skozi čas ni upadala. Pri vseh ostalih učinkovinah v vseh mešanicah pri vseh treh pogojih shranjevanja so bile koncentracije tekom študije od 98,1% do 102,0%. Poleg tega tudi ni bilo opaziti trenda upada ali naraščanja koncentracij učinkovin.

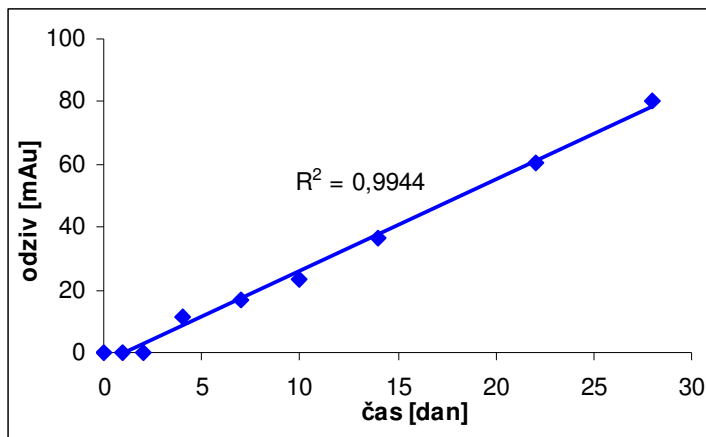
Tako lahko potrdimo, da je za upad koncentracije midazolama v enodnevnih elastomernih črpalkah (poglavje 4.3.1) kriva adsorpcija učinkovine na ovojnino in ne razpad učinkovine, saj ni bilo ne upada koncentracije midazolama ne nastajanja razpadnega produkta te učinkovine tekom študije v steklenem vsebniku.

Oksidacijski razpadni produkt morfina

Pri vseh mešanicah stabilnostne študije v steklenem vsebniku in tudi v elastomernih črpalkah se je pri shranjevanju na svetlobi pojavil kromatografski vrh, ki pripada oksidacijskemu razpadnemu produktu morfina. Slika 31 in preglednica XXIII prikazujeta odziv te spojine skozi čas v mix-6, shranjene v steklenem vsebniku pri hv. Takšen trend naraščanja odziva spojine skozi čas je bil zaznan pri vseh mešanicah shranjenih v steklenih vsebnikih pri pogoju shranjevanja hv.

Preglednica XXIII: Odzivi oksidacijskega produkta morfina v mix-6 v steklenem vsebniku pri hv

dnevi	odziv [mAu]
0	0
1	0
2	0
4	11,2
7	16,9
10	23,3
14	36,7
22	60,6
28	80,5



Slika 31: Odziv oksidacijskega produkta morfina v odvisnosti od časa shranjevanja v mix-6 v steklenem vsebniku pri hv

Pri vseh petih mešanicah, ki so bile shranjene pri hv, smo opazili pojav oksidacijskega produkta morfina, ki se je čez čas študije linearno povečeval, kar je tudi lastnost razpada 0. reda oksidacijskih procesov. Vendar pa tega produkta nismo identificirali niti ne kvantificirali, ker nismo imeli standarda. Po podatkih iz literature gre najverjetneje za psevdomorfin, saj je to njegov glavni razpadni produkt (23). Zanimivo pri tem je, da se koncentracija samega morfina ne zmanjšuje, kljub nastajanju tega razpadnega produkta morfina. Razlog za to bi lahko bil v tem, da razpade zelo malo morfina in zato praktično ne zaznamo trenda upada te učinkovine tekom študije. Oksidacijski produkt morfina lahko bolje absorbira svetlobo pri valovni dolžini detektorja (254 nm) in so zato odzivi relativno večji kot pri morfinu.

