

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TEA KUS GRILANC

**RAZVOJ NOVE ANALIZNE METODE ZA DOLOČANJE
ACETILSALICILNE KISLINE IN NJENA APLIKACIJA NA
PODROČJU STABILNOSTI**

**DEVELOPMENT OF A NEW ANALYTICAL METHOD FOR
ACETYLSALICYLIC ACID DETERMINATION AND ITS
APPLICATION IN STABILITY**

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo sem opravljala na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko Fakultete za farmacijo v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Roberta Roškarja, mag. farm.

Zahvala

Zahvaljujem se svojemu mentorju doc. dr. Robertu Roškarju, mag. farm. za strokovnost, korektnost, pomoč in dostopnost pri izvajanju eksperimentalnega dela in pisanju diplomske naloge. Hvala tudi vsem sodelavcem na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko za pomoč pri izvajanju eksperimentalnega dela. Iskrena zahvala gre celotni moji družini, možu Lovru, otrokoma Juliji in Timoteju ter seveda vsem, ki ste tako z veseljem popazili nanju v času, ko sem se sama posvečala študiju. Posebna zahvala gre moji mami, ki že od mojega rojstva dalje verjame vame in me vzpodbuja. Hvala, ker me vedno vidiš v najlepši luči in mi s tem pokažeš kaj vse lahko postanem.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom doc. dr. Roberta Roškarja, mag. farm.

Tea Kus Grilanc

Predsednik diplomske komisije:

prof. dr. Danijel Kikelj, mag. farm.

Članica diplomske komisije:

doc. dr. Barbara Ostanek, mag. farm.

Ljubljana, oktober 2013

VSEBINA

POVZETEK	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1 UVOD	1
1.1 DELOVANJE ACETILSALICILNE KISLINE	1
1.1.1 ODKRITJE IN ZGODOVINA ACETILSALICILNE KISLINE	1
1.1.2 MEHANIZEM DELOVANJA	2
1.1.3 UPORABA	3
1.1.4 NEŽELENI UČINKI IN KONTRAINDIKACIJE	5
1.1.5 FARMAKOKINETIKA ASA	7
1.2 STABILNOST ASA	8
1.2.1 STABILNOST ASA V TRDNI OBLIKI	9
1.2.2 STABILNOST ASA V VODNIH RAZTOPINAH	10
1.3 ANALIZNE METODE ZA DOLOČEVANJE ASA	12
2 NAMEN DELA	13
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 MATERIALI	14
3.1.1 REAGENTI, RAZTOPINE IN SUBSTANCE	14
3.1.2 NAPRAVE IN PRIBOR	14
3.2 RAZVOJ ANALIZNE METODE	15
3.2.1 RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA ANALIZNE METODE	15
3.2.2 KONČNI KROMATOGRFSKI POGOJI HPLC ZA VREDNOTENJE ASA	17

3.3	VREDNOTENJE ANALIZNE METODE	17
3.3.1	METODA ZA SOČASNO DOLOČANJE KONCENTRACIJE ASA IN SA..	17
3.3.2	METODA ZA DOLOČANJE CELOKUPNE ASA	20
3.4	STABILNOST STANDARDA ASA	22
3.4.1	STABILNOST STANDARDA ASA V RAZLIČNIH MEDIJIH.....	22
3.4.2	STABILNOST STANDARDA ASA PRI RAZLIČNIH TEMPERATURAH.	23
3.4.3	STABILNOST STANDARDA ASA PRI RAZLIČNIH pH VREDNOSTIH..	23
3.4.4	STABILNOST STANDARDA ASA PRI RAZLIČNIH KONCENTRACIJAH VZORCA	24
3.5	APLIKACIJA METODE ZA DOLOČANJE CELOKUPNE ASA NA PODROČJU STABILNOSTI	24
3.6	OBDELAVA PODATKOV	25
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	26
4.1	RAZVOJ ANALIZNE METODE	26
4.2	VREDNOTENJE ANALIZNE METODE	29
4.2.1	METODA ZA SOČASNO DOLOČANJE KONCENTRACIJE ASA IN SA..	29
4.2.2	METODA ZA DOLOČANJE CELOKUPNE ASA	37
4.3	STABILNOST STANDARDA ASA	46
4.3.1	STABILNOST STANDARDA ASA V RAZLIČNIH MEDIJIH.....	46
4.3.2	STABILNOST STANDARDA ASA PRI RAZLIČNIH TEMPERATURAH.	47
4.3.3	STABILNOST STANDARDA ASA PRI RAZLIČNIH pH VREDNOSTIH..	52

4.3.4	STABILNOST STANDARDA ASA PRI RAZLIČNIH KONCENTRACIJAH.....	53
4.4	APLIKACIJA METODE ZA DOLOČANJE CELOKUPNE ASA NA PODROČJU STABILNOSTI	54
5	SKLEP.....	59
6	LITERATURA.....	60

POVZETEK

Acetilsalicilna kislina (ASA) je zaradi svoje široke uporabnosti, cenovne dostopnosti in dolge zgodovine uporabe včasih poimenovana kar čudežno zdravilo. Vendar pa imamo poleg vseh prednosti tudi eno slabost, to je nestabilnost v vodnih raztopinah. Pri sami izdelavi in shranjevanju zdravil, to ni velika ovira, saj so v trdnih farmacevtskih oblikah, kjer je stabilnost ASA dobra. Problem nastane pri vrednotenju ASA, saj metode in naprave zahtevajo raztopine. V vodnih raztopinah je hidroliza ASA izjemno hitra, zato lahko prihaja do napak pri interpretaciji rezultatov, potrebna je tudi takojšnja analiza vzorcev.

Zato je bil namen naše diplomske naloge razviti metodo, ki bo dajala točne in natančne rezultate, hkrati pa rezultat ne bo odvisen od časa analize. Tako smo vpeljali novo metodo za določanje celokupne vsebnosti ASA, ki poleg vsebnosti ASA upošteva še vsebnost SA, ki je edini razpadni produkt hidrolize ASA. Odnos med odzivom ASA in SA pa smo opredelili s faktorjem odziva (RF, ang. response factor).

Novo metodologijo smo razvili, optimizirali, validirali in preizkusili. Najprej na standardu, nato na stabilnostnih vzorcih, nazadnje pa še na realnih pripravkih in vzorcih sproščanja in tako pokazali, da je naša metoda ustrezna za določanje vsebnosti ASA.

Z namenom stabilizacije vzorcev ASA smo proučevali več dejavnikom in kvantitativno ovrednotili odnos med posameznim dejavnikom in stabilnostjo učinkovine. Ugotovili smo, da je ASA najbolj stabilna v mediju, ki je zmes 0,1 % H_3PO_4 : ACN = 1 : 1, da je njena stabilnost obratno sorazmerna s temperaturo, odvisna pa je tudi od pH vrednosti: najbolj stabilna je pri pH 2, najmanj pa pri pH 12. Koncentracija ASA v vzorcu pa na stabilnost ne vpliva.

Aplikacija nove metode na področju stabilnosti se je izkazala za uspešno, kar bolj opazno pri tistih vzorcih pri katerih je obseg hidrolize ASA večji. Prednost te metode v primerjavi s klasično metodo v smislu natančnosti in točnosti se je še posebej pokazala pri analizi vzorcev sproščanja, saj prihaja do hidrolize ASA že med samim izvajanjem testa in tudi pred analizo vzorcev.

SEZNAM OKRAJŠAV

ASA: acetilsalicilna kislina

SA: salicilna kislina

COX: ciklooksigenaza

PGE₂: prostaglandin E₂

PGI₂: prostaciklin

TXA₂: tromboksan A₂

NSAR: nesteroidni antirevmatiki

ASSA: acetilsalicilsalicilna kislina;

SSA: salicilsalicilna kislina

k: hitrostna konstanta hidrolize

HPLC: tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

RF: faktor odziva (ang. response factor)

ACN: acetonitril

R²: determinacijski koeficient

RSD: relativna standardna deviacija

1 UVOD

1.1 DELOVANJE ACETILSALICILNE KISLINE

Acetilsalicilna kislina (ASA) je ena izmed najbolj razširjenih učinkovin na svetu. Samo v Ameriki njena letna poraba presega 45 000 ton, kar pomeni, da Američani zaužijejo približno 80 milijonov tablet ASA dnevno (1). Je derivat naravnega produkta izoliranega iz skorje vrbe, ki so ga v preteklosti uporabljali v terapiji bolečine in vnetja ter za lajšanje drugih vnetnih simptomov artritisa. Glavna učinkovina v izvlečku vrbe je salicilna kislina (SA), ki pa so jo zaradi slabe compliance bolnikov z acetiliranjem spremenili v acetilsalicilno kislino (2). ASA je v rabi za terapijo akutne in kronične bolečine, artritisa in, predvsem v zadnjem času, tudi v terapiji srčnožilnih bolezni (1).

1.1.1 ODKRITJE IN ZGODOVINA ACETILSALICILNE KISLINE

Zgodovina uporabe acetilsalicilne kisline sega več tisočletij v zgodovino. Sprva so uporabljali izvlečke iz rastlin, ki so vsebovali derivate salicilne kisline. Leta 1874 je Maclagan uspešno uporabil salicin, grenko učinkovino iz bele vrbe, za zmanjšanje bolečine, povišane temperature in vnetja pri revmatoidni vročici. Istega leta so Kolbe in njegovi sodelavci pri Heyden Chemical Company pričeli z organsko sintezo salicilne kisline, katere uspeh je pritegnil zanimanje farmacevtskega podjetja Fredericka Bayerja. Takratni vodja kemijsko raziskovalnega laboratorija pri Bayerju, Arthur Einchengrün, je leta 1895 mlademu kemiku Felixu Hoffmannu dodelil nalogo, da poišče derivat z enako ali boljšo učinkovitostjo kot jo ima salicilna kislina. Mladi raziskovalec je imel tudi osebno željo po izboljšanju učinkovine, saj njegov oče po letih jemanja salicilne kisline za zdravljenje artritisa, zdravila ni več prenašal, ob vsakem jemanju je namreč bruhal. Tako je zaradi želje pomagati očetu in predanosti svojemu delu, v strokovni literaturi odkril možnost acetiliranja hidroksilne skupine na benzenovem obroču salicilne kisline (3). Leta 1897 je sintetiziral acetilsalicilno kislino, ki je brez okusa in je bila med bolniki dobro sprejeta (1). Leta 1899 je prišla na trg v obliki tablet, zdravilo pa so poimenovali aspirin (3). A- od acetiliranja, -spir- od »Spirsäure (salicilna kislina)« in -in kot končnica tipična za zdravila (4). V petnajstih letih je aspirin postal eno izmed najbolj razširjenih zdravil po

svetu, prava farmacevtska uspešnica, kljub temu, da do leta 1971 sploh nismo poznali natančnega mehanizma delovanja (5).

1.1.2 MEHANIZEM DELOVANJA

Natančen mehanizem delovanja je pojasnil šele John Vane, ki je leta 1971 dokazal, da ASA zavira encim ciklooksigenazo (COX). Za to odkritje je leta 1982 prejel Nobelovo nagrado za medicino. Ciklooksigenaza katalizira oksidacijo in ciklizacijo arahidonske kisline v endoperokside, katerih končni produkti so prostaglandini, prostaciklini in tromboksani ter se nahaja v treh različnih izoformah (1, 6).

COX-1 je konstitutivno prisotna v večini tkiv, največ pa se je nahaja v gastrointestinalnem traktu in ledvicah, kjer proizvaja prostaglandin E_2 (PGE_2) in prostaciklin (PGI_2). V trombocitih pa COX-1 proizvaja tromboksan A_2 (TXA_2), ki je udeležen v agregaciji trombocitov in nastanku tromba (1). Antitrombotično delovanje ASA je posledica zaviranja COX-1 v trombocitih. ASA po vstopu skozi substratni kanal acetilira serinski ostanek (Ser-530) humane COX-1 in tako prepreči vezavo arahidonske kisline v aktivno mesto encima. Ker je vezava ireverzibilna, je antitrombotičen učinek dolgotrajen (približno 10 dni) (2, 7).

COX-2 je inducibilen encim, ki se izraža pod vplivom proinflammatoryh citokinov in rastnih dejavnikov ter je udeležen v procesih bolečine, vnetja in povišane telesne temperature (8). Konstitutivno pa je prisoten v možganih, ledvicah, trebušni slinavki, črevesju in žilah, kjer ima pomembno vlogo v obrambi želodčne sluznice, angiogenezi, zdravljenju želodčnih razjed in tumorski rasti (1). V aminokislinski sestavi COX-1 in COX-2 obstaja 60 % homologija. Tako kot se ASA veže na Ser-530 v aktivnem mestu COX-1, se veže tudi na Ser-516 v aktivnem mestu COX-2. Vendar pa je aktivno mesto COX-2 nekoliko večje kot aktivno mesto COX-1, zato se lahko arahidonska kislina kljub vezavi ASA veže v aktivno mesto encima in se pretvori v 15-hidroksieikozatetraenojsko kislino (15-R-HETE). To malo razliko v velikosti aktivnega mesta so raziskali tudi v farmacevtskih podjetjih, kjer so razvili selektivne COX-2 zaviralce z namenom zmanjšanja neželenih učinkov na želodčno sluznico (3).

COX-3 je različica COX-1, ki je obdržal intron-1. Poleg znanega COX-3 zaviralca paracetamola, so COX-3 zaviralci tudi nesteroidni antirevmatiki (NSAR) v nizkih odmerkih. Selektivni COX-3 zaviralci so uporabni v terapiji bolečine in povišane telesne temperature (3, 9).

ASA je zaviralec vseh treh izoform encima ciklooksigenaze, vendar ima največjo afiniteto do COX-1 (1, 10). V zadnjem času ASA poleg razjasnjene antitrombotičnega učinka, pripisujejo tudi pozitiven vpliv pri zdravljenju polipov kolona pri heriditalni adenomatozni polipozi, Alzheimerjevi bolezni in virusnih infekcijah, čeprav mehanizem še ni pojasnjen (2). Zaradi neželenih učinkov (predvsem negativnega vpliva na želodčno sluznico) so se v zadnjem času pojavile nove farmacevtske oblike ASA, ki naj bi zmanjšale te učinke. Ena izmed takih oblik je nitro-ASA, ki združuje ASA in skupino, ki sprošča dušikov oksid. Dušikov oksid se sprošča v želodcu in zaščiti želodčno sluznico pred negativnimi vplivi želodčne kisline. V prihodnosti lahko pričakujemo upad uporabe ASA za zdravljenje osteoartritisa in revmatoidnega artritisa, saj so na trgu že zdravila z manj neželenimi učinki, medtem ko bo njena raba kot antitrombotično zdravilo v preventivi skoraj zagotovo naraščala (3).

1.1.3 UPORABA

Acetilsalicilna kislina spada v skupino kislih NSAR z analgetičnimi, antipiretičnimi in protivnetnimi lastnostmi (11). Njeno antipiretično, analgetično in protivnetno delovanje je posledica blokade ciklooksigenaze, ki ima za posledico zmanjšanje sinteze PGE₂. Zaviranje ciklooksigenaze poteka na dva načina, in sicer z neposrednim zaviranjem COX in z zmanjšanjem števila receptorjev COX (ang. down regulation). ASA je med vsemi NSAR edina, ki COX zavira z irreverzibilnim acetiliranjem encima, medtem ko preostali NSAR encima ne acetilirajo, temveč so reverzibilni kompetitivni zaviralci encima (12, 13). Peroralni odmerki 300 mg do 1 g acetilsalicilne kisline se uporabljajo za lajšanje bolečin in zniževanje zvišane telesne temperature, tudi pri prehladu ali gripi in za lajšanje bolečin v sklepih in mišicah. Uporablja se tudi pri akutnih in kroničnih vnetnih boleznih, kot so revmatoidni artritis, osteoartroza in ankilozirajoči spondilitis. Acetilsalicilna kislina v odmerkih 75 do 300 mg zavira agregacijo trombocitov, saj z irreverzibilno vezavo na

COX-1 onemogoča sintezo TXA_2 , ki je ključen za nastanek tromba. Njena uporaba v preventivi srčnožilnih obolenj naj bi zmanjšala tveganje za sekundarni srčnožilni dogodek za 25 % (14, 15).

V Sloveniji je na voljo precejšnje število zdravil, ki vsebujejo ASA, nekaj med njimi je tudi takih, ki poleg ASA vsebujejo še ostale učinkovine. Pojavlja se v različnih farmacevtskih oblikah od tablet, filmsko obloženih tablet, gastrozistentnih tablet, žvečljivih tablet, šumečih tablet, kapsul s prirejenim sproščanjem, do zrnc za peroralno suspenzijo. Razpon odmerkov v omenjenih farmacevtskih oblikah je od 25 mg do 500 mg. Priporočen enkratni odmerek je do 1000 mg ASA, maksimalni dnevni odmerek pa znaša 4000 mg ASA. Zdravila, ki vsebujejo ASA in jih je možno dobiti v slovenskih lekarnah so navedena v Preglednici I (16-19).

Preglednica I: Zdravila z ASA v slovenskih lekarnah (povzeto po: 16-19)

Ime zdravila	Učinkovina	Odmerek [mg]	Klasifikacija
Andol 100	acetilsalicilna kislina	100	antitrombotiki
Asasantin	acetilsalicilna kislina, dipiridamol	25, 200	antitrombotiki
Ascalcin	acetilsalicilna kislina, askorbinska kislina	500, 300	antipiretiki in analgetiki
Aspirin 500	acetilsalicilna kislina	500	antipiretiki in analgetiki
Aspirin complex	acetilsalicilna kislina, psevdoefedrin	500, 30	antipiretiki in analgetiki
Aspirin direkt	acetilsalicilna kislina	500	antipiretiki in analgetiki
Aspirin migran	acetilsalicilna kislina	500	antipiretiki in analgetiki
Aspirin plus C	acetilsalicilna kislina, askorbinska kislina	400, 240	antipiretiki in analgetiki
Aspirin protect	acetilsalicilna kislina	100 in 300	antitrombotiki
Axanum	acetilsalicilna kislina, esomeprazol	81, 20	antitrombotiki
Cardiopirin	acetilsalicilna kislina	100	antitrombotiki
Duoplavin	acetilsalicilna kislina, klopidogrel	100, 75	antitrombotiki
Excedrinil	acetilsalicilna kislina, kofein, paracetamol	250, 65, 250	antipiretiki in analgetiki
Maridol migren	acetilsalicilna kislina, paracetamol, kofein	250, 200, 50	antipiretiki in analgetiki

1.1.4 NEŽELENI UČINKI IN KONTRAINDIKACIJE

Kot vsa zdravila ima tudi ASA neželene učinke. Ti se pogosteje pojavijo ob dolgotrajni uporabi in pa pri večjih odmerkih. Najbolj tipičen neželen učinek ASA je krvavitev v prebavilih, poleg te pa se lahko pojavljajo še okvare ledvic, nepričakovane in daljše krvavitve, draženje oz. srbenje kože, zvonjenje v ušesih in drugi (7, 11, 13, 20).

Krvavitve v prebavilih

Nastanek razjed v želodcu oz. krvavitve v prebavilih so najizrazitejši in najbolj moteč neželen učinek ASA, ki je posledica zaviranja fiziološke vloge COX-1, to je sinteze prostaglandinov. Ti v želodcu namreč zmanjšujejo izločanje želodčne kisline in povečajo izločanje bikarbonata in mukusa (7, 13, 20). Študije so pokazale, da tudi jemanje nizkih odmerkov poveča tveganje za krvavitve v zgornjem delu gastrointestinalnega trakta, ta pa se še poveča, če terapija vključuje še kakšno zdravilo iz skupine NSAR. Tudi v primeru ko gre za farmacevtsko obliko, ki je gastrozistentna, se tveganje ne zmanjša (21). Krvavitve v gastrointestinalni trakt so se pojavile pri 3 % bolnikov nad 70 let, ki so prejeli 100 mg ASA dnevno, 12 mesecev v primerjavi z odsotnostjo pri skupini, ki je prejela placebo (22). Soterapija z zaviralci protonske črpalke pa je značilno zmanjšala tveganje za krvavitve v zgornjem delu gastrointestinalnega trakta (23).

Druge krvavitve

Pri terapiji z ASA se kot neželen učinek lahko izrazi tudi krvavitev oz. podaljšan čas krvavitve, ki se lahko pojavi pri operacijah ali pri ekstrakciji zoba. Mehanizem delovanja je poznan, saj je posledica antitrombotičnega delovanja ASA (20).

Okvare ledvic

ASA povzroča od odmerka odvisno ledvično okvaro, ki se lahko pri bolnikih z zmanjšano ledvično funkcijo kaže v minimalnem zadrževanju vode in soli. Predoziranje pa lahko povzroči akutno tubulno nekrozo ali ledvično odpoved (20). ASA oslabi antioksidantni sistem, saj pomakne ravnotežje med oksidanti in reducenti v prid oksidantom, to pa povzroča ledvične in tudi jetrne okvare (24).

Draženje kože

Kožna reakcija se lahko pojavi že 15 minut po zaužitju ASA ali pa do 24 ur za njim, povprečno pa nastopi 1-4 ure po aplikaciji. V večini primerov reakcija izgine v nekaj urah, pri težjih oblikah pa lahko vztraja do 10 dni po zaužitju. Mehanizem z ASA povzročene urtikarije je povezan z zaviranjem COX-1 (25). Čeprav natančen mehanizem ni znan, gre najbrž za odgovor posredovan z Ig-E (26).

Zvonjenje v ušesih

Zvonjenje v ušesih ali tinitus se lahko pojavi kot posledica predoziranja ali daljše uporabe ASA. Mehanizem tega neželenega učinka gre preko z zvokom povzročene signalne transdukcije, ki jo prekine ASA (20).

Poleg omenjenih in dobro znanih neželenih učinkov, pa so poročali še o dveh koristnih učinkih, to sta antikancerogen in anti-HIV/AIDS učinek (20).

Kontraindikacije

ASA je kontraindicirana pri naslednjih boleznih ali stanjih:

- pri znani preobčutljivosti za zdravilno učinkovino in druge salicilate
- pri akutni razjedi na želodcu ali dvanajstniku
- pri povečani nagnjenosti h krvavitvam (hemoragična diateza)
- pri bolnikih, ki imajo v anamnezi astmatične napade po jemanju salicilatov oz. snovi s podobnim delovanjem (NSAR)
- pri hudi ledvični okvari
- pri hudi jetrni okvari
- pri hudem srčnem popuščanju
- pri bolnikih, ki jemljejo metotreksat v odmerkih 15 mg/teden ali več

- zadnje tri mesece nosečnosti

Zdravila, ki vsebujejo ASA, se lahko dajejo otrokom in mladostnikom z zvišano telesno temperaturo samo, če se je pred tem skrbno pretehtalo, kolikšno je tveganje in kolikšne so prednosti. Obstaja namreč možnost pojava Reyevega sindroma, ki je redka akutna in včasih fatalna otroška bolezen, posledica noric ali virusne okužbe dihalnih poti, lahko v povezavi z jemanjem ASA, ki se kaže kot ponavljajoče se bruhanje z naraščanjem koncentracije serumskih transaminaz, s spremenjeno funkcijo jeter in drugih prebavil, sledi lahko encefalopatična faza z akutnim edemom možganov in motnjo zavesti s krči (6, 11).

Med tretjim trimesečjem nosečnosti se lahko pri plodu, ki je izpostavljen zaviralcem prostaglandinov pojavijo srčnopljučna toksičnost (s prezgodnjim zaprtjem ductusa arteriosusa in pljučno hipertenzijo) ali moteno delovanje ledvic, ki se lahko razvije do ledvične odpovedi z oligohidroamniozo. Pri materi in otroku, ki sta bila izpostavljena zaviralcem sinteze prostaglandinov se lahko na koncu nosečnosti pojavi podaljšanje krvavitve (zaradi antiagregacijskega učinka, ki se lahko pojavi že pri zelo majhnih odmerkih) in pa zavrto krčenje maternice, kar povzroči zakasnel in podaljšan porod. Zaradi teh pojavov je jemanje acetilsalicilne kisline v odmerkih 100 mg/dan ali več med zadnjim trimesečjem nosečnosti kontraindicirano (11).

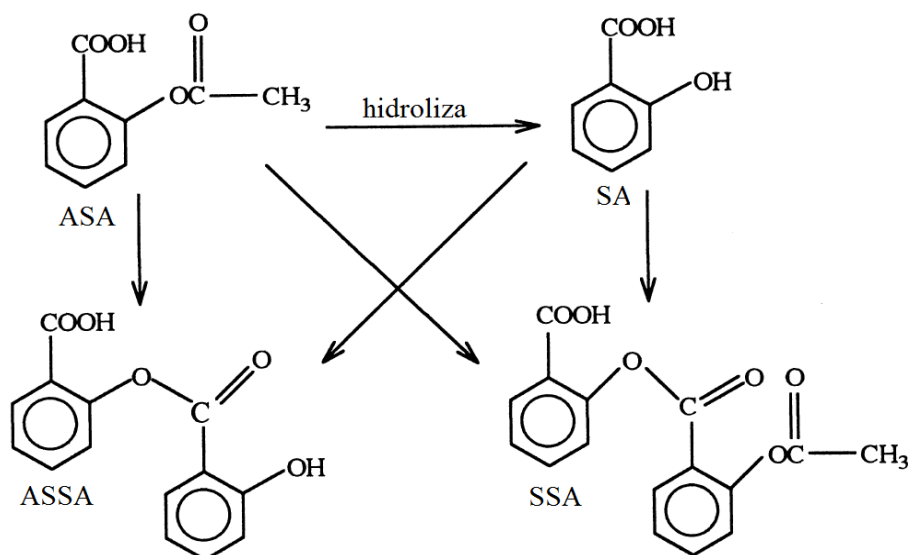
1.1.5 FARMAKOKINETIKA ASA

Acetilsalicilna kislina se po peroralni uporabi absorbira iz želodca in tankega črevesa v 80-100 %. Stopnja absorpcije je odvisna od farmacevtske oblike, luminalnega pH-ja in praznjenja želodca. Njena biološka uporabnost pa je nekoliko nižja zaradi hidrolize med absorpcijo in zaradi prvega prehoda skozi jetra (27). Med absorpcijo in po njej se pretvori v svoj glavni presnovek- salicilno kislino. Največja koncentracija acetilsalicilne kisline v plazmi je čez 10 do 20 minut, salicilne kisline pa po 20 do 120 minutah. Acetilsalicilna kislina in salicilna kislina se v 50-80 % vežeta na plazemske beljakovine in se hitro porazdelita po vsem telesu, preostanek pa se nahaja v ionizirani, aktivni obliki. Volumen porazdelitve je 0.15-0.2 L/kg. Salicilna kislina prehaja skozi placento in se izloča v materino mleko. Salicilna kislina se metabolizira pretežno v jetrih (80 %). Glavni

presnovki so salicilurična kislina, ki nastane po konjugaciji z glicinom; salicilfenolniglukuronid in salicilacilglukuronid, ki nastaneta po konjugaciji z glukuronsko kislino; in gentizinska kislina, ki nastane s hidroksilacijo. Metabolizem salicilne kisline je odvisen od odmerka, kajti zmogljivost jetrnih encimov omejuje presnovo. Pri večjih odmerkih kinetiko 1. reda zamenja kinetika 0. reda. Razpolovna doba izločanja po zaužitju majhnih odmerkov (do 4 g) traja dve do tri ure, po zaužitju velikih (4 do 6 g) pa okoli 15 ur. Salicilna kislina in njeni presnovki se izločajo v glavnem skozi ledvice v obliki salicilurične kisline (75 %), proste salicilne kisline (10 %), salicil fenola (10 %), acilglukoronida (5 %) in gentizične kisline (<1 %) (11, 27-29).

1.2 STABILNOST ASA

ASA je substituiran fenilni ester. Kot aromatski ester ima dobro izstopajočo skupino in je posledično podvržena hidrolizi in ostalim acilnim transformacijam. Iz pH profila ASA je razvidno (Slika 3), da je občutljiva na kislo in bazično katalizirano hidrolizo pri čemer nastanejo v največji meri SA, poleg nje pa še salicilsalicilna kislina (SSA) in acetilsalicilsalicilna kislina (ASSA) kot je prikazano na Sliki 1 (30, 31).

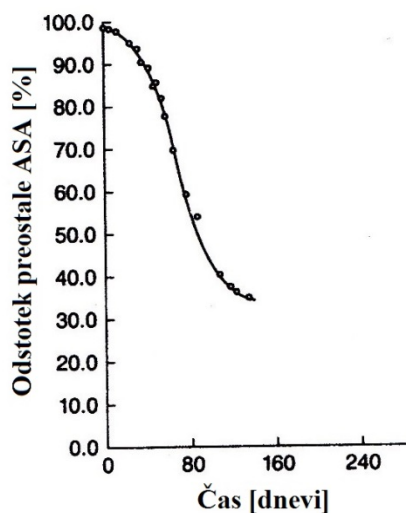


Slika 1: Hidroliza ASA (povzeto po 31)

ASA-acetilsalicilna kislina; SA-salicilna kislina; ASSA- acetilsalicilsalicilna kislina; SSA-salicilsalicilna kislina

1.2.1 STABILNOST ASA V TRDNI OBLIKI

Acetilsalicilna kislina je stabilna v trdni obliki, če jo shranjujemo zaščiteno pred vlago. Njen razpad je odvisen predvsem od prisotnosti vlage in temperature. Nestabilnost ASA po 50 dneh, ki je bila shranjena pri temperaturah od 35 do 110 °C in v odsotnosti vlage, je bila zanemarljiva. Možen mehanizem hidrolize v trdnem, ki sta ga predlagala Leeson in Mattocks, predpostavlja, da se na trdno snov adsorbira vlaga, ki ustvari plast vode. Posledično pride do difuzije ASA v raztopino in hidrolize s kislinsko katalizirano hidrolizo (32). Iz sigmoidne krivulje hidrolize, ki jo prikazuje Slika 2, je razvidno, da se hitrost hidrolize povečuje z nastajanjem salicilne kisline (33).



Slika 2: Hidroliza ASA v trdni obliki pri 60°C in 80,6 % relativni vlažnosti (povzeto po 33).

Stopnjo hidrolize ASA v adsorbirani plasti vode opisuje Enačba 1, ki jo je uvedel Carstensen s sodelavci. Iz nje lahko razberemo, da je hitrost hidrolize ASA, (dx/dt) , odvisna od koncentracije ASA, $[ASA]$, količine vlage, $[H_2O]$, volumna adsorbirane vodne plasti, V in hitrostne konstante, k .

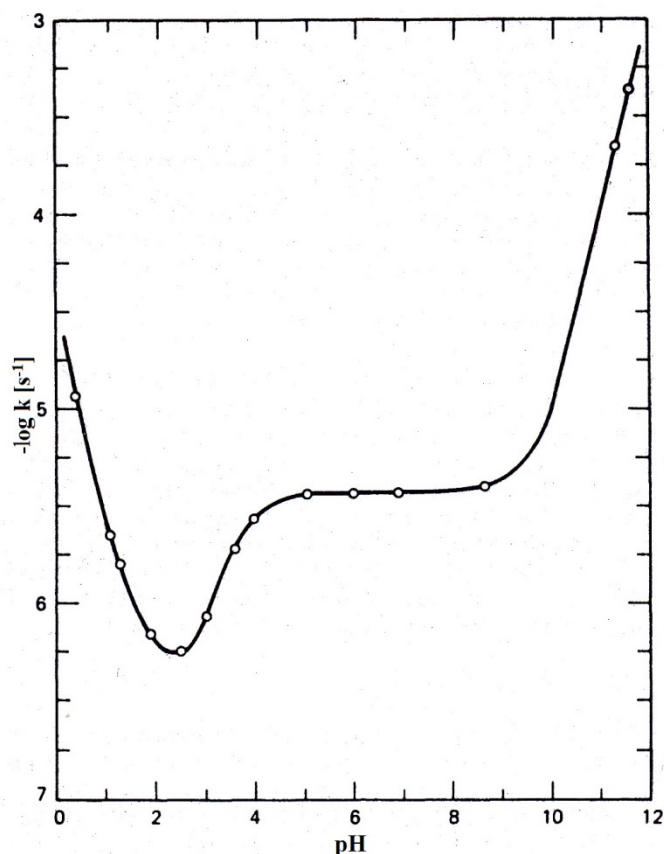
$$\frac{dx}{dt} = k(t) \cdot V(t) \cdot [ASA(t)] \cdot [H_2O(t)] \quad (\text{Enačba 1})$$

Carsteden je to enačbo uvedel z namenom predvidevanja oblike krivulje hidrolize ASA. Vendar pa se je ob primerjavi predpostavljene krivulje in krivulje, ki je odražala dejanski razpad ASA izkazalo, da so med njima precejšnje razlike. Iz tega lahko razberemo, da teorija o adsorbirani vodni plasti ne pojasni popolnoma mehanizma hidrolize ASA (33).

V študiji, kjer so preučevali hidrolizo ASA v trdnem, so tablete z ASA izpostavili trem različnim temperaturam: 50 °C, 60 °C in 70 °C ter relativni vlažnosti 90 %. Najhitreje je hidrolizirala ASA v tabletah izpostavljenih najvišji temperaturi, najmanj pa v tistih, ki so jih shranjevali pri najnižji temperaturi. Po 50 dneh so tablete izpostavljene temperaturi 50 °C vsebovale še 97,1 % ASA, tiste, ki so bile shranjene pri 60 °C še 93,1 % in tiste, ki so bile shranjene pri 70 °C še 89,5 % ASA (34).

1.2.2 STABILNOST ASA V VODNIH RAZTOPINAH

ASA v vodnih raztopinah je veliko manj stabilna kot v trdnem. Njena stabilnost pa je odvisna predvsem od temperature in pH vrednosti. Hitrost hidrolize narašča sorazmerno z naraščanjem temperature (32). ASA v vodnih raztopinah je najbolj stabilna pri pH 2-3, nekoliko manj pri pH 4-8 in najmanj stabilna pri pH nižjem od 2 ali višjem od 8 kar je razvidno iz pH profila, ki ga prikazuje Slika 3.



Slika 3: pH profil za hidrolizo ASA pri 25 °C (povzeto po 30).

Bolj nasičene vodne raztopine izkazujejo daljši razpolovni čas kot manj nasičene. V nasičenih vodnih raztopinah s pH 5-7 skoraj popolnoma hidrolizira pri 25 °C v enem tednu, v enem dnevu pa približno 20 % (27, 32, 35). ASA hidrolizira do SA v medijih kot so voda, metanol in plazma. Razpolovni čas ASA v plazmi pri 37 °C je približno ena ura (35). ASA je slabše topna pri nizkem pH-ju in zelo nestabilna v alkalnem pH-ju (36). V literaturnih podatkih raziskav, katerih primarni namen sicer ni bil določanje stabilnosti ASA, smo zasledili vrednosti hitrostnih konstant hidrolize ASA pri različni pH vrednostih in pri različnih temperaturah. Tako so Some s sodelavci določali hitrostno konstanto hidrolize ASA(k) po kinetiki 1. reda pri 25 °C za pH območje od 0,93-12,55. Pri pH 1,96 je znašala k $0,05 \text{ dan}^{-1}$, pri pH 5,96 je znašala $0,34 \text{ dan}^{-1}$, pri pH 12,55 pa je znašala $148,3 \text{ dan}^{-1}$, kar pomeni približno 3000 krat večjo hitrost hidrolize kot pH 1,96 (37). Angberg in Nyström pa sta določila konstante hidrolize ASA (k) pri pH 1,1 in v temperaturnem

območju od 30-50 °C (38). Vrednosti konstant, ki so predstavljene v Preglednici II, potrjujejo večjo nestabilnost ASA pri višji temperaturi.

Preglednica II: Hitrostne konstante hidrolize ASA pri pH 1,1 (povzeto po 38).

T [°C]	k [h ⁻¹ *10 ³]
30	14,0
35	21,2
40	32,3
45	52,2
50	81,1

Rezultati teh stabilnostnih študij kažejo, da je ASA v vodnih raztopinah dokaj neobstojna, saj že v krajših časovnih intervalih (ure, dnevi) prihaja do znatnega upada vsebnosti ASA.