Vse mešanice smo tekom celotne študije tudi vizualno opazovali. Prav vse mešanice so ostale bistre, prav tako ni bilo prisotnih trdnih delcev. Pri mix-3, mix-4 in mix-5 smo pri vseh treh pogojih shranjevanja po 10. dneh študije opazili spremembo barve iz brezbarvne raztopine v rahlo rumeno. Ostali dve mešanici pa sta ostali brezbarvni. To bi bilo lahko povezano s tem, da je bila koncentracija morfinijevega sulfata pri mix-3, mix-4 in mix-5 višja in je bilo s tem posledično tudi več razpadnih produktov morfina, ki obarvajo raztopino rumeno. V literaturi smo zasledili kar nekaj študij, kjer so se med preiskovanimi učinkovinami v mešanicah pojavile inkompatibilnosti (opisano v poglavju 1.4.4), vendar so bile tam uporabljene višje koncentracije učinkovin kot pri naših študijah.

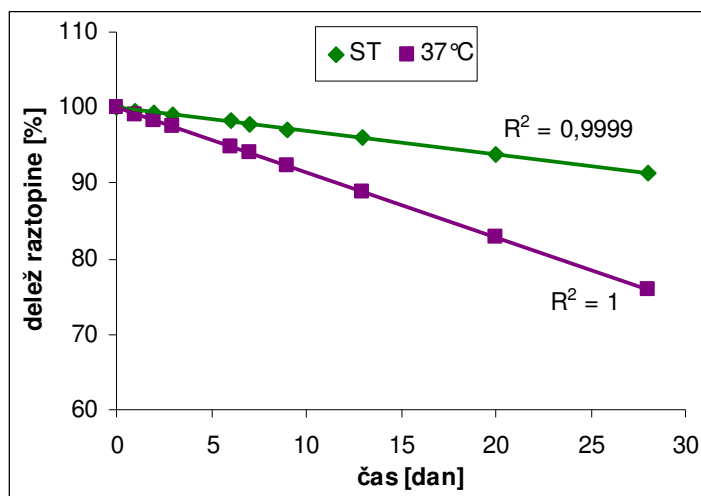
4.3.3 Preučevanje izhlapevanja vode v enodnevnih elastomernih črpalkah

Po presenetljivih rezultatih stabilnostne študije v enodnevnih elastomernih črpalkah smo se odločili, da bomo naredili še en poizkus, kjer bomo spremljali spremembo maso napolnjene elastomerne črpalke v odvisnosti od časa. S tem bi potrdili morebitno izhlapevanje vode in ugotovili, v kakšnem obsegu poteka.

Ugotovljena povprečna izguba vode na dan zaradi izhlapevanja je pri ST 148 mg, pri 37°C pa 417 mg. Slika 32 in preglednica XXIV prikazujeta rezultat tehtanja dveh enodnevnih elastomernih črpalk v času 28 oziroma 29 dni pri ST in 37°C. Rezultate smo podali v odstotkih mase raztopine glede na začetno maso raztopine v črpalki.

Preglednica XXIV: Delež raztopin v dveh enodnevnih elastomernih črpalkah pri ST in 37°C

dan	delež raztopine [%]	
	ST	37°C
0	100	100
1	99,7	99,2
2	99,4	98,3
3	99,1	97,5
6	98,2	94,9
7	97,9	94,0
9	97,2	92,3
13	96,0	88,8
20	93,8	82,8
28	91,4	75,9
29	90,9	73,0



Slika 32: Delež raztopin v dveh enodnevnih elastomernih črpalkah pri ST in 37°C v odvisnosti od časa.

Rezultati so pokazali, da voda kontinuirano izhlapeva iz enodnevnih elastomernih črpalk, kar je lepo vidno tudi na grafični predstavitvi (slika 32), kjer je korelacija med deležem raztopine in časom zelo visoka, saj sta vrednosti r^2 kar 0,9999 in 1. V črpalki, ki je bila shranjena pri 37°C, voda hitreje izhlapeva. Povprečno je izhlapelo 417 mg na dan in po 28 dneh kar 24,1% vode. Pri ST je izhlapevanje manjše, saj izhlapi v povprečju 148 mg vode na dan, po 28 dneh pa izhlapi 8,6% vode.

Pri tej študiji smo merili tudi koncentraciji metoklopramida in ketamina v črpalkah. V preglednici XXV so rezultati analize koncentracij teh dveh učinkovin v dveh enodnevnih elastomernih črpalkah. Rezultati so podani v odstotkih glede na začetno koncentracijo ob času 0.