1.3 ANALIZNE METODE ZA DOLOČEVANJE ASA

V analitiki ASA se uporabljajo različne metode, od titrimetrije, kolorimetrije, flurimetrije, spektrofotometrije, tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC), plinsko tekočinske kromatografije, Trinderjeve metode, potenciometrije, amperometrije do voltamerije (39-41). Evropska in ameriška farmakopeja pa opisujeta tekočinsko kromatografijo in titrimetrijo (42, 43). Trenutno je metoda prvega izbora reverznofazna HPLC, saj jo odlikuje kratek čas analize, visoka stopnja resolucije, dobra ponovljivost, selektivnost, točnost, natančnost, avtomatizacija, dostopnost instrumentalizacije in sposobnost za sočasno kvantifikacijo drugih analitov v vzorcu (npr. SA) (35, 44). Poleg številnih prednosti pa ima ta metoda tudi dve pomanjkljivosti, ki sta povezani s pripravo vzorca za analizo. Prva je izredno hitra hidroliza ASA do SA, ki se lahko pojavi že pred injiciranjem vzorca, druga pa je izhlapevanje SA (35).

Obstajajo analizne metode za določanje ASA kakor tudi za ASA v kombinacijami z drugimi spojinami. Za sočasno analizo ASA in SA, se pogosto uporablja HPLC (35, 45-50), poleg nje pa smo v literaturi zasledili še raziskave, v katerih so za sočasno določanje ASA in SA uporabili posredno in bolj specifično UV-spektrofotometrijo z uporabo njenega drugega odvoda (51), spektrofluorimetrijo (52), voltometrijo (53) in druge.

2 NAMEN DELA

Acetilsalicilna kislina je zaradi svoje vsestranske uporabnosti, cenovne dostopnosti in stoletne zgodovine uporabe včasih poimenovana kar čudežno zdravilo. Poleg tega, da je učinkovita kot analgetik, antipiretik, antiflogistik in antitrombotik, pa ima tudi nekaj slabosti oziroma neželenih učinkov. Pri vrednotenju ASA za različne namene je težavna tudi analitika zaradi njene nestabilnosti v vodnih raztopinah, saj je ASA izjemno nestabilna in v zelo kratkem času hidrolizira do SA. Zato je problematična za analizo, saj metode in naprave v analitiki običajno zahtevajo spojine v tekoči in ne trdni obliki.

Cilj diplomske naloge bo razviti takšno analizno metodo za kvantitativno vrednotenje ASA, da nestabilnost ASA v vodnih raztopinah ne bo vplivala na natančnost in točnost dobljenih rezultatov. V ta namen bomo:

- Proučili bomo stabilnost ASA v vodnih raztopinah in izbrali optimalne pogoje pri katerih bo stabilnost največja. Pri tem bomo določali stabilnost standarda ASA v različnih medijih (0,1 M HCl, pufer 4,5 in pufer 6,8), pri različnih temperaturah (4-37 °C), pri različnih pH vrednostih (2-12) in pri različnih koncentracijah ASA v vzorcu.
- Razvili in validirali bomo metodo za sočasno vrednotenje vsebnosti ASA in SA.
- Na osnovi validirane metode bomo vpeljali novo metodo za določanje koncentracije celokupne ASA (vsota ASA in SA). To bomo vrednotili posredno preko koncentracije njenega razpadnega produkta SA s pomočjo uporabe faktorja odziva (ang. response factor, RF).
- Z metodo za sočasno vrednotenje ASA in SA bomo preverili ustreznost nove, alternativne metode.
- Uporabnost predlagane metodologije bomo v zaključku potrdili še na realnih primerih, zdravilih ki vsebujejo ASA in so na voljo v lekarni.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 REAGENTI, RAZTOPINE IN SUBSTANCE

- acetilsalicilna kislina, $2-(\text{CH}_3\text{CO}_2)\text{C}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{H}$, $M_r = 180,16 \text{ g/mol}$; $\geq 99,0 \%$ (Sigma-Aldrich)
- salicilna kislina, $2-(\text{HO})\text{C}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{H}$, $M_r = 138,12 \text{ g/mol}$; $\geq 99,0 \%$ (Sigma-Aldrich)
- MiliQ voda, Fakulteta za Farmacijo
- acetonitril, $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$, Chromasolv[®], gradient grade, for HPLC, $M_r = 41,05 \text{ g/mol}$; $\geq 99,9 \%$ (Sigma-Aldrich)
- ortofosforjeva kislina 85 %, H_3PO_4 , $M_r = 98,00 \text{ g/mol}$; 1 L = 1,71 kg (Merck)
- metanol, CH_3OH , Chromasolv[®], for HPLC, $M_r = 32,04 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich)
- kalijev dihidrogen fosfat, KH_2PO_4 , $M_r = 136,08 \text{ g/mol}$; $\geq 99,5 \%$ (Merck)
- pufrne raztopine: pH 2, pH 3, pH 4, pH 6, pH 8, pH 10, pH 12 (Merck)
- klorovodikova kislina, HCl, Titrisol[®], 1 M (Merck)
- natrijev hidroksid, NaOH, Titrisol[®], 1 M (Merck)
- očetna kislina 100%, CH_3COOH , $M_r = 60,05 \text{ g/mol}$, $1,05 \text{ g/cm}^3$; $\geq 99,8 \%$ (Merck)
- mravljična kislina 98-100 %, CH_2O_2 , $M_r = 46,03 \text{ g/mol}$, 1 L = 1,22 kg (Merck)
- Aspirin protect, 100 mg (Bayer)
- Aspirin migran, 500 mg (Bayer)
- Aspirin, 500 mg (Bayer)

3.1.2 NAPRAVE IN PRIBOR

- digitalni tehtnici XP105 DeltaRange in Exacta 300EB (Mettler Toledo)
- avtomatske pipete 2-20 μl , 20-200 μl , 100-1000 μl (Eppendorf)
- čaše, merilne bučke, merilni valji, zamaški, tehtiči, viala, inserti, spatule, plastične kapalke, epice
- sistem za pripravo MiliQ vode 30 L, Millipore Billerica
- ultrazvočni kadički Sonis 4 (Iskra) in Bandelin Sonorex (Brandelin electronic)

- pH metra MA 5750 (Iskra) in MP 220 (Mettler Toledo)
- magnetno mešalo HI 190M (Hanna Instruments)
- kolona Gemini-NX 3u C18, 3 μm , 100 x 4,6 mm (Phenomenex)
- kolona Luna 3u NH₂, 3 μm , 150 x 3,0 mm (Phenomenex)
- kolona Gemini C 18, 5 μm , 150 x 4,6 mm (Phenomenex)
- kolona Zorbax Eclipse XDB-C8, 5 μm , 150 x 4,6 mm (Agilent)
- kolona Kinetex 5u XB-C18, 5 μm , 150 x 4,6 mm (Phenomenex)
- predkolona Gemini C18 4 x 3,0 mm (Phenomenex)
- HPLC sistem 1100/1200 series (Agilent Technologies): razplinjjevalec, kvarterna črpalka, avtomatski vzorčevalnik, termostat za kolono, UV–VIS detektor, programska oprema ChemStation
- sistem za filtriranje (Sartorius)
- celulozno-acetatni filter z velikostjo por 0,45 μm (Sartorius)
- viala z vgrajenim PVDF membranskim filtrom z velikostjo por 0,45 μm (Whatman)
- aparatura za testiranje sproščanja Vankel VK 7000 (Vankel)
- Chromafil RC-45/25 filtri za injekcijske brizge, 0,45 μm

3.2 RAZVOJ ANALIZNE METODE

3.2.1 RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA ANALIZNE METODE

Pri razvoju analizne metode smo za mobilno fazo uporabili zmes vodne in organske faze, pri čemer smo za vodno fazo uporabili 0,1 % H₃PO₄, fosfatni pufer umerjen na pH 3 ali fosfatni pufer umerjen na pH 6,8, za organsko fazo pa smo uporabili acetonitril (ACN). Omenjene sestavine smo mešali v različnih razmerjih, da smo določili idealno kombinacijo. Za vzorce smo uporabili standard ASA v fosfatnem pufru s pH 6,8 v koncentraciji 0,89 mmol/L. Spreminjali smo tudi temperaturo in uporabili različne kolone. Izbrane kolone in kromatografski pogoji so prikazani v Preglednici III.

Preglednica III: Kromatografski pogoji in izbor kolon pri razvoju metode.

Metoda	Kolona	MF	T
1	Gemini-NX 3u C18	0,1 % H ₃ PO ₄ : ACN = 50 : 50	25
2	Gemini-NX 3u C18	0,1 % H ₃ PO ₄ : ACN = 50 : 50	40
3	Luna 3u NH ₂	0,1 % H ₃ PO ₄ : ACN = 50 : 50	40
4	Luna 3u NH ₂	0,1 % H ₃ PO ₄ : ACN = 60 : 40	40
5	Kinetex 5u	0,1 % H ₃ PO ₄ : ACN = 50 : 50	40
6	Zorbax Eclipse XDB-C8	0,1 % H ₃ PO ₄ : ACN = 50 : 50	40
7	Gemini C18	0,1 % H ₃ PO ₄ : ACN = 55 : 45	40
8	Gemini C18	0,1 % H ₃ PO ₄ : ACN = 50 : 50	40
9	Gemini C18	pufer pH 3 : ACN = 50 : 50	40
10	Gemini C18	pufer pH 6,8 : ACN = 50 : 50	40
11	Gemini C18	0,1 % H ₃ PO ₄ : ACN = 45 : 55	40
12	Gemini C18	0,1 % H ₃ PO ₄ : ACN = 40 : 60	40
13	Gemini C18	0,1 % H ₃ PO ₄ : ACN = 30 : 70	40
14	Gemini C18	0,1 % H ₃ PO ₄ : ACN = 20 : 80	40

3.2.1.1 Priprava vodnih mobilnih faz

0,1 % H₃PO₄ smo pripravili tako, da smo z avtomatsko pipeto odmerili 1,176 mL 85 % H₃PO₄, jo kvantitativno prenesli v 1 L merilno bučko in z MiliQ vodo dopolnili do oznake ter dobro premešali. Vodno mobilno fazo smo še razplinili na ultrazvočni kadički.

Fosfatni pufer umerjen na pH 3 smo pripravili tako, da smo natehtali 3,40 g KH₂PO₄, ga kvantitativno prenesli v čašo in dodali 800 mL MiliQ vode ter mešali na magnetnem mešalu. pH meter smo s standardno pufrno raztopino pH 3 umerili na vrednost 3. Nato smo z uporabo 85 % H₃PO₄ po kapljicah uravnali pH puфра na vrednost 3. Nato smo pufer prelili v 1 L bučko in z MiliQ vodo dopolnili do oznake ter dobro premešali. Pufer smo filtrirali z vakuumskim filtrirnim sistemom preko celulozno-acetatnega filtra z velikostjo por 0,45 μm. Nazadnje smo pufer še razplinili na ultrazvočni kadički. Koncentracija tako pripravljene raztopine je bila 25 mmol/L.

Fosfatni pufer umerjen na pH 6,8 smo pripravili tako, da smo natehtali 3,40 g KH₂PO₄, ga kvantitativno prenesli v čašo in dodali 800 mL MiliQ vode ter mešali na magnetnem mešalu. pH meter smo s standardno pufrno raztopino pH 7 umerili na vrednost 7. Nato smo z uporabo 1 M NaOH po kapljicah uravnali pH puфра na vrednost 6,8. Nato smo pufer

prelili v 1 L bučko in z MiliQ vodo dopolnili do oznake ter dobro premešali. Pufer smo filtrirali z vakuumskim filtrirnim sistemom preko celulozno-acetatnega filtra z velikostjo por 0,45 μm . Nazadnje smo pufer še razplinili na ultrazvočni kadički. Koncentracija tako pripravljene raztopine je bila 25 mmol/L.

3.2.2 KONČNI KROMATOGRAFSKI POGOJI HPLC ZA VREDNOTENJE ASA

- Kolona: Gemini C 18, 5 μm , 150 x 4,6 mm (Phenomenex)
- Mobilna faza: 0,1 % H_3PO_4 : ACN = 45 : 55
- Pretok mobilne faze: 1 mL/min
- Temperatura kolone: 40 °C
- Volumen injiciranja: 10 μL
- Temperatura avtomatskega vzorčevalnika: 4 °C

- Valovna dolžina detekcije: 210 nm
- Retencijski čas ASA: 2,18 min
- Retencijski čas SA: 2,70 min
- Čas analize: 3,20 min

3.3 VREDNOTENJE ANALIZNE METODE

HPLC analizno metodo smo validirali po ICH smernicah (54). Validacija je potekala tri dni zapored, merili pa smo selektivnost, linearnost, ponovljivost, točnost in stabilnost. Validacijo smo izvedli za dve metodi, najprej za metodo sočasnega vrednotenja ASA in SA, nato pa za metodo celokupnega določanja ASA s pomočjo uporabe RF.

3.3.1 METODA ZA SOČASNO DOLOČANJE KONCENTRACIJE ASA IN SA

3.3.1.1 Selektivnost

Selektivnost metode se kaže v jasno ločenih kromatografskih vrhovih na kromatogramu analiziranih komponent, ki jih pričakujemo v vzorcu. To pomeni, da se kromatografski vrhovi ne smejo prekrivati in med komponentami ne sme prihajati do interferenc. Za dokazovanje selektivnosti smo posneli šest kromatogramov:

- Mobilno fazo: 0,1 % H_3PO_4 : ACN = 45 : 55
- 0,1 M HCl
- Acetatni pufer umerjen na pH 4,5
- Fosfatni pufer umerjen na pH 6,8
- Standard ASA in SA
- Pripravek z ASA
- Vzorec odvzet pri sproščanju pripravka z ASA

Na posnetih kromatogramih smo nato opazovali ločljivost kromatografskih vrhov in na ta način ovrednotili ustrezno selektivnost.

3.3.1.2 Linearnost

Linearnost analiznega postopka je sposobnost metode, da znotraj določenega intervala dosega rezultate, ki so neposredno sorazmerni s koncentracijo preiskovane snovi v vzorcu (54). Mi smo linearnost dokazali tako, da smo pripravili raztopino standardov ASA in SA za vrednotenje linearnosti in sicer tako, da smo približno natančno natehtali 8,00 mg ASA in 3,05 mg SA, ju stresli v isto bučko, raztopili v 1 mL metanola in z MiliQ vodo dopolnili do 50 mL. To je bila naša osnovna raztopina s koncentracijo 0,89 mmol/L ASA in 0,44 mmol/L SA, ki smo jo definirali kot 100 % raztopino, nato pa smo jo s topilom (0,1 % H_3PO_4 : ACN = 1 : 1) redčili tako, da smo pripravili 10 različnih redčitev osnovne raztopine: 0 %, 0,5 %, 1 %, 2,5 %, 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 % in 100 %. Tako pripravljenim vzorcem smo pomerili odzive z metodo HPLC. Dobljene odzive smo obdelali s pomočjo programa Excel in izračunali umeritveni premici z enačbama v obliki $y = bx + a$, ter determinacijska koeficienta (R^2) za ASA in SA. Za spodnjo mejo sprejemljivosti smo določili $R^2 > 0,9990$. To smo ponavljali tri dni zapored.

3.3.1.3 Ponovljivost

Ponovljivost metode izraža natančnost pod enakimi pogoji in v kratkem časovnem intervalu. ICH smernice Q2(R1) priporočajo oceno ponovljivosti pri treh različnih koncentracijah, ki pokrivajo specificirano območje (54). Mi smo ponovljivost preučevali tako, da smo pripravili raztopino standardov ASA in SA za vrednotenje ponovljivosti in

sicer tako, da smo približno natančno natehtali 8,00 mg ASA in 3,05 mg SA, ju stresli v isto bučko, raztopili v 1 mL metanola in z MiliQ vodo dopolnili do 50 mL. To je bila naša osnovna raztopina s koncentracijo 0,89 mmol/L ASA in 0,44 mmol/L SA, ki smo jo definirali kot 100 %, nato pa smo jo s topilom (0,1% H₃PO₄ : ACN = 1 : 1) redčili tako, da smo pripravili 2 %, 45 % in 90 % raztopino. Za vsako koncentracijo smo pripravili tri paralele. Ponovljivost smo določali na treh nivojih.

Najprej smo določili znotraj dnevno ponovljivost, in sicer tako da smo primerjali odzive znotraj enega dneva, nato pa še med dnevno ponovljivost, to pa tako, da smo postopek ponavljali tri dni zapored in nato primerjali stopnjo ujemanja med temi tremi dnevi. Določili smo tudi ponovljivost injiciranja, tako da smo vse tri vzorce z različnimi koncentracijami injicirali petkrat zapored in izračunali relativno standardno deviacijo (RSD). Za mejo sprejemljivosti pri znotraj in med dnevni ponovljivosti smo postavili kriterij RSD < 5 %, pri ponovljivosti injiciranja pa RSD < 2 %.

3.3.1.4 Točnost

Točnost analizne metode je pokazatelj ujemanja dobljenih rezultatov z dejansko (deklarirano) vrednostjo (54). Za vrednotenje točnosti smo uporabili vzorce pripravljene na enak način kot pri vrednotenju ponovljivosti. Njihove odzive smo vstavili v enačbo umeritvene premice in tako izračunali koncentracijo. To izračunano koncentracijo smo primerjali z deklarirano oz. dejansko koncentracijo vzorca. Točnost je razmerje med tema dvema koncentracijama (Enačba 2)

$$\text{točnost [\%]} = (C_i / C_d) \times 100 \quad (\text{Enačba 2})$$

C_d– dejanska (deklarirana) koncentracija

C_i– izračunana koncentracija

Točnost smo preverjali na treh koncentracijskih nivojih, z istimi vzorci kot pri ponovljivosti. Najprej smo izračunali točnost znotraj enega dneva, pri čemer smo računali s podatki iz tretjega dneva validacije. Nato pa smo določili še med dnevno točnost, to pa tako, da smo izračunali točnost za vsak dan validacije posebej, nato pa smo izbrali najslabšo točnost, ki nam je predstavljala vrednost med dnevne točnosti. Pravilnost

rezultatov smo podali kot interval med najnižjo in najvišjo vrednostjo točnosti. Točnost mora biti v območju $100 \pm 5 \%$.

3.3.1.5 Stabilnost vzorcev

Stabilnost vzorcev v avtomatskem vzorčevalniku smo vrednotili ob času 0, nato pa še po 8, 10 in 12 urah. Merili smo jo pri treh različnih vzorcih v enakih koncentracijah kot pri ponovljivosti in točnosti, tako da smo zajeli celotno koncentracijsko območje (2 %, 45 %, 90 %). Rezultate stabilnosti v posamezni časovni točki smo podali kot odstotke glede na začetne koncentracije ASA in SA v vzorcu. Določili smo, da upad koncentracije ASA in SA ne sme biti večji od 3 %.

3.3.2 METODA ZA DOLOČANJE CELOKUPNE ASA

Raztopini za merjenje koncentracije ASA z uporabo RF smo pripravili tako, da smo približno natančno natehtali 4,00 mg ASA, jo kvantitativno prenesi v 25 mL bučko, raztopili v 0,5 mL metanola in z MiliQ vodo dopolnili do oznake. V drugo bučko pa smo kvantitativno prenesli natančno 3,05 mg SA, jo raztopili v 0,5 mL metanola in z MiliQ vodo dopolnili do 25 mL. Nato smo obe raztopini 5 krat redčili s topilom (0,1 % H_3PO_4 : ACN = 1 : 1), da smo dobili osnovni raztopini s koncentracijo 0,18 mmol/L in pripravili 13 različnih kombinacij, ki so vsebovale različne volumne osnovne raztopine ASA in osnovne raztopine SA kot je razvidno v Preglednici IV.

Preglednica IV: Kombinacije osnovnih raztopin ASA in SA s koncentracijo obeh 0,18 mmol/L.

Kombinacija	Odstotek ASA [%]	V _{ASA} [μl]	V _{SA} [μl]
1	100,0	1000	0
2	99,0	990	10
3	97,5	975	25
4	95,0	950	50
5	90,0	900	100
6	85,0	850	150
7	80,0	800	200
8	75,0	750	250
9	70,0	700	300
10	60,0	600	400
11	50,0	500	500
12	40,0	400	600
13	30,0	300	700

Tako pripravljenim vzorcem smo pomerili odzive z metodo HPLC. To smo ponavljali tri dni zapored. Odzive smo zbrali in računsko obdelali v programu Excel ter izračunali RF in RSD rezultatov pridobljenih z novo metodo. Za ustreznost metode smo postavili mejo RSD < 2%.

3.3.2.1 Določevanje RF pri različnih valovnih dolžinah

RF smo določali pri treh različnih valovnih dolžinah: 210, 228 in 276 nm. To smo storili tako, da smo naklone umeritvenih krivulj (k) utežili s koncentracijo pripravljene vzorca (c), nato pa izračunali RF za vsak dan posebej po naslednji Enačbi 3:

$$RF = \frac{k_{ASA} \cdot c_{SA}}{k_{SA} \cdot c_{ASA}} \quad (\text{Enačba 3})$$

Za vsako valovno dolžino smo pripravili raztopini za merjenje koncentracije ASA z uporabo RF in pomerili odzive za 13 različnih kombinacij (Preglednica IV), ki so vsebovale različne odstotke raztopine ASA in raztopine SA. Za vsako valovno dolžino smo izvedli dve ponovitvi. Rezultate smo obdelali v programu Excel, izračunali RF po Enačbi 3 in s pomočjo izračunanega RF odziv SA pretvorili v odziv ASA, ju nato sešteli in

dobljeno vrednost primerjali z deklarirano vsebnostjo vzorca. Preverjali smo ujemanje povprečja rezultatov z novo metodo in deklarirano vsebnost ter RSD med rezultati pridobljenimi z novo metodo.

3.4 STABILNOST STANDARDA ASA

3.4.1 STABILNOST STANDARDA ASA V RAZLIČNIH MEDIJIH

Za proučevanje stabilnosti standarda ASA v različnih medijih, smo pripravili raztopino standarda, tako da smo približno natančno natehtali 4,00 mg ASA, jo kvantitativno prenesli v 25 mL bučko, jo raztopili v 0,5 mL metanola in z MiliQ vodo dopolnili do 25 mL. Tako pripravljeno raztopino smo z vodo redčili 5-krat in jo v razmerju 1 : 1 nato mešali s sedmimi različnimi topili. Za topila smo uporabili:

- 0,1 % H_3PO_4 : ACN= 1 : 1
- 0,1 % H_3PO_4 : ACN= 1 : 3
- 0,1 % H_3PO_4
- 0,1 M HCl
- Acetatni pufer umerjen na pH 4,5
- Fosfatni pufer umerjen na pH 6,8
- Vodo

0,1 M HCl smo pripravili tako, da smo 100 mL 1 M HCl kvantitativno prenesli v 1 L bučko ter dopolnili z destilirano vodo do oznake in dobro pomešali.

Acetatni pufer umerjen na pH 4,5 smo pripravili tako, da smo 2,86 mL 100 % očetne kisline kvantitativno prenesli v čašo in dodali 800 mL destilirane vode ter mešali na magnetnem mešalu. Nato smo z uporabo 1 M NaOH po kapljicah uravnali pH pufru na vrednost 4,5. Nato smo pufer prelili v 1 L bučko in z destilirano vodo dopolnili do oznake ter dobro premešali. Koncentracija tako pripravljene raztopine je bila 50 mmol/L.

Fosfatni pufer umerjen na pH 6,8 smo pripravili tako, da smo natehtali 6,80 g KH_2PO_4 , ga kvantitativno prenesli v čašo in dodali 800 mL destilirane vode ter mešali na magnetnem mešalu. Nato smo z uporabo 1 M NaOH po kapljicah uravnali pH pufru na vrednost 6,8.

Nato smo pufer prelili v 1 L bučko in z destilirano vodo dopolnili do oznake ter dobro premešali. Koncentracija tako pripravljene raztopine je bila 50 mmol/L.

Tako pripravljenim sedmim različnim vzorcem smo pomerili odzive z metodo HPLC do časa 36 h v 30 min časovnih intervalih pri temperaturi 4 °C, nato pa primerjali stabilnost posameznih vzorcev, saj so le-ti vsebovali različne kombinacije ASA in topil. Za vsak vzorec smo narisali tudi graf, da smo tudi vizualno opazovali kakšna je stabilnost standarda ASA v različnih medijih.

3.4.2 STABILNOST STANDARDA ASA PRI RAZLIČNIH TEMPERATURAH

Raztopino za spremljanje stabilnosti pri različnih temperaturah smo pripravili tako, da smo približno natančno natehtali 4,00 mg ASA, jo kvantitativno prenesli v 25 mL bučko, jo raztopili v 0,5 mL metanola in z MiliQ vodo dopolnili do oznake. Nato smo raztopino v razmerju 1 : 1 mešali s tremi različnimi topili:

- 0,1 M HCl
- acetatnim pufrom umerjenim na pH 4,5
- fosfatnim pufrom umerjenim na pH 6,8

Tako smo dobili tri različne vzorce, katerih stabilnost smo spremljali pri temperaturi 4 °C, 15 °C, 25 °C in 37 °C. Pri 4 °C, 15 °C in 25 °C smo opravili dve paralelki, pri 37 °C pa smo opravili tri paralelke. V različnih časovnih intervalih smo vzorce analizirali, končni čas analize pa je bil med 405 in 705 min. Za vsaki temperaturni pogoj smo narisali graf stabilnosti, ki je prikazoval povprečni odstotek koncentracije ASA v vzorcu v treh različnih medijih v odvisnosti od časa.

3.4.3 STABILNOST STANDARDA ASA PRI RAZLIČNIH pH VREDNOSTIH

Raztopino za spremljanje stabilnosti ASA pri različnih pH vrednostih smo pripravili tako, da smo približno natančno natehtali 4,00 mg ASA, jo kvantitativno prenesli v 25 mL bučko, jo raztopili v 0,5 mL metanola in z MiliQ vodo dopolnili do oznake. Nato smo tako pripravljeno raztopino mešali s pufri različnih pH vrednosti v razmerju 1 : 1. Stabilnost ASA pri različnih pH vrednostih smo proučevali pri sedmih različnih pH-jih: 2, 3, 4, 6, 8,

10 in 12, ki smo jim pomerili odzive. Vzorce smo izpostavili 25 °C in posamezni vzorec analizirali vsakih 30 min do 630 min. Iz pridobljenih rezultatov smo narisali graf hidrolize ASA v odvisnosti od časa za vse našete pH vrednosti, izračunali pa smo tudi konstante hitrosti hidrolize za 1. red reakcije, na podlagi katerih smo izdelali še pH profil ASA pri 25 °C.

3.4.4 STABILNOST STANDARDA ASA PRI RAZLIČNIH KONCENTRACIJAH VZORCA

Osnovno raztopino smo pripravili tako, da smo približno natančno natehtali 4,00 mg ASA, jo kvantitativno prenesli v 25 mL bučko, jo raztopili v 0,5 mL metanola in s fosfatnim pufrom umerjenim na pH 6,8 dopolnili do 25 mL. Osnovno raztopino s koncentracijo 0,89 mmol/L smo redčili 10 krat in 100 krat s fosfatnim pufrom umerjenim na pH 6,8, tako da smo dobili tri vzorce z različnimi koncentracijami ASA. Vzorce smo pri 25 °C analizirali vsakih 15 min do 120 min. Odzive smo prikazali grafično in opazovali vpliv koncentracije vzorca na stabilnost ASA.

3.5 APLIKACIJA METODE ZA DOLOČANJE CELOKUPNE ASA NA PODROČJU STABILNOSTI

Za aplikacijo naše nove metode smo si najprej izbrali vzorce iz testa sproščanja. Test sproščanja smo izvedli na aparaturi za testiranje sproščanja Vankel VK 7000. Sproščanje smo izvajali po USP 2 metodi. Sproščanje smo izvajali na dveh realnih vzorcih, Aspirin protect, 100 mg in Aspirin, 500 mg, za vsakega smo izvedli eno ponovitev. Pogoji sproščanja so bili:

- Število obratov: 100/min
- Temperatura: 37 °C
- Mediji: 0,1 M HCl, acetatni pufer umerjen na pH 4,5, fosfatni pufer umerjen na pH 6,8
- Volumen: 1 L

Vzorci smo jemali v časovnih intervalih 30, 45, 60, 90, 120 in 180 min jih filtrirali s pomočjo vial z vgrajenimi filtri ter jih takoj po odvzemu pomerili z metodo HPLC pri čemer smo kot deklarirano 100 % vsebnost ASA določili 500 mg/L za Aspirin 500 mg in 100 mg/L za Aspirin protect.

Za proučevanje stabilnosti ASA v realnih pripravkih smo si izbrali dve zdravili. Aspirin protect, ki vsebuje 100 mg ASA in je v obliki gastrorezistentnih tablet in je v lekarni na voljo z receptom ter Aspirin migran, ki vsebuje 500 mg ASA in je v obliki šumečih tablet, v lekarni pa je na voljo brez recepta.

Raztopino zdravila Aspirin migran smo pripravili po navodilih na embalaži, pri čemer smo za kozarec vode smatrali 200 mL vodovodne vode. Tako smo eno šumečo tableto raztopili v čaši z 200 mL vodovodne vode, 10 krat redčili z vodovodno vodo, napolnili viala in analizirali z metodo HPLC v časovnih točkah 0, 10, 30 in 90 min.

Raztopino zdravila Aspirin protect smo pripravili v skladu s farmakopejskim predpisom za določanje ASA v pripravkih, tako da smo v terilnici zdrobili 10 tablet, nato pa v vsako izmed treh 25 mL bučk kvantitativno prenesli za maso ene tablete prahu, tako da je masa prahu ustrezala masi 100 mg ASA. Do oznake smo dopolnili z metanolom. Vsebinsko bučk smo dobro premešali, za 10 min postavili v ultrazvočno kadičko, nato pa prefiltrirali s Chromafil filtri z velikostjo por 0,45 μm , 20 krat redčili z metanolom, napolnili viala in analizirali z metodo HPLC v časovnih točkah 0 in 24 h.

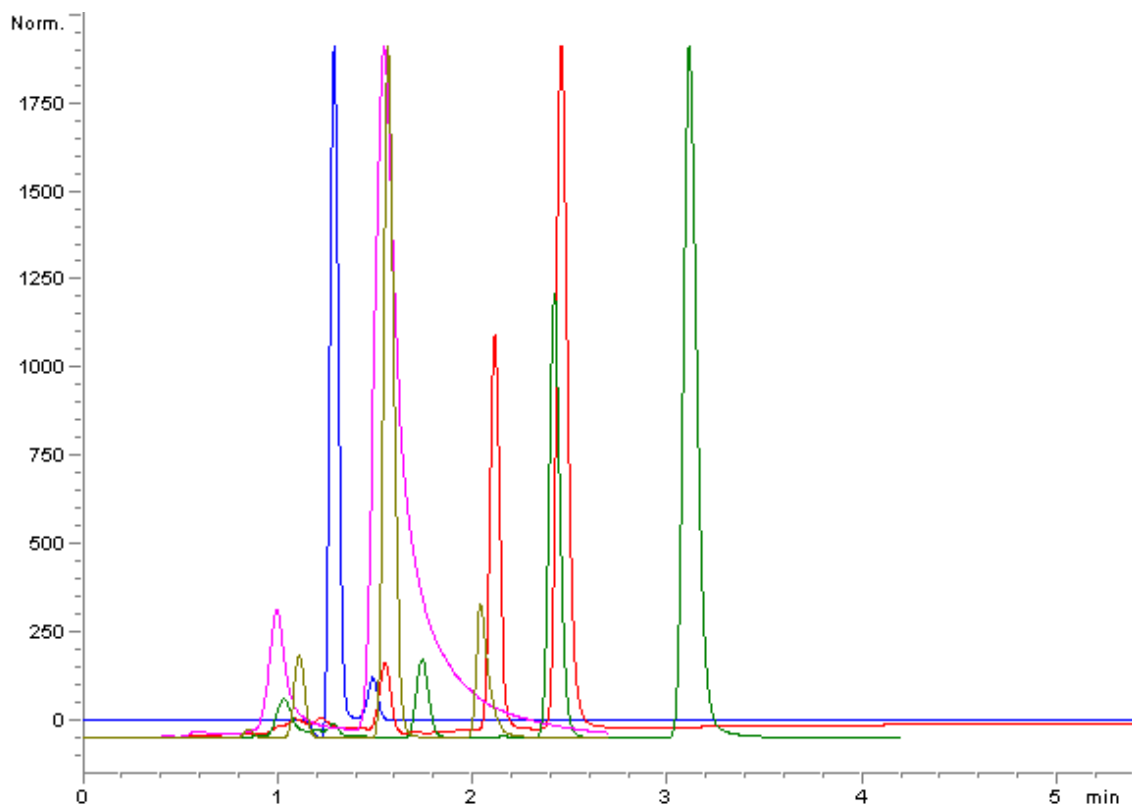
3.6 OBDELAVA PODATKOV

Rezultate pridobljene z metodo HPLC in programsko opremo ChemStation smo prenesli v računalniški program Excel, ki je del programskega paketa Microsoft Office 2007. V njem smo odzive predstavili grafično, izračunali enačbe premic, determinacijske koeficiente, standardne odklone, povprečja meritev, hitrostne konstante.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 RAZVOJ ANALIZNE METODE

ASA je zaradi hitre hidrolize v vodnih raztopinah problematična za vrednotenje v smislu natančnosti in točnosti dobljenih rezultatov. Zato je bil naš namen razviti in vpeljati novo analizno metodo, ki bi določala celokupno vsebnost ASA in sicer na podlagi vsebnosti ASA in njenega edinega razpadnega produkta SA, s čimer bi se tako izognili problemu nestabilnosti ASA. V prvi stopnji eksperimentnega dela smo razvili metodo za sočasno določanje ASA in SA, ki je predstavljala osnovo za novo analizno metodo. Za sočasno določanje ASA in SA obstajajo različne analizne metode, med katerimi se najpogosteje uporabljajo HPLC metode. Pri odločitvi, katero analizno metodo izbrati za določanje ASA in SA, so nam bili v pomoč literaturni viri, ki HPLC metodo uvrščajo v sam vrh izbora v analitiki ASA (35, 44-50). Izbrali smo reverznofazno HPLC, prav tako na podlagi teoretičnega znanja pridobljenega v strokovni literaturi. Pri razvoju metode smo se najprej osredotočili na izbor kolone, pri čemer smo preizkusili pet različnih reverznofaznih kolon: Gemini-NX 3u C18, Kinetex 5u, Luna 3u NH₂, Zorbax Eclipse XDB-C8 in Gemini C18. Z vsako smo posneli kromatogram standarda ASA in SA (Slika 4) pri konstantnih kromatografskih pogojih po metodah 2, 3, 5, 6 in 8 (Preglednica III).

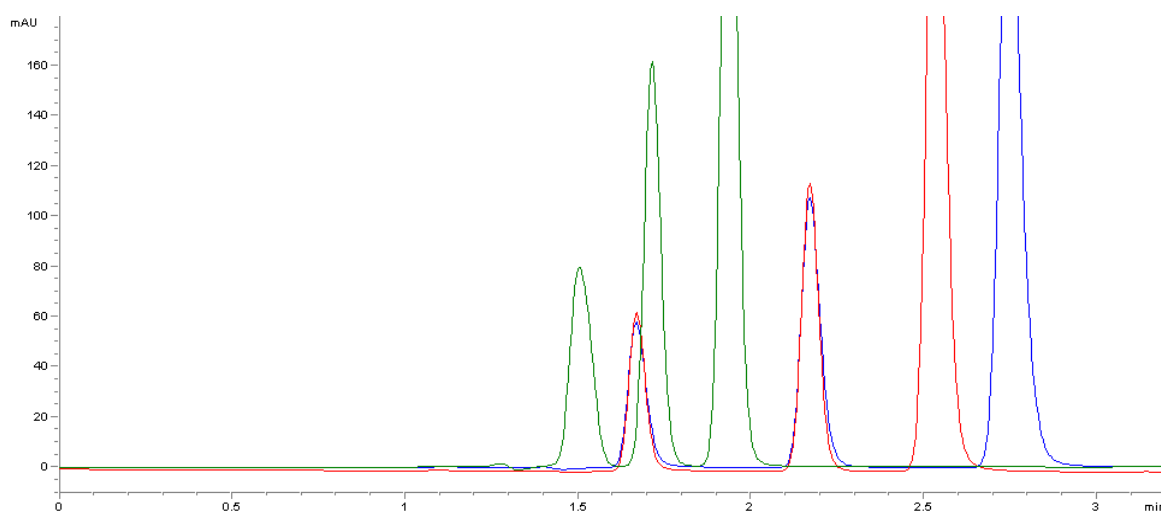


Slika 4: Prekriti kromatogrami pri stalni mobilni fazi (0,1 % H_3PO_4 : ACN = 50 : 50) in z različnimi kolonami: Kinetex 5u (modra), Zorbax Eclipse XDB-C8 (rdeča), Gemini C18 (zelena), Luna 3u NH_2 (roza) in Gemini-NX 3u C18 (olivno zelena).