Preglednica XXV: Koncentracije metoklopramida in ketamina v dveh enodnevnih elastomernih črpalkah pri ST in 37°C, izražene v odstotkih

dan	metoklopramid		ketamin	
	ST	37°C	ST	37°C
0	100	100	100	100
29 (cevka)	144,2	281,4	131,8	235,7
29 (balon)	112,4	140,5	109,1	138,8

Tudi iz teh rezultatov je razvidno, da je bilo večje izhlapevanje pri 37°C, saj so bile tam koncentracije učinkovin višje. Zelo zanimiva je bila razlika rezultatov po 29. dneh med vzorci raztopine iz cevke in vzorci raztopine v rezervoarju – balonu. Pri obeh črpalkah (tako pri ST kakor pri 37°C) za obe učinkovini velja, da je bila koncentracija v cevki višja kot v balonu. Pri 37°C je bila ta razlika večja kot pri ST. Pri metoklopramidu je koncentracija v cevki pri 37°C višja celo za faktor 2 glede na koncentracijo v balonu. Pri ketaminu je bil porast koncentracij 29. dne pri vseh meritvah nekoliko manjši kot pri metoklopramidu. Drugače pa koncentraciji teh dveh učinkovin v balonu dobro korelirata z izhlapevanjem vode v črpalki, saj se na račun izgube vode v črpalki povečata koncentraciji. Prav tako je dobra povezava med prvo stabilnostno študijo mešanic v elastomernih črpalkah (poglavje 4.3.1) in količino izhlapele vode skozi čas pri tem poizkusu. Tako lahko potrdimo, da je za povišanje koncentracije skozi čas res krivo izhlapevanje vode.

Iz rezultatov, da je koncentracija metoklopramida in ketamina v cevkah višja kot v balonu, lahko sklepamo, da voda izhlapeva iz cevke. Se pravi, da je cevka tisti delikatni del, ki prepušča vodo pri tej elastomerni črpalki.

4.3.4 Preučevanje iztekajočih se enodnevnih elastomernih črpalk

Ta poizkus smo napravili zato, da bi videli, kakšno je izhlapevanje vode medtem, ko se črpalka prazni. S tem smo hoteli preučiti izhlapevanje vode v realnih pogojih, ko bolnikom kontinuirano teče infuzija v podkožje. Na osnovi dveh poizkusov smo izračunali povprečno maso izhlapele vode v 24 urah. Pri ST je masa izhlapele vode 140 mg, pri 37°C pa 335 mg.

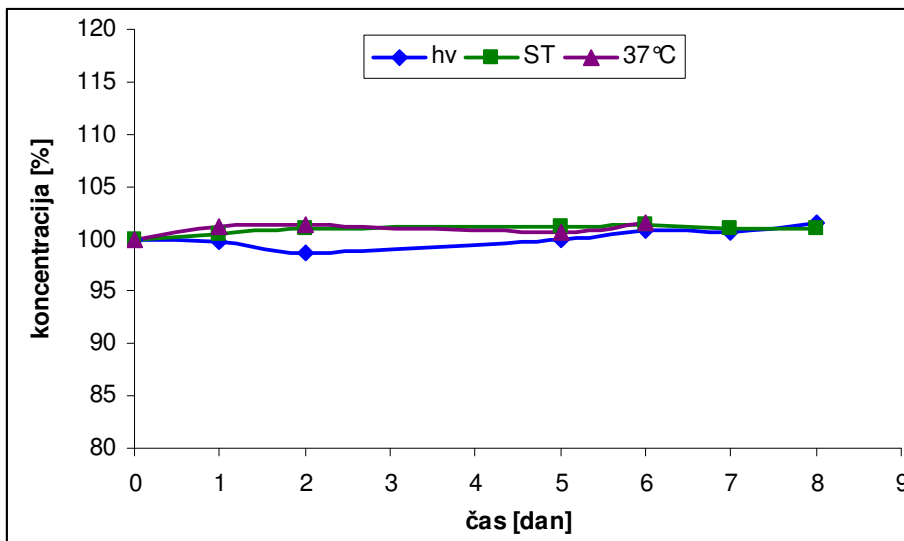
Nato smo rezultate (masa izhlapele vode) primerjali z rezultati prejšnjega poizkusa (poglavje 4.3.3), kjer sta bili črpalke zaprti in se nista praznili. Pri ST je razlika izhlapele vode majhna (8 mg). To je približno 5%. Pri temperaturi 37°C je bila ta razlika 82 mg, kar je približno 20%. Večja razlika pri 37°C je lahko povezana s tem, da je preteklo precej časa, da se je raztopina, katero smo dali v komoro ob času 0, segrela na 37°C in je bila takrat hitrost izhlapevanja manjša. Pri preučevanju zaprtih črpalk (poglavje 4.3.3) smo izračunali povprečno maso izhlapele vode na dan skozi 28 dni in zato začetno segrevanje raztopine ni imelo takšnega vpliva. Skratka, ugotovili smo, da voda izhlapeva tudi, če se črpalka kontinuirano prazni. Razlika v izhlapevanju vode med zaprto in iztekajočo se črpalko pa je majhna.

Izračunali smo povprečni pretok 4 elastomernih črpalk (2 pri ST in 2 pri 37°C). Povprečje teh povprečnih pretokov po 24 urah je: pri ST 1,63 mL/h, pri 37°C pa 2,37 mL/h. Povprečni pretoki črpalk so se kar precej razlikovali od specificiranega, ki je 2 mL/h. Pri ST je povprečni pretok za 18,5% manjši. Pri 37°C pa je za 18,5% večji. V navodilih proizvajalca je lahko odstopanje za največ $\pm 10\%$. Se pravi, da te črpalke niso ustrezne zaradi prevelikega odstopanja pretoka od specificiranega pretoka.

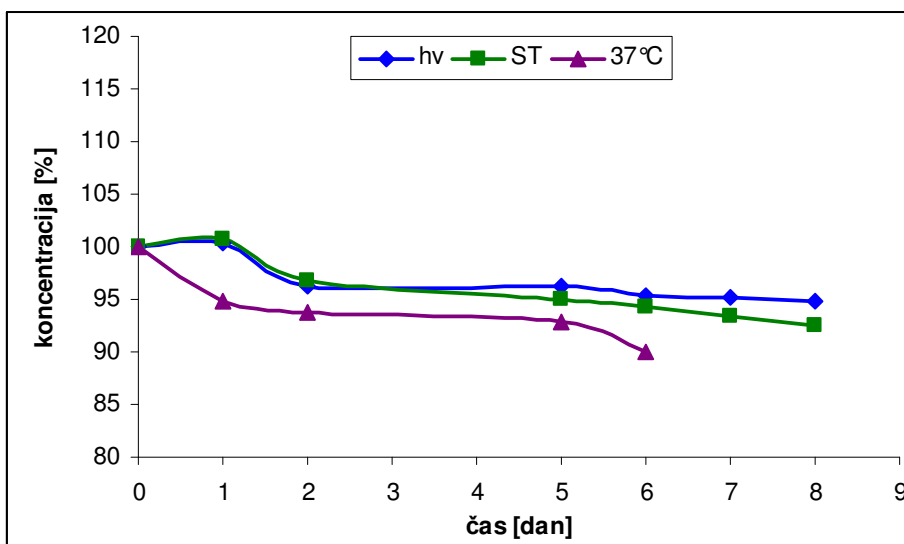
4.3.5 Stabilnostna in kompatibilnostna študija v iztekajočih se sedemdnevnih elastomernih črpalkah in preučevanje le-teh

Ta poizkus smo naredili zato, da bi spremljali stabilnost in kompatibilnost mešanice v pogojih, ki čim bolj simulirajo realne pogoje. Zato so se črpalke kontinuirano praznile. Odločili smo se za sedemdnevno črpalko, saj je ta časovno najdaljša in je zato v tem časovnem obdobju možnih največ potencialnih stabilnostnih in kompatibilnostnih problemov. Napolnili smo jih z mešanico petih učinkovin (mix-5b).

Rezultati stabilnostne študije v sedemdnevni iztekajoči se elastomerni črpalki so prikazani v preglednici XXII. Koncentracije ketamina in midazolama so predstavljene tudi grafično na sliki 33 (ketamin) in na sliki 34 (midazolam).