Trije kromatografski vrhovi v posameznih kromatogramih predstavljajo fronto topila, ASA in SA.

Na podlagi kromatogramov smo izbrali najprimernejšo kolono, pri čemer smo opazovali ločljivost, simetričnost kromatografskih vrhov in retencijski čas. Za najbolj ustrezno se je izkazala kolona Gemini C18, saj je imela najboljšo ločbo med posameznimi kromatografskimi vrhovi in ustrezno simetrijo kromatografskih vrhov. Po ustreznosti ji sledi Gemini-NX 3u C18, ki je tudi primerna, a ima nekoliko slabšo ločbo kot Gemini C18. Ostale tri kolone pa smo opredelili kot neustrezne za našo metodo, saj so bili kromatografski vrhovi pri koloni Luna 3u NH_2 preveč nesimetrični pri kolonah Zorbax Eclipse XDB-C8 in Kinetex 5u pa ni bilo ustrezne ločbe.

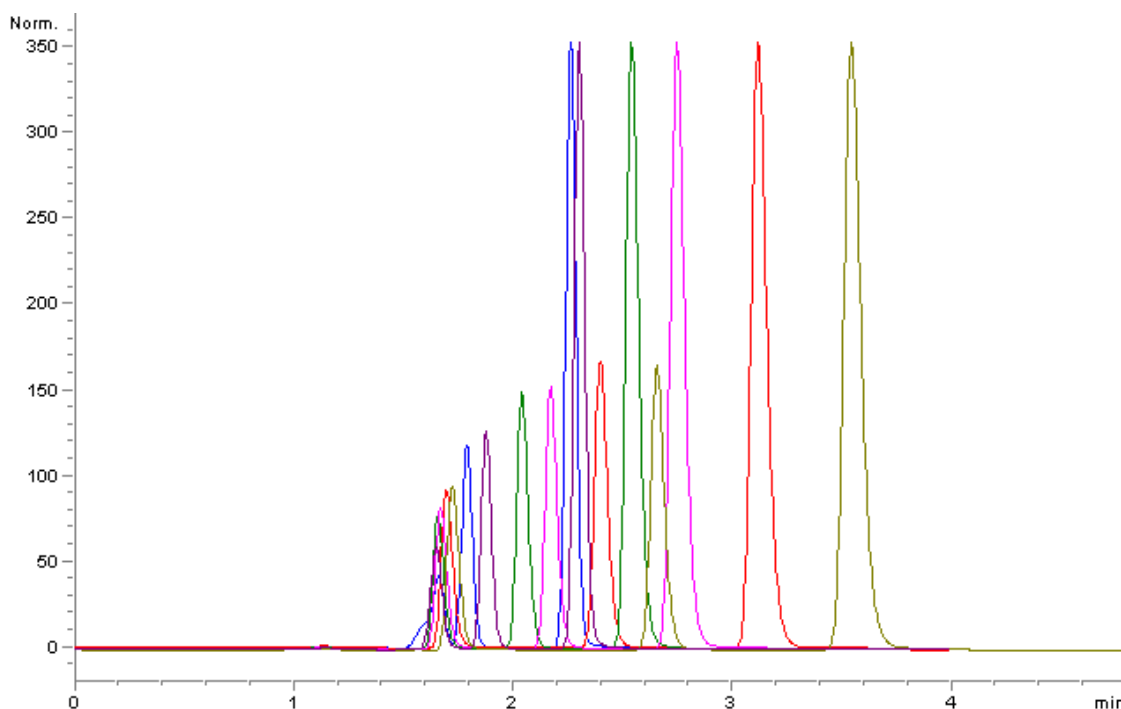
Po izbiri kolone smo optimizirali vodno mobilno fazo. Za organsko mobilno fazo smo izbrali acetonitril, ki se običajno uporablja pri tovrstnih analizah, za vodno mobilno fazo pa smo izbirali med 0,1 % H_3PO_4 , fosfatnim pufrom s pH 3 in pH 6,8. Pri primerjavi smo uporabili konstantno razmerje med organsko in vodno mobilno fazo 50 : 50 (metode 8-10, Preglednica III). Posneli smo tri kromatograme standarda ASA in SA ter jih primerjali med sabo. Za najprimernejšo vodno mobilno fazo se je izkazala 0,1 % H_3PO_4 , saj je njen kromatogram izkazoval najboljšo ločbo. Kot primerna bi lahko bil tudi fosfatni pufer s pH 3, pri pufru s pH 6,8pa so bili kromatografski vrhovi preveč skupaj, tudi retencija na koloni je v tem primeru nezadostna (Slika 5).



Slika 5: Prekriti kromatogrami posneti s kolono Gemini C 18 in stalnim razmerjem MF (vodna faza : organska faza = 50 : 50) ter z različnimi vodnimi fazami: 0,1 % H_3PO_4 (modra), fosfatni pufer umerjen na pH 3 (rdeča) in fosfatni pufer umerjen na pH 6,8 (zelena).

Po izbrani vodni mobilni fazi smo želeli optimizirati še razmerje med organsko in vodno mobilno fazo za doseganje najboljše kromatografske ločbe. Preverili smo šest razmerij med 0,1 % H_3PO_4 in ACN: 20 : 80, 30 : 70, 40 : 60, 45 : 55, 50 : 50 in 55 : 45 (metode 7, 8, 11-14, Preglednica III). Za našo metodo se je kot najustreznejše izkazalo razmerje H_3PO_4 : ACN = 45 : 55, saj so bili pri tem razmerju med mobilnima fazama kromatografski vrhovi ustrezno ločeni, obenem pa je bil primeren tudi čas analize, saj smo želeli imeti čim

krajši čas analize pri katerem bi bila ločba še ustrezna (Slika 6). Pri razmerjih 20 : 80, 30 : 70 in 40 : 60 je bila slaba ločba, pri razmerjih 50 : 50 in 55 : 45 pa je bil daljši čas analize, kar je manj sprejemljivo, saj tako pri analiziranju porabimo več časa in pa tudi mobilne faze, kar vpliva na ceno analize.



Slika 6: Prekriti kromatogrami posneti s kolono Gemini C 18 in MF 0,1 % H_3PO_4 : ACN s spreminjajočim razmerjem med vodno in organsko fazo (0,1 % H_3PO_4 : ACN): 20 : 80 (modra), 30 : 70 (vijolična), 40 : 60 (zelena), 45 : 55(roza), 50 : 50 (rdeča) in 55 : 45 (olivno zelena).

Primernost novo razvite analizne metode za sočasno določanje ASA in SA smo v nadaljevanju vrednotili z validacijo.

4.2 VREDNOTENJE ANALIZNE METODE

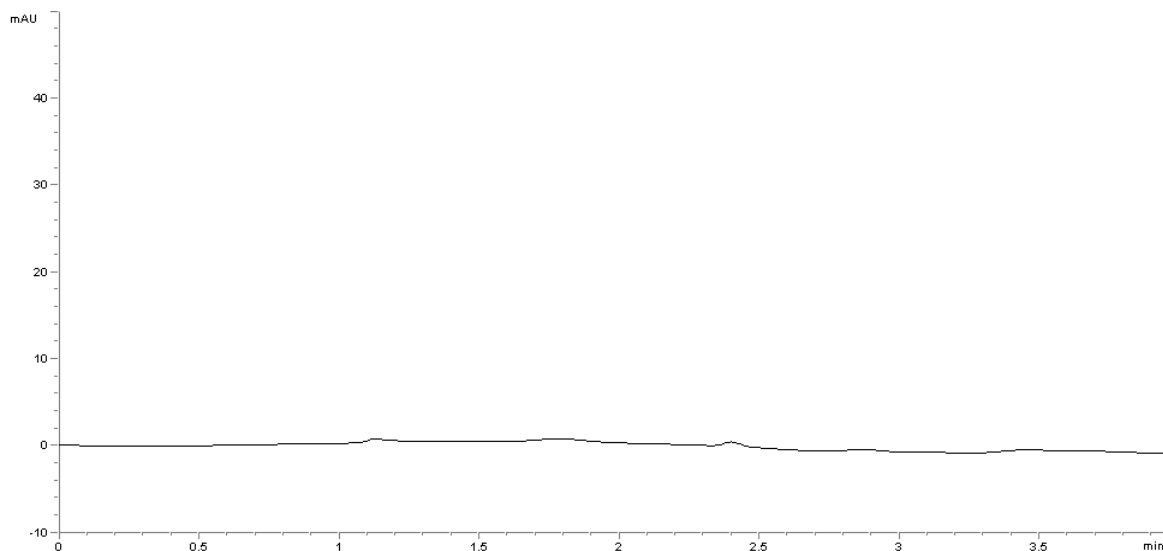
4.2.1 METODA ZA SOČASNO DOLOČANJE KONCENTRACIJE ASA IN SA

Vrednotenje analizne metode smo izvajali v skladu z ICH smernicami, ki predpisujejo, da je potrebno metodo pred njeno uporabo validirati. Validacija je dokumentiran postopek preizkušanja in potrjevanja, da katerikoli material, proces, postopek, aktivnost, sistem,

oprema ali mehanizem, uporabljen pri razvoju, proizvodnji, kontroli in distribuciji, lahko dosega, dosega in bo dosegal predpisane rezultate (55). Validacijo smo izvajali tri dni zapored, opredelili pa smo naslednje parametre: selektivnost, linearnost, ponovljivost, točnost in stabilnost vzorcev.

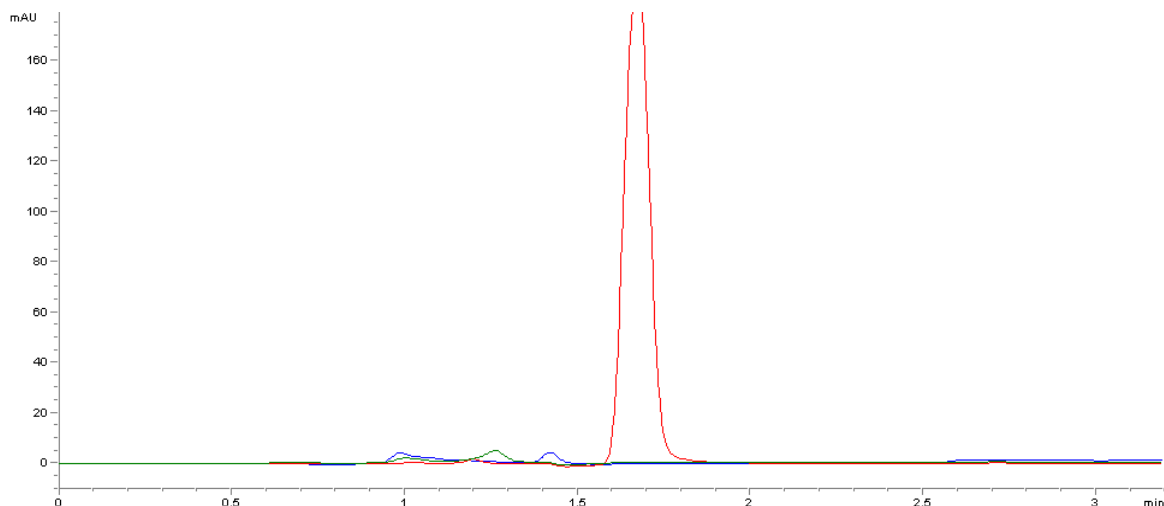
4.2.1.1 Selektivnost

Selektivnost smo dokazovali s posnetimi kromatogrami pri katerih se kromatografski vrhovi potencialnih komponent v vzorcih ne smejo prekrivati s kromatografskima vrhoma ASA oz. SA in ne sme prihajati do interferenc. Slike od 7 do 11 prikazujejo kromatograme izbrane mobilne faze (0,1 % H_3PO_4 : ACN = 45 : 55), 0,1 M HCl, acetatnega pufra umerjenega na pH 4,5, fosfatnega pufra umerjenega na pH 6,8, standarda ASA in SA, pripravka z ASA in vzorca odvzetega pri sproščanju pripravka z ASA.



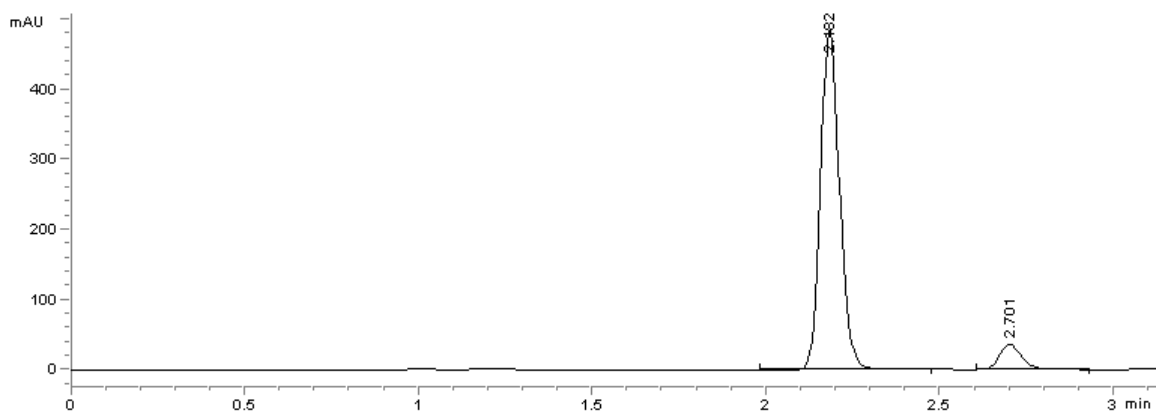
Slika 7: Kromatogram mobilne faze (0,1 % H_3PO_4 : ACN = 45 : 55).

Na Sliki 7, ki je kromatogram mobilne faze vidimo, da ni kromatografskih vrhov ampak ravna bazna linija, kar pomeni, da med mobilno fazo in našima analitoma ASA in SA ne prihaja do interferenc.



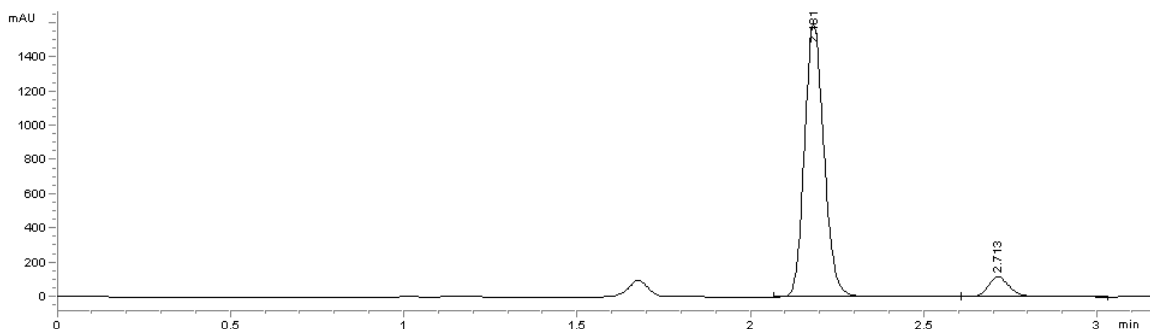
Slika 8: Kromatogrami najpogostejših medijev za raztapljanje: 0,1 M HCl (modra), acetatnega pufra pH 4,5 (rdeča) in fosfatnega pufra pH 6,8 (zelena).

Slika 8 prikazuje kromatograme najpogostejših medijev za raztapljanje: 0,1 M HCl, acetatnega pufra pH 4,5 in fosfatnega pufra pH 6,8. Pri 0,1 M HCl in fosfatnem pufru umerjenem na pH 6,8 opazimo nizke kromatografske vrhove z retencijskimi časi med 1 in 1,5 min, pri acetatnem pufru pH 4,5 pa opazimo višji vrh z retencijskim časom okoli 1,7 min, a so vsi zadovoljivo ločeni naših dveh analitov, ASA (2,18 min) in SA (2,70 min), tako da je ločba in s tem selektivnost ustrezna.

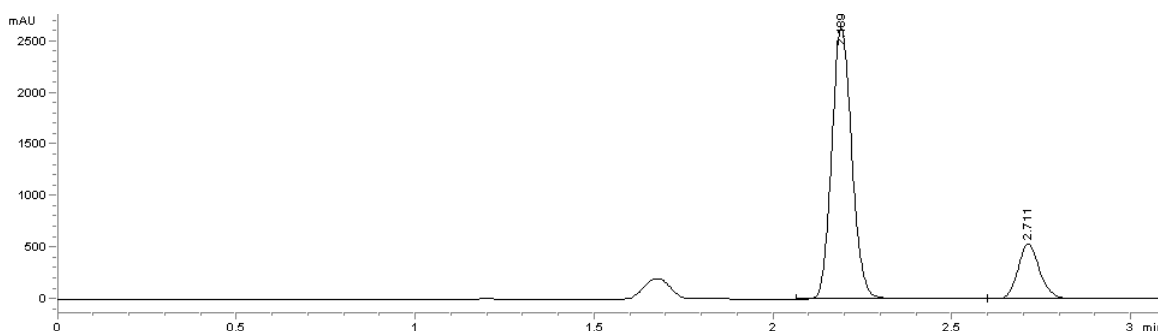


Slika 9: Kromatogram standarda ASA posnetega pri koncentraciji 0,45 mol/L. Kromatografski vrh pri 2,182 min pripada ASA, pri 2,701 min pa SA.

Slika 9 prikazuje kromatogram standarda ASA. S tem kromatogramom lahko potrdimo, da se naša analita, ASA in SA, ustrezno ločita in da med njunima kromatografskima vrhovoma ne prihaja do prekrivanja.