Slika 33: Koncentracija ketamina v mix-5b v sedemdnevni elastomerni črpalki pri treh pogojih shranjevanja v odvisnosti od časa



Slika 34: Koncentracija midazolama v mix-5b v sedemdnevni elastomerni črpalki pri treh pogojih shranjevanja v odvisnosti od časa

Pri koncentracijah morfinijevega sulfata, metoklopramida, ketamina in lidokaina v vseh treh pogojih ni opaziti kakšnega trenda upada ali naraščanja koncentracije učinkovin. Koncentracije so nanizane okoli 100% začetne koncentracije (od 98,5 do 101,7%).

Pri midazolamu se je koncentracija skozi čas zmanjševala. Najhitreje se je zmanjševala pri 37°C, kjer koncentracija dosegla celo 90,0% začetne koncentracije. Pri ST pa se je koncentracija hitreje zmanjševala kot pri hv, kar je najbrž posledica nižje temperature ob oknu pri hv. Glede na to, da koncentracija midazolama v steklenem vsebniku v vseh mešanica, kjer je prisoten, skozi 28 dni študije ne upada in pri tem ne nastaja razpadni produkt midazolama (ne v steklenih vsebnikih ne v sedemdnevni črpalkah), lahko sklepamo, da se adsorbira na sedemdnevno elastomerno črpalko. V literaturi najdemo podatke nekaterih študij, da se midazolam adsorbira na PVC vsebnike (21). Sedaj pa smo ugotovili, da so tudi silikonske elastomerne črpalke (enodnevne in sedemdnevne) takšen vsebnik, na katere se midazolam adsorbira. Pri 37°C smo preučevali mešanico mix-5b samo do 6. dneva, saj se je črpalka med 6. in 7. dnevom izpraznila.

Mešanice smo tekom študije opazovali tudi vizualno. V njih nismo opazili trdnih delcev oborine ali kristalov. Smo pa na koncu študije opazili, da se je raztopina, ki se je iztekla v bučo, obarvala iz brezbarvne v rahlo rumenkasto, kar je najverjetneje posledica razpadnih produktov morfina.

Delež raztopin v iztekajočih se sedemdnevni elastomernih črpalkah in njihovih bučah, v katere se iztekajo (masa raztopin v črpalkah in njihovih bučah glede na začetno maso v črpalkah), je predstavljena v preglednici XXVI.

Preglednica XXVI: Delež raztopin v iztekajočih se sedemdnevni elastomernih črpalkah in njihovih bučah

dnevi	hv	ST	37°C
0	100	100	100
1	100,1	100,2	100,1
2	100,2	100,2	100,2
5	100,1	100,1	100,0
6	100,1	100,1	100,0
7	100,1	100,1	–
8	100,1	100,1	–

Tehtanje črpalk tekom študije nam je pokazalo, da voda praktično ne izhlapeva iz sedemdnevni črpalk in ne vpliva na koncentracijo učinkovin. To smo potrdili tudi z rezultati v preglednici XXII.

Povprečni pretok elastomernih črpalk je bil naslednji:

- pri hv: 1,05 mL/h,
- pri ST: 1,09 mL/h,
- pri 37°C: 1,70 mL/h.

Povprečni pretoki v črpalkah so se kar precej razlikovali od specificiranega, ki je 1,5 mL/h. Pri hv je bil pretok manjši za 29,8%, pri ST za 27,3%, pri 37°C pa je bil pretoki večji za 13,5%. V navodilih proizvajalca je navedeno, da lahko pretok odstopa od specificiranega pretoka za največ $\pm 10\%$. Tako tudi sedemdnevne črpalke niso ustrezne zaradi prevelikih odstopanj v pretoku.

4.3.6 Izhlapevanje vode v sedemdnevni elastomernih črpalkah

Rezultat tega gravimetričnega poizkusa je predstavljen v preglednici XXVII. Ta prikazuje delež raztopin (masa raztopin v črpalkah glede na začetno maso v črpalkah) v sedemdnevni črpalkah, ki so zaprte in se ne iztekajo.