Slika 10: Kromatogram vodne raztopine pripravka z ASA (Aspirin migran) posnetega 30 min po pripravi vodne raztopine. Kromatografski vrh pri 2,181 min pripada ASA, pri 2,713 min pa SA.



Slika 11: Kromatogram raztopine pripravka Aspirin protect odvzetega med testom raztapljanja iz medija acetatni pufer pH 4,5 po 90 min. Kromatografski vrh pri 2,180 min pripada ASA, pri 2,711 min pa SA.

Slika 10 in Slika 11 sta kromatograma vodnih raztopin realnih vzorcev, zdravil Aspirin migran in Aspirin protect, kjer tudi lahko potrdimo, da je selektivnost ustrezna, saj se kromatografski vrhovi lepo ločijo med sabo in ni vidnih nobenih interferenc iz pripravkov.

4.2.1.2 Linearnost

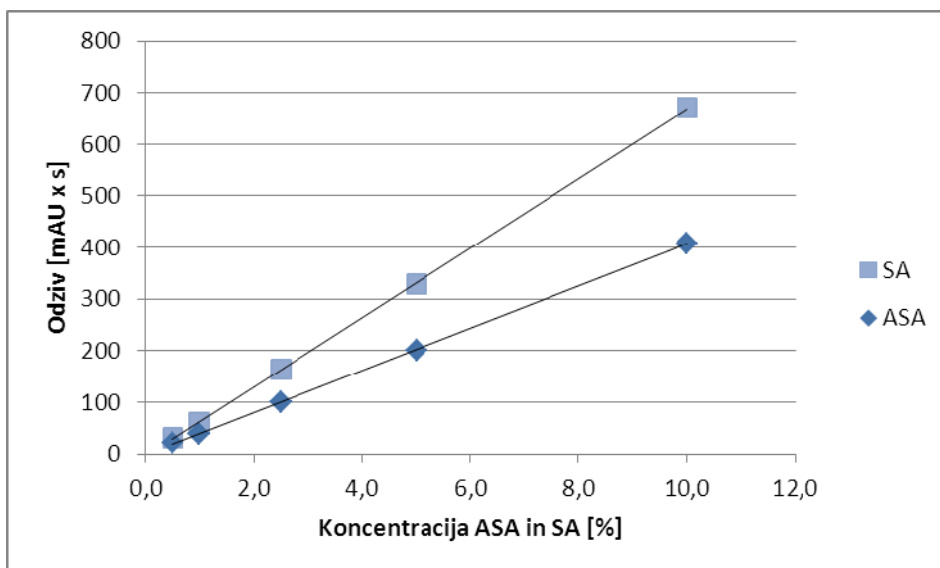
Linearnost smo vrednotili tako, da smo preko odzivov s pomočjo linearne regresije določili umeritvene premice in determinacijske koeficiente za ASA in SA. Ker smo linearnost

določali tri dni zapored, smo naredili tri umeritvene premice in izračunali tri determinacijske koeficiente za vsako spojino posebej. Zaradi slabše točnosti v nizkem koncentracijskem območju, smo se odločili, da razdelimo delovno območje metode na dva dela: nizko koncentracijsko območje od 0,5-10 % in visoko koncentracijsko območje od 10-100 %. Enačbe umeritvenih premic in determinacijske koeficiente za ASA in SA v nizkem in visokem koncentracijskem območju prikazuje Preglednica V. Ker so bili vsi determinacijski koeficienti nad določeno mejo $R^2 > 0,9990$, lahko potrdimo, da je naša metoda linearna v izbranem območju od 0,5 %-100 % za ASA in SA pri čemer 100 % predstavlja koncentracijo 0,89 mmol/L za ASA oziroma 0,44 mmol/L za SA.

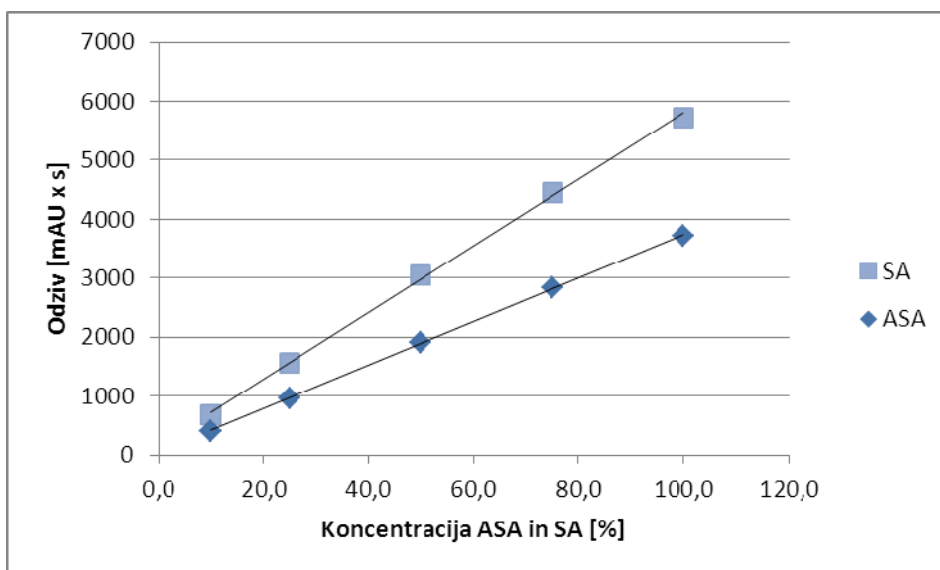
Preglednica V: Enačbe umeritvenih premic in determinacijski koeficienti za ASA in SA.

Dan	ASA		SA	
	Enačba premice	R^2	Enačba premice	R^2
Za nizko koncentracijsko območje				
1	$y = 38,6057x + 1,0460$	0,9998	$y = 64,9384x + 0,1237$	0,9999
2	$y = 38,0116x + 0,3414$	0,9999	$y = 61,6610x + 4,2003$	0,9995
3	$y = 40,8991x - 2,2467$	0,9999	$y = 67,3666x - 4,6719$	1,0000
Za visoko koncentracijsko območje				
1	$y = 37,0764x + 45,2687$	0,9997	$y = 57,6027x + 140,0326$	0,9990
2	$y = 36,3736x + 36,1149$	0,9998	$y = 55,9821x + 105,9369$	0,9996
3	$y = 36,8974x + 46,9908$	0,9997	$y = 56,5181x + 152,0688$	0,9990

Sliki 12 in 13 prikazujeta umeritveni premici za ASA in SA za nizko in visoko koncentracijsko območje za tretji dan validacije.



Slika 12: Umeritveni premici za ASA in SA za nizko koncentracijsko območje za tretji dan validacije.



Slika 13: Umeritveni premici za ASA in SA za visoko koncentracijsko območje za tretji dan validacije.

4.2.1.3 Ponovljivost

Ponovljivost smo dokazovali na treh nivojih, kontrolni vzorci pa so pokrivali celotno koncentracijsko območje, nizko (2 %), srednje (45 %) in visoko območje (90 %). Pokazali

smo znotraj dnevno ponovljivost, tako da smo izračunali RSD med posameznimi meritvami znotraj enega dneva. Vsi RSD so bili pod postavljeno mejo 5 %, najvišji RSD je znašal 1,69 % za ASA in 1,53 % za SA, tako da lahko potrdimo, da je naša metoda ponovljiva znotraj dneva. Ugotovili smo tudi med dnevno ponovljivost, saj so vsi izračunani parametri pod postavljeno mejo 5 %, najvišji RSD je znašal 2,59 % za ASA in 3,78 % za SA. Podatki o znotraj dnevni in med dnevni ponovljivosti so prikazani v Preglednici VI.

Preglednica VI: Znotraj dnevna in med dnevna ponovljivost za ASA in SA.

	ASA	SA
Koncentracija [%]	RSD [%]	RSD [%]
	Znotraj dnevna ponovljivost	
2	1,69	1,53
45	0,08	0,09
90	0,19	0,13
	Med dnevna ponovljivost	
2	2,59	3,78
45	1,05	1,57
90	0,35	1,00

V okviru validacije smo preverili tudi ponovljivost delovanja instrumenta, kjer smo isti vzorec injicirali 5 krat zapored. Ker so tudi pri vrednotenju tega parametra RSD pod predpisano mejo (< 2 %), je ponovljivost injiciranja torej ustrezna (Preglednica VII).

Preglednica VII: Ponovljivost injiciranja za ASA in SA (n = 5).

	ASA	SA
Koncentracija [%]	RSD [%]	RSD [%]
2	0,54	0,46
45	0,07	0,05
90	0,32	0,14

4.2.1.4 Točnost

Točnost smo določali znotraj dneva in med dnevi na istih kontrolnih vzorcih kot pri vrednotenju ponovljivosti, s čimer smo zaobjeli vrednotenje tega parametra čez celotno

koncentracijsko območje. Za znotraj dnevno točnost smo uporabili podatke iz tretjega dneva validacije, pri med dnevni točnosti pa smo izbrali za vsako koncentracijsko območje meritev iz tistega dneva validacije, ki je najbolj odstopala od dejanske vrednosti. V obeh primerih je točnost znotraj predpisanega intervala [95-105 %]. Rezultati znotraj dnevne in med dnevne točnosti so podani v Preglednici VIII.

Preglednica VIII: Znotraj dnevna in med dnevna točnost za ASA in SA.

Dejanska koncentracija [%]	ASA		SA	
	Izračunana koncentracija [%]	Točnost [%]	Izračunana koncentracija [%]	Točnost [%]
Znotraj dnevna točnost				
2,00	1,96	98,08	1,94	96,79
45,00	45,28	100,22	46,17	102,59
90,00	90,20	100,62	90,06	100,07
Med dnevna točnost				
2,00	2,08	104,00	2,08	103,86
45,00	45,68	101,52	46,61	103,58
90,00	88,85	98,72	87,78	97,49

4.2.1.5 Stabilnost vzorcev

Stabilnost vzorcev smo preverjali na treh koncentracijskih nivojih, enako kot pri ponovljivosti in točnosti ob času 0, 8, 10 in 12 ur in ugotovili, da je v vseh primerih razpad učinkovine tudi po 12 urah manjši od 3 %, kar ustreza postavljenim zahtevam. Vsebnosti ASA po 12 urah so bile 98,52 % za kontrolni vzorec iz nizkega, 99,42 % za vzorec iz srednjega in 99,13 % za kontrolni vzorec iz visokega koncentracijskega območja. Vsebnosti SA po 12 urah po enakem razporedu vzorcev so bile 97,65 %, 99,47 % in 99,70 %. Po 8 urah odstopajo rezultati manj kot 1,5 %, v primeru ASA celo manj kot 0,4 % kar kaže na to, da je ASA stabilizirana v izbranem topilu in ne predstavlja analitskega problema. Vsebnosti učinkovine izražene v odstotkih glede na začetno vrednost ob različnih časih so v Preglednici IX.

Preglednica IX: Stabilnost učinkovine izražene v odstotkih glede na začetno vrednost ob različnih časih.

Čas [h]	ASA			SA		
	2%	45%	90%	2%	45%	90%
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
8	99,80	99,84	99,61	98,60	99,71	99,64
10	98,83	99,83	99,61	98,05	99,63	99,90
12	98,52	99,42	99,13	97,65	99,47	99,70

Ker so bili vsi validirani parametri znotraj vnaprej določenih kriterijev, lahko potrdimo ustreznost validirane metode za sočasno določanje ASA in SA.

4.2.2 METODA ZA DOLOČANJE CELOKUPNE ASA

Ker je ASA izredno nestabilna v vodnih raztopinah, analiza pa po navadi poteka ravno v tekoči obliki, smo želeli razviti novo analizo metodo, pri kateri hidroliza ne bi predstavljala ovire pri vrednotenju ASA v vzorcu. Tako smo vpeljali novo metodo, ki določa celokupno koncentracijo ASA, preko upoštevanja RF njenega edinega razpadnega produkta SA. Najprej smo izračunali RF po Enačbi 3, nato pa smo preverjali ustreznost nove metode najprej na simuliranih vzorcih, ki so vsebovali znano koncentracijo ASA in SA, nato pa še na vzorcih, ki smo jih analizirali za namen proučevanja stabilnosti.

4.2.2.1 Določevanje RF pri različnih valovnih dolžinah

Predpogoj za uporabnost metode predstavlja RF, ki smo ga izračunali pri različnih valovnih dolžinah. Izbrali smo tri valovne dolžine: 210 nm, 228 nm in 276 nm, saj le-te predstavljajo absorpcijske maksimume UV spektra ASA in se v praksi običajno uporabljajo za detekcijo analitov. Osnovo za izračun RF predstavlja razmerje odzivov ASA in SA, izmerjenih pri enakih koncentracijah. Pri vsaki valovni dolžini smo določili povprečje RF na podlagi ene koncentracijske točke (Preglednica X) in pa RF na osnovi naklonov premic, ki pokriva celotno koncentracijsko območje (Preglednica XI). Rezultati za RF po obeh metodah so bili primerljivi. Vendar smo se za nadaljnje delo odločili, da uporabimo povprečno vrednost dobljenih RF na osnovi primerjav naklonov premic, ker na ta način pokrivamo celotno območje nastanka SA. RF za posamezno valovno dolžino

(0,301; 1,491 in 1,421) so se med sabo razlikovali, saj so specifični za vsako valovno dolžino, ker se namreč UV spektra ASA in SA razlikujeta.

Preglednica X: Povprečje RF določenih na podlagi ene koncentracijske točke.

Valovna dolžina [nm]	1. dan	2. dan
	RF	RF
210	0,290	0,300
228	1,442	1,497
276	1,341	1,420

Preglednica XI: RF določeni na podlagi naklonov premice.

Valovna dolžina [nm]	RF		Povprečje RF
	1. dan	2. dan	
210	0,297	0,305	0,301
228	1,469	1,512	1,491
276	1,402	1,440	1,421

Ustreznost alternativne metode določanja celokupne ASA smo preverjali z eksperimentom, kjer smo pripravili raztopine različnih koncentracij ASA in SA (Preglednica IV), tako da je deklarirana celokupna koncentracija ASA (vsota ASA in SA) vedno predstavlja 100%. S pomočjo predhodno izračunanega RF smo odziv SA v vzorcu pretvorili v odziv ASA. Nato smo odziv osnovne ASA in odziv ASA dobljene posredno preko nastalega SA sešteli ter na osnovi umeritvene premice določili vsebnost celokupne količine ASA v vzorcu. Deklarirana vsota vsebnosti ASA in SA je bila vedno 100 %, celokupna vsebnost ASA preračunana z RF pa je bila v vseh primerih blizu 100 %, RSD vrednosti preračunane z RF, ki predstavljajo razpršenost rezultatov pa so znašale od 0,35-0,78, kar dokazuje da je naša metoda ustrezna, saj daje točne in natančne rezultate. Izračuni celokupne vsebnosti ASA pri različnih valovnih dolžinah za 2. dan izvedbe poskusa so v Preglednicah od XII-XIV.

Preglednica XII: Deklarirana vsebnost ASA in SA, odzivi ASA in SA ter izračun celokupne vsebnosti ASA z uporabo RF pri valovno dolžini 210 nm za 2. dan izvedbe poskusa.

Vsebnost ASA	Vsebnost SA	Odziv ASA	Odziv SA	Odziv SA*RF	Odziv celokupne ASA	Celokupna vsebnost ASA*
100,0	0,0	790,31	0,00	0,00	790,31	100,0
99,0	1,0	790,13	25,10	7,66	797,79	100,9
97,5	2,5	777,61	67,90	20,73	798,34	101,0
95,0	5,0	758,16	130,01	39,69	797,86	101,0
90,0	10,0	715,83	271,21	82,80	798,62	101,1
85,0	15,0	676,20	401,78	122,66	798,86	101,1
80,0	20,0	637,81	525,12	160,31	798,12	101,0
75,0	25,0	600,42	640,02	195,39	795,81	100,7
70,0	30,0	561,84	771,65	235,58	797,42	100,9
60,0	40,0	482,01	1024,12	312,65	794,66	100,6
50,0	50,0	400,51	1273,13	388,67	789,18	99,9
40,0	60,0	318,04	1529,55	466,95	784,99	99,3
30,0	70,0	241,49	1761,41	537,73	779,23	98,6
					Povprečje:	100,5
					RSD:	0,78

*preračunano z RF

Preglednica XIII: Deklarirana vsebnost ASA in SA, odzivi ASA in SA ter izračun celokupne vsebnosti ASA z uporabo RF pri valovno dolžini 228 nm za 2. dan izvedbe poskusa.

Vsebnost ASA	Vsebnost SA	Odziv ASA	Odziv SA	Odziv SA*RF	Odziv celokupne ASA	Celokupna vsebnost ASA*
100,0	0,0	902,63	0,00	0,00	902,63	100,0
99,0	1,0	899,82	5,85	8,85	908,67	100,7
97,5	2,5	883,12	14,99	22,66	905,78	100,3
95,0	5,0	863,86	29,35	44,38	908,24	100,6
90,0	10,0	813,17	61,17	92,48	905,65	100,3
85,0	15,0	769,56	90,28	136,50	906,06	100,4
80,0	20,0	725,80	118,86	179,72	905,51	100,3
75,0	25,0	684,17	145,53	220,04	904,21	100,2
70,0	30,0	637,68	175,49	265,33	903,01	100,0
60,0	40,0	546,94	233,46	352,98	899,92	99,7
50,0	50,0	454,56	292,75	442,63	897,19	99,4
40,0	60,0	358,75	351,78	531,88	890,63	98,7
30,0	70,0	273,44	407,78	616,56	889,99	98,6
Povprečje:						99,9
RSD:						0,68

*preračunano z RF

Preglednica XIV: Deklarirana vsebnost ASA in SA, odzivi ASA in SA ter izračun celokupne vsebnosti ASA z uporabo RF pri valovno dolžini 276 nm za 2. dan izvedbe poskusa.