Preglednica XXVII: Delež raztopine v zaprtih sedemdnevni elastomernih črpalkah

dnevi	hv	ST	37°C
0	100	100	100
1	100,0	99,9	99,8
2	100,0	99,9	99,8
5	99,9	99,9	99,7
6	99,9	99,8	99,6
7	99,9	99,8	99,6

S tehtanjem zaprtih sedemdnevni črpalk skozi 7 dni smo ugotovili, da je tudi tukaj izhlapevanje vode nično oziroma zanemarljivo majhno.

5 SKLEP

- Razvili smo ustrezno reverzno-fazno HPLC metodo, s katero smo ločili vseh sedem učinkovin in njihove glavne razpadne produkte, dobljene s stresnim testiranjem posamezne učinkovine. Na ta način je bila zagotovljena ustrezna selektivnost metode.
- Validirali smo 2 metodi. Razlika med metodama je bila le v V_{inj} . Pri prvi metodi smo injicirali neredčene vzorce z V_{inj} 0,5 μ L. Pri drugi pa smo vzorce redčili v razmerju 1:10, pri tem je bil V_{inj} 5 μ L. Prav vsi rezultati validacijskih parametrov so pokazali, da je boljša druga metoda, kjer je bil V_{inj} 5 μ L (metoda 15).
- Pri validaciji metode 15 smo ugotovili, da je ta ustrezna in v skladu z ICH smernicami, saj so vsi parametri (selektivnost, linearnost, natančnost injiciranja, ponovljivost metode, meddnevna ponovljivost, točnost, robustnost) ustrezni.
- Stabilnostna in kompatibilnostna študija v steklenih vsebnikih je pokazala, da so vse učinkovine v vseh petih mešanicah stabilne do 28 dni pri vseh treh pogojih. Svetloba in povišana temperatura pri shranjevanju nista imela posebnega vpliva na rezultate. Le pri deksametazonfosfatu je bil opažen rahel trend upada koncentracije pri hv ter pri 37°C, vendar je bila tudi takrat učinkovina stabilna, saj ni razpadlo več kot 5% učinkovine. Pri ostalih učinkovinah pa rezultati nikoli niso odstopali za več kot $\pm 2\%$ od začetne vrednosti. Pri vizualnem opazovanju nismo opazili sprememb, ki bi kazale na morebitno inkompatibilnost mešanic. Pri mešanicah 3, 4 in 5 učinkovin se je raztopina tekom študije obarvala v rahlo rumeno barvo, zaradi nastajanja razpadnih produktov morfina.
- Midazolam se je adsorbiral tako na enodnevno kakor tudi na sedemdnevno elastomerno črpalko. Adsorpcija je bila večja pri povišani temperaturi. V enodnevnih črpalkah se je adsorbiralo relativno več midazolama kot pri sedemdnevnih. Pri enodnevnih črpalki pri 37°C tako pripravek v črpalki ne bi bil primeren za uporabo, saj se je po 24 urah koncentracija midazolama znižala za 15,8%. Pri hv in ST pa se koncentracija v enem dnevu ni znižala za več kot 10%. Pri sedemdnevni črpalki je mešanica primerna za uporabo, saj se pri nobenem pogoju koncentracija ni znižala za več kot 10%.

- Stabilnostna študija mešanic petih učinkovin v sedemdnevni elastomerni črpalki, ki se je kontinuirano praznila, je pokazala, da je mešanica stabilna pri vseh treh pogojih. Edina problematična učinkovina je midazolam, ki se je adsorbirala na vsebnik, vendar se pri vseh treh pogojih ni adsorbirala za več kot 10%.
- Iz enodnevnih črpalk je voda konstantno izhlapevala. Izhlapevanje vode je bilo večje pri povišani temperaturi. Praznjenje črpalke je imelo na izhlapevanje vode majhen vpliv. Koncentracije vseh učinkovin razen midazolama so v stabilnostni študiji v enodnevnih črpalkah koncentracije tekom 28 dni ves čas naraščale. Te črpalke so namenjene apliciranju protibolečinskih mešanic za en dan. Po enem dnevu pa so se koncentracije zaradi izhlapevanja vode le minimalno povečale in zato so iz tega vidika primerne za uporabo.
- Voda v enodnevni črpalki izhlapeva skozi cevko, saj sta bili v cevki koncentraciji metoklopramida in ketamina po 29 dneh precej višji kot v balonskem rezervoarju. Pri 37°C je bilo to razmerje večje kot pri ST, saj pri višji temperaturi izhlapi več vode. Povečanje koncentracij teh dveh učinkovin v rezervoarju dobro korelira z izgubo vode zaradi izhlapevanja.
- Pri sedemdnevni črpalkah je izhlapevanje vode zanemarljivo.
- Povprečni pretok je pri enodnevnih in sedemdnevni črpalkah pri vseh treh pogojih odstopal in to za več kot je dovoljeno v navodilih proizvajalca ($\pm 10\%$). Zaradi tega so te črpalke neustrezne.
- Pri polnjenju elastomernih črpalk z zdravilnimi učinkovinami naj se deksametazonfosfat doda nazadnje k že razredčeni raztopini ostalih učinkovin. Protibolečinska mešanica naj se izdelava še isti dan, ko bo mešanica aplicirana, oziroma naj bo čas od izdelave do uporabe čim krajši. Črpalka naj se od napolnitve do uporabe shranjuje v hladilniku in zaščiteno pred svetlobo. Pred svetlobo jo zaščitimo tudi med uporabo. Bolnik naj se izogiba visokim temperaturam (predvsem poleti) in neposredni izpostavitvi soncu.

6 LITERATURA

1. Walker R, Whittlesea C: Clinical Pharmacy and Therapeutics, 4th Edition, Churchill Livingstone, Edinburgh, 2007: 474-86.
2. World Health Organization: Cancer Pain Relief: with a guide to opioid availability, 2nd Edition, WHO, Geneva, 1996: 5-7.
3. Lahajnar S: Priporočila za zdravljenje bolečine pri odraslem bolniku z rakom. Onkologija 2000; Letnik IV št. 2: 86-100.
4. Salobir U: Paliativna oskrba bolnika, Onkologija 2001; Letnik V št. 2: 87-90.
5. Kekec P, Centraliziran postopek izdelave in spremljanje kakovosti parenteralne analgetične mešanice, Diplomaska naloga, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2006: 8-12.
6. Lahajnar-Čavlovič S, Krčevski-Škvarč N, Stepanovič A, Čufer T: Usmeritve za zdravljenje bolečine pri odraslem bolniku z rakom. Zdravniški vestnik 2008; 77: 7-12.
7. Lahajnar S, Salobir U: Titracija pravega odmerka morfina in zdravljenje pribijajoče bolečine. Onkologija 2002; Letnik VI št. 2: 79-83.
8. Logonder M, Salobir U, Žargi T: Uporaba črpalk za podkožno dajanje zdravil v paliativni oskrbi. Onkologija 2002; Letnik VI št. 1: 40-4.
9. Moulin D E, Johnson N G, Murray-Parsons N, Geoghegan M F, Goodwin V A, Chester M A: Subcutaneous narcotic infusions for cancer pain: treatment outcome and guidelines for use. Can Med Assoc J 1992; 146 (6): 891-7.
10. Bernot M: Podkožna infuzija z elastomerno črpalko, splošni operativni postopek, dejavnost zdravstvene nege in oskrbe bolnika, Onkološki inštitut Ljubljana 2007.
11. Lahajnar S: Podkožne infuzije morfina in drugih zdravil pri bolniku z rakom. Onkologija 2005; Letnik IX št. 1: 49-51.
12. Navodila proizvajalcev elastomernih črpalk (Baxter in Diafuser).
13. Ackermann M, Maier S, Ing H, Bonnabry P: Evaluation of the design and reliability of three elastomeric and one mechanical infusers. J Oncol Pharm Pract 2007; 13: 77-84.
14. Rožman S, Virant I, Sonc M: Splošni operativni postopek priprave analgetičnih mešanic, Onkološki inštitut Ljubljana 2009.
15. Rožman S, Virant I, Sonc M: Splošni operativni postopek dela v brezprašni komori, Onkološki inštitut Ljubljana 2007.