Vsebnost ASA	Vsebnost SA	Odziv ASA	Odziv SA	Odziv SA*RF	Odziv celokupne ASA	Celokupna vsebnost ASA*
100,0	0,0	123,73	0,00	0,00	123,73	100,0
99,0	1,0	123,59	0,00	0,00	123,59	99,9
97,5	2,5	121,22	2,20	3,17	124,39	100,5
95,0	5,0	118,29	4,26	6,13	124,42	100,6
90,0	10,0	111,71	8,87	12,77	124,48	100,6
85,0	15,0	105,36	13,16	18,96	124,31	100,5
80,0	20,0	99,27	17,05	24,56	123,82	100,1
75,0	25,0	93,77	20,91	30,12	123,89	100,1
70,0	30,0	87,40	25,17	36,24	123,64	99,9
60,0	40,0	74,93	33,57	48,34	123,27	99,6
50,0	50,0	62,22	42,02	60,52	122,74	99,2
40,0	60,0	49,38	50,69	73,00	122,38	98,9
30,0	70,0	37,44	58,44	84,16	121,60	98,3
Povprečje:						99,9
RSD:						0,70

*preračunano z RF

Po opravljenih izračunih celokupne vsebnosti ASA pri različnih valovnih dolžinah, smo primerjali povprečne vrednosti in RSD pri različnih valovnih dolžinah in ugotovili, da med valovnimi dolžinami ni bistvenih razlik, saj so odstopanja od deklariranih 100 % približno enaka (100,5, 99,9, 99,9), RSD vrednosti pa se tudi ne razlikujejo bistveno (0,78, 0,68, 0,70). Zato smo za nadaljnje poskuse izbrali valovno dolžino 210 nm in RF 0,301, ki je povprečje izračunanih RF pri tej valovni dolžini, saj je ta RF najnižji in posledično tudi najbolj občutljiv. Ker je v tem primeru razmerje med odzivom ASA in SA najmanjše, že majhen nastanek SA pomeni večji odziv na kromatogramu. Ugotovili smo, da so sicer vse tri valovne dolžine primerne in uporabne za vrednotenje celokupne ASA, a smo sami zaradi opisanih razlogov izbrali valovno dolžino 210 nm. Izračunani parametri točnosti in

ponovljivosti nove metode so bili boljši v primerjavi s parametri pri validaciji metode za sočasno določanje ASA in SA. To potrjuje primernost uporabe nove metode vrednotenja celokupne ASA.

Ko smo na primeru standardnih raztopin pokazali, da je naša metoda ustrezna in da daje točne in ponovljive rezultate, smo jo želeli preizkusiti še na vzorcih, ki smo jih testirali v stabilnostni študiji in so bili izpostavljeni dalj časa izbranim pogojem (705 min). V ta namen smo uporabili podatke o stabilnosti standarda ASA pri 37 °C in v treh različnih medijih: 0,1 M HCl, acetatnem pufru s pH 4,5 in fosfatnem pufru s pH 6,8. Čeprav je bilo po 705 min v vzorcih samo še 80,39 % (0,1 M HCl), 57,70 % (acetatni pufer pH 4,5) oz. 53,87 % ASA (fosfatni pufer pH 6,8), merjeno s klasično metodo HPLC, smo z novo metodo določili vsebnost, ki je le malo odstopala od 100 %, kar seveda predstavlja začetno vsebnost ASA. V Preglednicah od XV-XVII so podani rezultati celokupne vsebnosti ASA, pri čemer smo za RF uporabili vrednost 0,301 pri valovni dolžini 210 nm. S stabilnostnimi vzorci smo še enkrat potrdili ustreznost nove metode za določevanje celokupne ASA.

Preglednica XV: Vsebnost ASA merjena s klasično metodo HPLC in vsebnost ASA preračunana z novo metodo za vzorec v 0,1 M HCl.

Vsebnost ASA [%]	Odziv ASA	Odziv SA	Odziv SA*RF	Odziv celokupne ASA	Celokupna vsebnost ASA*
100,0	1878,2	0,0	0,0	1878,2	100,0
99,0	1859,2	77,1	23,2	1882,4	100,2
98,0	1840,4	146,7	44,2	1884,6	100,3
96,9	1819,6	217,6	65,5	1885,1	100,4
96,0	1802,8	288,6	86,9	1889,6	100,6
94,7	1778,4	357,9	107,7	1886,2	100,4
93,7	1760,2	427,5	128,7	1888,9	100,6
92,6	1739,9	498,7	150,1	1890,0	100,6
91,6	1719,7	566,4	170,5	1890,2	100,6
89,4	1679,9	698,2	210,2	1890,0	100,6
88,4	1660,7	763,3	229,7	1890,4	100,6
87,1	1636,2	825,4	248,5	1884,6	100,3
85,1	1598,3	952,0	286,6	1884,9	100,4
84,1	1579,7	1013,0	304,9	1884,6	100,3
81,4	1529,3	1195,4	359,8	1889,1	100,6
79,5	1492,5	1314,9	395,8	1888,2	100,5
73,0	1371,0	1701,4	512,1	1883,2	100,3
71,2	1338,1	1803,4	542,8	1881,0	100,1
70,7	1327,2	1862,5	560,6	1887,8	100,5
69,8	1310,4	1913,0	575,8	1886,2	100,4
68,7	1289,5	1957,4	589,2	1878,7	100,0
66,7	1253,0	2113,4	636,1	1889,1	100,6
65,8	1236,7	2160,8	650,4	1887,1	100,5
65,1	1222,7	2209,4	665,0	1887,8	100,5
64,0	1202,4	2254,0	678,5	-1880,8	100,1
63,6	1194,0	2302,7	693,1	1887,1	100,5
62,3	1170,9	2342,4	705,0	1876,0	99,9
62,0	1163,6	2393,6	720,5	1884,1	100,3
61,2	1149,9	2437,4	733,7	1883,5	100,3
60,5	1136,6	2483,6	747,6	1884,1	100,3
59,6	1119,5	2527,7	760,8	1880,3	100,1
58,8	1103,5	2567,0	772,7	1876,2	99,9
58,4	1096,4	2611,9	786,2	1882,6	100,2
57,7	1083,6	2655,8	799,4	1883,0	100,3
				Povprečje	100,6
*preračunano z RF				RSD	0,17

Preglednica XVI: Vsebnost ASA merjena s klasično metodo HPLC in vsebnost ASA preračunana z novo metodo za vzorec v acetatnem pufru s pH 4,5.

Vsebnost ASA [%]	Odziv ASA	Odziv SA	Odziv SA*RF	Odziv celokupne ASA	Celokupna vsebnost ASA*
100,0	1877,9	0,0	0,0	1877,9	100,0
99,7	1872,6	38,0	11,4	1884,0	100,3
99,5	1868,6	67,0	20,2	1888,8	100,6
99,0	1859,1	96,2	28,9	1888,0	100,5
98,7	1852,9	132,7	39,9	1892,8	100,8
98,1	1841,8	153,0	46,0	1887,8	100,5
97,7	1833,9	187,7	56,5	1890,4	100,7
97,2	1825,4	209,7	63,1	1888,5	100,6
96,8	1817,3	237,5	71,5	1888,8	100,6
96,1	1804,6	265,0	79,8	1884,4	100,3
95,6	1795,6	294,0	88,5	1884,1	100,3
95,3	1790,5	320,5	96,5	1886,9	100,5
95,0	1783,6	349,8	105,3	1888,9	100,6
94,4	1773,6	377,2	113,5	1887,1	100,5
93,8	1761,6	404,5	121,8	1883,4	100,3
93,6	1758,2	433,4	130,5	1888,6	100,6
93,2	1750,5	460,4	138,6	1889,1	100,6
92,8	1743,1	487,8	146,8	1889,9	100,6
92,3	1733,9	514,8	155,0	1888,8	100,6
91,9	1725,2	542,5	163,3	1888,5	100,6
91,4	1717,3	572,5	172,3	1889,6	100,6
90,9	1706,9	594,4	178,9	1885,9	100,4
90,6	1701,1	622,0	187,2	1888,3	100,6
90,3	1696,0	649,3	195,4	1891,5	100,7
89,7	1683,6	676,3	203,6	1887,2	100,5
89,3	1677,7	701,2	211,1	1888,8	100,6
89,0	1670,4	731,7	220,2	1890,7	100,7
88,5	1662,4	758,3	228,2	1890,7	100,7
85,7	1608,4	940,6	283,1	1891,6	100,7
85,4	1603,1	976,8	294,0	1897,1	101,0
84,8	1593,4	990,3	298,1	1891,5	100,7
84,4	1585,6	1010,5	304,2	1889,8	100,6
84,0	1577,2	1041,1	313,4	1890,6	100,7
80,4	1509,6	1262,3	379,9	1889,6	100,6
				Povprečje	100,4
*preračunano z RF				RSD	0,22

Preglednica XVII: Vsebnost ASA merjena s klasično metodo HPLC in vsebnost ASA preračunana z novo metodo za vzorec v fosfatnem pufru s pH 6,8.

Vsebnost ASA [%]	Odziv ASA	Odziv SA	Odziv SA*RF	Odziv celokupne ASA	Celokupna vsebnost ASA*
100,0	1856,2	0,0	0,0	1856,2	100,0
99,2	1841,6	87,5	26,3	1868,0	100,6
93,2	1730,3	477,1	143,6	1873,9	101,0
84,7	1573,0	976,7	294,0	1867,0	100,6
81,5	1512,5	1177,6	354,4	1866,9	100,6
80,6	1495,7	1243,6	374,3	1870,1	100,7
79,3	1471,2	1305,4	392,9	1864,1	100,4
77,3	1434,0	1432,8	431,3	1865,3	100,5
75,0	1392,3	1557,9	468,9	1861,3	100,3
74,4	1381,4	1616,5	486,6	1867,9	100,6
73,4	1363,0	1676,5	504,6	1867,6	100,6
72,4	1343,0	1732,9	521,6	1864,6	100,5
71,4	1325,4	1791,2	539,1	1864,6	100,5
70,6	1309,7	1848,4	556,4	1866,1	100,5
69,4	1287,9	1899,7	571,8	1859,7	100,2
68,5	1271,0	1957,6	589,2	1860,3	100,2
67,8	1258,2	2015,6	606,7	1864,9	100,5
66,8	1240,6	2068,6	622,7	1863,3	100,4
65,9	1222,6	2119,1	637,8	1860,4	100,2
65,0	1205,8	2173,7	654,3	1860,0	100,2
64,1	1189,7	2225,8	670,0	1859,7	100,2
63,2	1172,3	2273,9	684,5	1856,8	100,0
62,5	1160,3	2328,0	700,7	1861,1	100,3
61,7	1145,0	2378,4	715,9	1860,9	100,3
60,6	1124,9	2424,2	729,7	1854,6	99,9
60,0	1113,4	2472,8	744,3	1857,7	100,1
59,1	1097,7	2521,4	758,9	1856,7	100,0
58,4	1083,7	2569,5	773,4	1857,1	100,0
57,6	1069,1	2616,9	787,7	1856,8	100,0
56,8	1055,0	2662,8	801,5	1856,5	100,0
56,1	1040,4	2707,1	814,8	1855,2	99,9
55,3	1026,5	2750,6	827,9	1854,4	99,9
54,6	1013,0	2794,5	841,1	1854,2	99,9
53,9	999,9	2838,2	854,3	1854,2	99,9
				Povprečje	100,3
*preračunano z RF				RSD	0,28

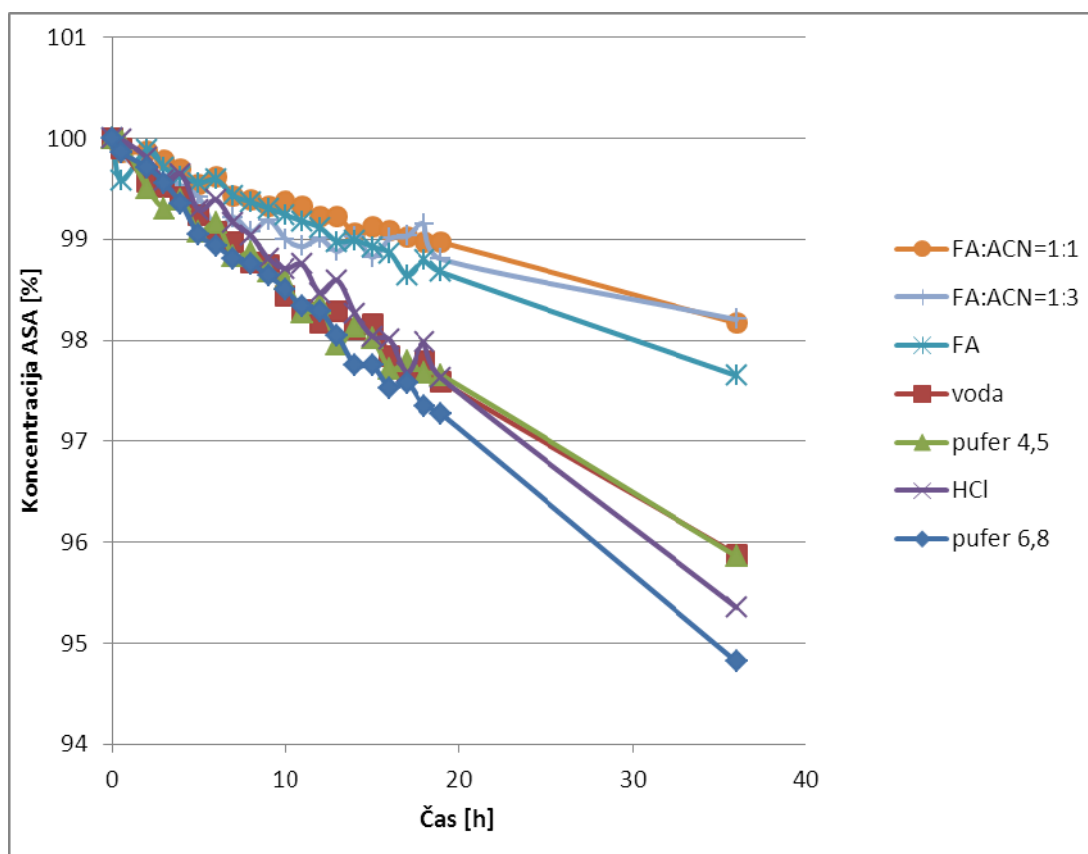
4.3 STABILNOST STANDARDA ASA

Zaradi znane problematike stabilnosti ASA v vodnih raztopinah smo želeli preveriti kako stabilna je pravzaprav ASA v vodnih medijih, zanimalo nas je tudi kateri so tisti dejavniki, ki najbolj vplivajo na stabilnost ASA v tekoči obliki. Zato smo v okviru diplomske naloge tudi kvantitativno ovrednotiti odnos med posameznim dejavnikom in stabilnostjo ASA. Stabilnost smo preverjali na petih nivojih. Zanimalo nas je kako je s stabilnostjo ASA v različnih vrstah medija, pri različnih temperaturah, pri različnih vrednostih pH in pri različnih koncentracijah ASA v vzorcu. Nazadnje smo uporabiti novo metodo tudi za preverjanje stabilnosti v praksi, in sicer na realnih pripravkih, ki vsebujejo ASA in so na voljo v lekarni.

4.3.1 STABILNOST STANDARDA ASA V RAZLIČNIH MEDIJIH

Stabilnost standarda ASA v različnih medijih smo preverjali zato, ker smo želeli najti optimalen medij, v katerem bi bila ASA najbolj stabilizirana, torej mediji v katerem bi bila hidroliza najpočasnejša. Temperaturo analize smo nastavili na 4 °C, saj smo vedeli, da je hidroliza pri nižjih temperaturah počasnejša. Za medije smo izbrali različna topila. Preverjali smo stabilnost v vodi, vodni mobilni fazi, v mobilni fazi, ki smo ji dodali organski modifikator ACN pri čemer smo pripravili dve različni razmerji med organsko in vodno fazo, ter v potencialnih medijih za raztapljanje pripravkov, da smo preverili njihovo ustreznost za namen uporabe.

Na Sliki 14 je prikazana stabilnost standarda ASA v naslednjih medijih: 0,1 % H₃PO₄: ACN=1 : 1, 0,1 % H₃PO₄: ACN= 1 : 3, 0,1 % H₃PO₄, vodi, acetatnem pufri pH 4,5, 0,1 M HCl in fosfatnem pufri pH 6,8, v odvisnosti od časa.



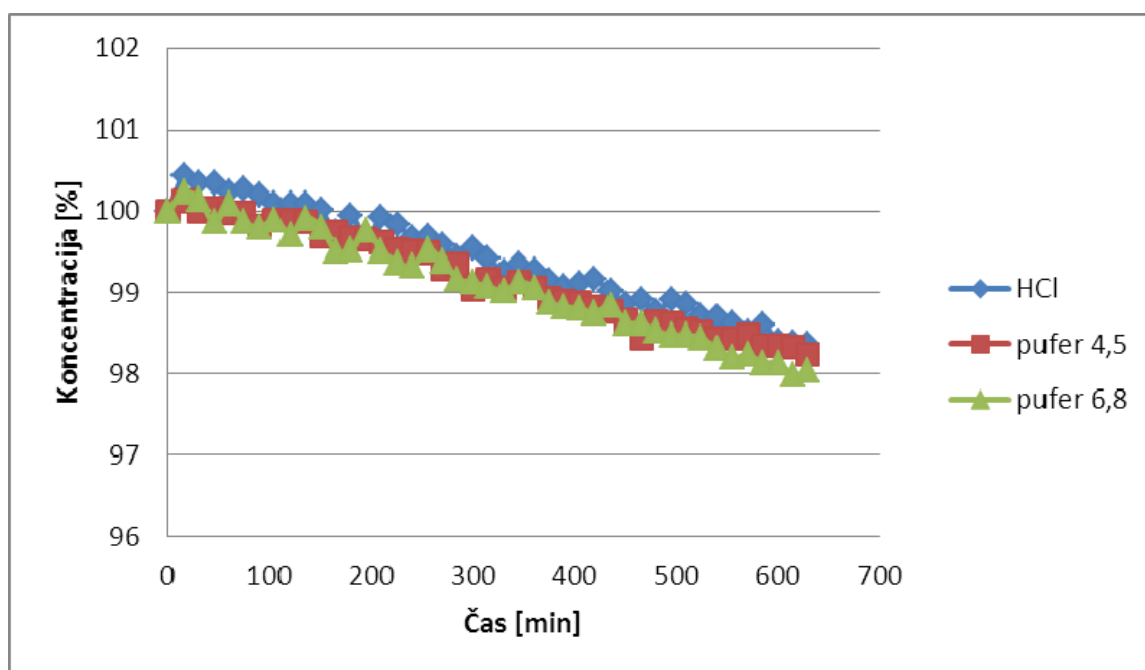
Slika 14: Stabilnost standarda ASA v različnih medijih pri 4 °C.