16. Eberl A, Rožman S, Sonc M: Splošni operativni postopek signiranja analgetičnih mešanic, Onkološki inštitut Ljubljana 2009.
17. Kmetec V, Rožkar R: Vaje iz stabilnosti zdravil, Fakulteta za farmacijo, Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko, Univerza v Ljubljani, 2002.
18. Lund W: The Pharmaceutical Codex: Principles and Practice of Pharmaceutics, 12th Edition, The Pharmaceutical Press, London, 1994.
19. European Pharmacopoeia, 6th Edition, Council of Europe, Strasbourg 2007.
20. The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals, 14th Edition, Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, New Jersey, 2006.
21. Trissel L A: Handbook on injectable drugs, 14th Edition, American society of Health-System Pharmacists, Bethesda, 2007.
22. <http://www.healthpricer.com/morphine-sulfate-15mg-details-and-side-effects/5242068.html> (dostopano: april 2010)
23. Vermeire A, Remon J P: Stability and compatibility of morphine. *Int J Pharm* 1999; 187 (1): 17-51.
24. http://www.stjuderesearch.org/guy/data/parasite_bioactives_screen/MAL_W2/Results/122.html (dostopano: april 2010)
25. http://www2.ciando.com/shop/book/readex/index.cfm/fuseaction/readex/bok_id/1479/c_at_id/111/cat_nav/103 (dostopano: april 2010)
26. Vermeire A, Remon J P: Compatibility and stability of morphine in binary admixtures with haloperidol, midazolam, dexamethasone or methylprednisolone. *Int J Pharm* 1998; 174 (1-2): 157-77.
27. <http://www.pharmacology2000.com/General/Pharmacokinetics/kinobj4.htm#General%20Principles:%20Pharmacokinetics%20continued> (dostopano: april 2010)
28. <http://www.drugbank.ca/cgi-bin/getCard.cgi?CARD=APRD00493> (dostopano: april 2010)
29. Stucki M C, Fleury-Souverain S, Sautter A M, Sadeghipour F, Bonnabry P: Development of ready-to-use ketamine hydrochloride syringes for safe use in post-operative pain. *Eur J Hosp Pharm Sci* 2008; 14 (1): 14-8.
30. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00281> (dostopano: april 2010)
31. <http://www.drugs.com/mmx/metoclopramide.html> (dostopano: april 2010)
32. <http://www.drugs.com/mmx/midazolam-hydrochloride.html> (dostopano: april 2010)

33. Arellano C, Philibert C, Vachoux C, Woodley J, Houin G: The metabolism of midazolam and comparison with other CYP enzyme substrates during intestinal absorption: in vitro studies with rat everted gut sacs. *J Pharm Pharm Sci* 2007; 10 (1): 26-36.
34. Vermeire A, Remon J P: Compatibility and stability of ternary admixtures of morphine with haloperidol or midazolam and dexamethasone or methylprednisolone, *Int J Pharm* 1999; 177 (1): 53-67.
35. Twycross R, Wilcock A, Charlesworth S, Dickman A: *Palliative Care Formulary*, 2nd Edition, Radcliffe Medical Press Ltd, Oxford, 2002: 300-3.
36. Negro S, Azuara M L, Sánchez Y, Reyes R, Barcia E: Physical compatibility and in vivo evaluation of drug mixtures for subcutaneous infusion to cancer patients in palliative care. *Support Care Cancer* 2002; 10: 65-70.
37. Wulf H, Gleim M, Mignat C: The stability of mixtures of morphine hydrochloride, bupivacaine hydrochloride, and clonidine hydrochloride in portable pump reservoirs for the management of chronic pain syndromes. *J Pain Symptom Manage* 1994; 9 (5): 308-11.
38. Hildebrand K R, Elsberry D D, Hassenbusch S J: Stability and compatibility of morphine-clonidine admixtures in an implantable infusion system. *J Pain Symptom Manage* 2003; 25 (5): 464-71.
39. Classen A M, Wimbish G H, Kupiec T C: Stability of admixture containing morphine sulfate, bupivacaine hydrochloride, and clonidine hydrochloride in an implantable infusion system. *J Pain Symptom Manage* 2004; 28 (6): 603-11.
40. ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), 2005.