Ta segment preučevanja stabilnosti smo izvedli na samem začetku našega eksperimentalnega dela, saj smo želeli izbrati optimalen medij v katerem smo kasneje izvajali tudi validacijo in vrednotenje obeh metod za določanje vsebnosti ASA. Naše ugotovitve so, da je ASA stabilizirana (> 98,0 % začetne vsebnosti) 24 h v treh medijih: 0,1 % H_3PO_4 : ACN=1 : 1, 0,1 % H_3PO_4 : ACN= 1 : 3 in 0,1 % H_3PO_4 , 36 h pa le v prvih dveh. Zaradi največje stabilnosti v mediju 0,1 % H_3PO_4 : ACN=1 : 1, smo ta medij izbrali za našo metodo.

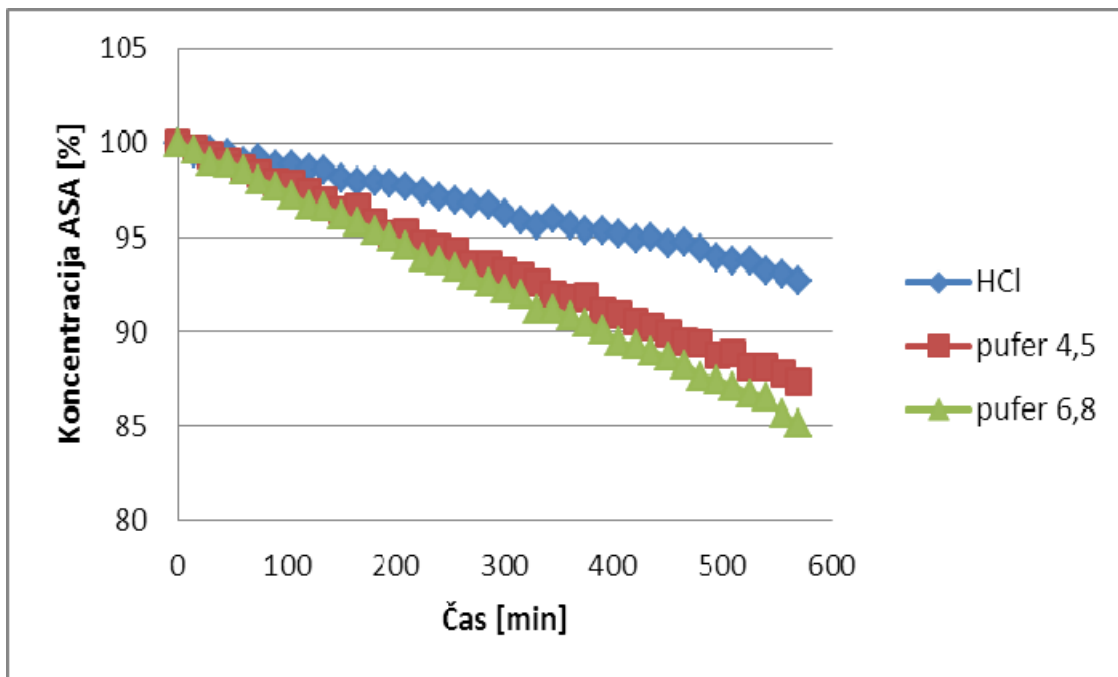
4.3.2 STABILNOST STANDARDA ASA PRI RAZLIČNIH TEMPERATURAH

V literaturi smo zasledili podatke o spreminjanju stabilnosti ASA v odvisnosti od temperature, zato smo stabilnost ASA pri različnih temperaturah spremljali pri štirih različnih temperaturah: 4, 15, 25 in 37 °C v treh različnih medijih: 0,1 M HCl, acetatnem pufru pH 4,5 in fosfatnem pufru pH 6,8. Pri vseh temperaturah smo zaznali najhitrejši upad

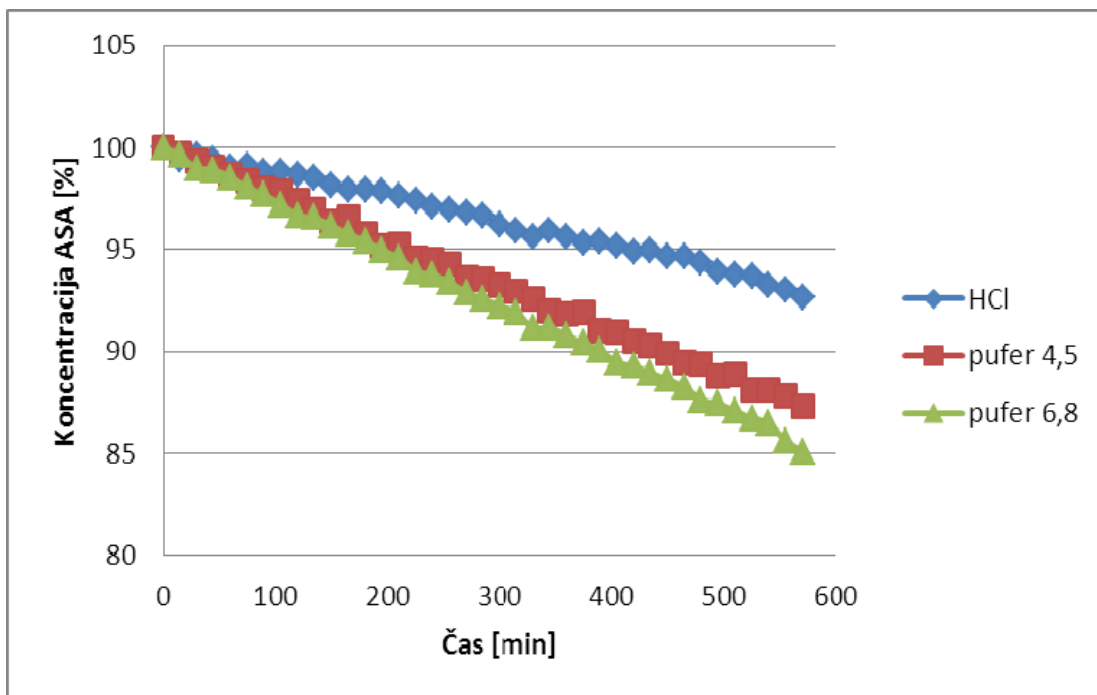
koncentracije ASA v pufru 6,8, sledil je pufer 4,5, medtem ko je bil upad v HCl najpočasnejši (Slike 15–18). Če pa primerjamo upad ASA v istem mediju in pri različnih temperaturah, opazimo, da se je hitrost hidrolize ASA večala z naraščajočo temperaturo. Tako je v mediju 0,1 M HCl po 405 min v vzorcu odstotek preostale ASA znašal: 99,11 % pri 4 °C, 98,86 % pri 15 °C, 95,20 % pri 25 °C in 88,52 % pri 37 °C. Medtem ko smo v preostalih dveh medijih pri 37 °C zaznali tudi do 40% upad vsebnosti ASA. Naši rezultati torej potrjujejo rezultate v literaturi (32, 38), ki navajajo, da stabilnost ASA z naraščajočo temperaturo upada.



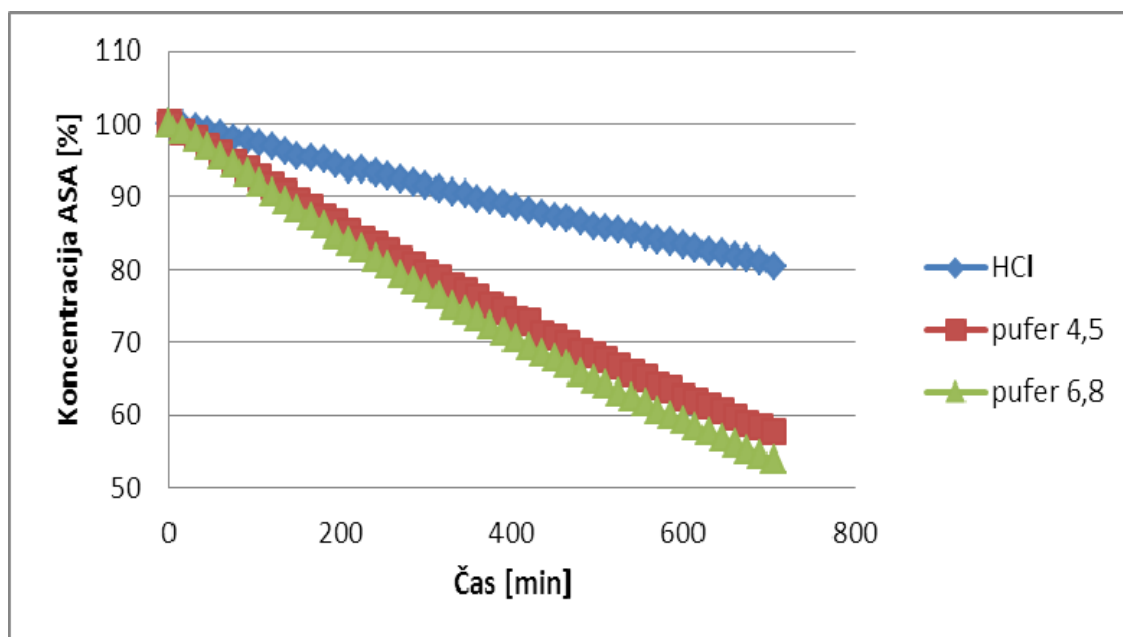
Slika 15: Upad koncentracije ASA v vzorcu v treh različnih medijih v odvisnosti od časa pri temperaturi 4 °C.



Slika 16: Upad koncentracije ASA v vzorcu v treh različnih medijih v odvisnosti od časa pri temperaturi 15 °C.



Slika 17: Upad koncentracije ASA v vzorcu v treh različnih medijih v odvisnosti od časa pri temperaturi 25 °C.

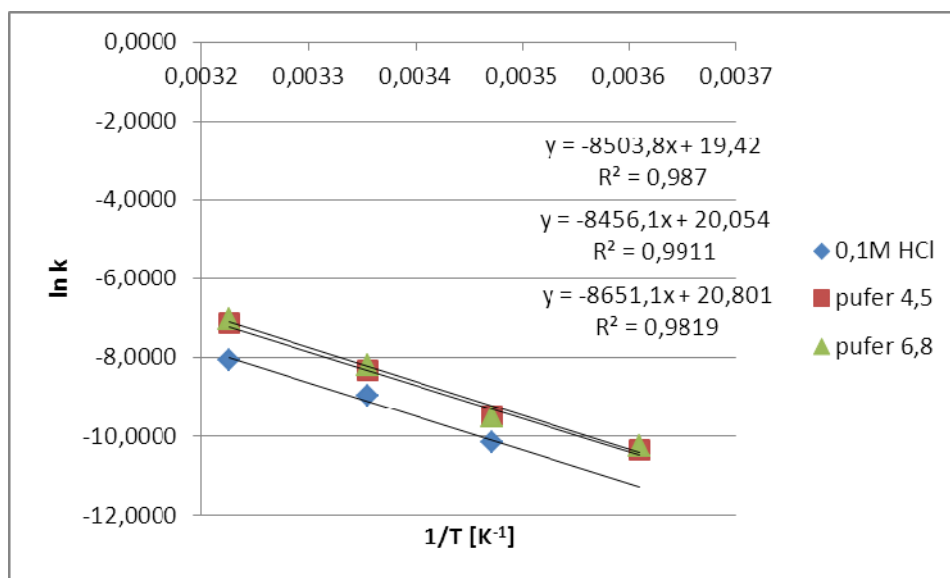


Slika 18: Upad koncentracije ASA v vzorcu v treh različnih medijih v odvisnosti od časa pri temperaturi 37 °C.

Iz pridobljenih rezultatov smo izračunali še konstante hitrosti za 1. red reakcije (Preglednica XVIII), ki so nam služile za izdelavo Arrheniusovega grafa, ki je prikazan na Sliki 19. Arrheniusov graf služi kot orodje pri pospešenih testih stabilnosti, saj opredeljuje razmerje med temperaturo in hitrostjo reakcije. Opazimo lahko, da premici za pufer 4,5 in pufer 6,8 sovpadata, medtem ko je premica za HCl vzporedna, a nekoliko nižje, kar potrjuje večjo stabilnost ASA v tem mediju. Pri premici za HCl nismo upoštevali zadnje točke, saj je preveč odstopala od ostalih in smo predvidevali, da je šlo v tem primeru za eksperimentalno napako. Na podlagi izračunanih Arrheniusovih premic lahko ugotovimo (R^2 je blizu 1), da lahko to zvezo uporabimo za napoved korelacije med temperaturo in hitrostjo hidrolize ASA. Izračunali smo tudi aktivacijsko energijo za hidrolizo ASA, ki je znašala ~ 71 KJ/mol in je primerljiva v vseh treh medijih.

Preglednica XVIII: Podatki za izdelavo Arrheniusovega grafa, ki podaja odvisnosti kinetike hitrosti hidrolize ASA od recipročne absolutne temperature.

0,1 M HCl					
T [°C]	1/T [K ⁻¹]	Enačba premice	R ²	k [min ⁻¹]	ln k
4	0,0036	$y = -3,2929 \cdot 10^{-5}x + 4,6096$	0,9733	3,2929E-05	-10,3212
15	0,0035	$y = -3,7898 \cdot 10^{-5}x + 4,6118$	0,9532	3,7898E-05	-10,1806
25	0,0034	$y = -1,2622 \cdot 10^{-4}x + 4,6056$	0,9916	1,2622E-04	-8,9775
37	0,0032	$y = -3,1042 \cdot 10^{-4}x + 4,6086$	0,9997	3,1042E-04	-8,0776
Acetatni pufer umerjen na pH 4,5					
T [°C]	1/T [K ⁻¹]	Enačba premice	R ²	k [min ⁻¹]	ln k
4	0,0036	$y = -3,1884 \cdot 10^{-5}x + 4,6070$	0,9805	3,1884E-05	-10,3534
15	0,0035	$y = -7,6025 \cdot 10^{-5}x + 4,6093$	0,9282	7,6025E-05	-9,4845
25	0,0034	$y = -2,3818 \cdot 10^{-4}x + 4,6059$	0,9982	2,3818E-04	-8,3425
37	0,0032	$y = -7,8713 \cdot 10^{-4}x + 4,6110$	0,9997	7,8713E-04	-7,1471
Fosfatni pufer umerjen na pH 6,8					
T [°C]	1/T [K ⁻¹]	Enačba premice	R ²	k [min ⁻¹]	ln k
4	0,0036	$y = -3,4876 \cdot 10^{-5}x + 4,6072$	0,9797	3,4876E-05	-10,2637
15	0,0035	$y = -7,3806 \cdot 10^{-5}x + 4,6078$	0,9519	7,3806E-05	-9,5141
25	0,0034	$y = -2,7466 \cdot 10^{-4}x + 4,6062$	0,9987	2,7466E-04	-8,2000
37	0,0032	$y = -8,8781 \cdot 10^{-4}x + 4,6135$	0,9999	8,8781E-04	-7,0268

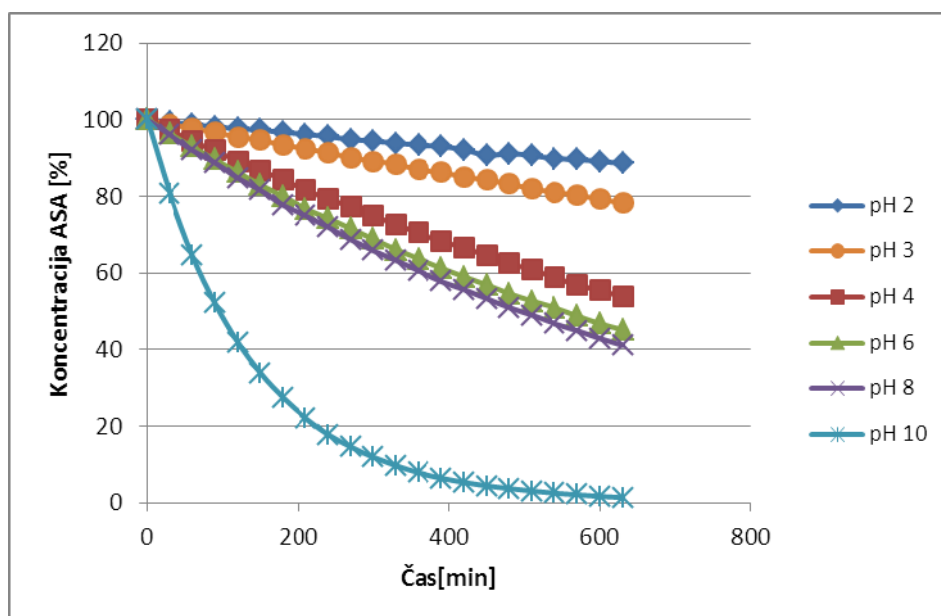


Slika 19: Arrheniusov graf vpliva temperature na hitrost hidrolize ASA v treh različnih medijih.

4.3.3 STABILNOST STANDARDA ASA PRI RAZLIČNIH pH VREDNOSTIH

Stabilnost ASA pri različnih pH vrednostih smo spremljali pri sedmih različnih pH vrednostih: 2, 3, 4, 6, 8, 10 in 12. Hitrost hidrolize je naraščala z naraščajočim pH-jem, vendar ne popolnoma sorazmerno. Pri pH 12 pa je bila hitrost hidrolize tako velika, da je že v drugi časovni točki (30 min) ASA popolnoma hidrolizirala. Iz Slike 21, ki prikazuje pH profil ASA je razvidno pri katerih pH vrednostih je hitrost hidrolize ASA največja (pH 10), najmanjša (pH 2), med vrednostmi pH 4-8 pa je približno enaka (plato). Izdelan pH profil je podoben kot pH profil v literaturnih virih (30, 37).

Upad vsebnosti ASA prikazuje Slika 20. Krivulje za pH 12 ni na sliki, saj je pri tej vrednosti pH že v drugii časovni točki (30 min) vsa ASA hidrolizirala.

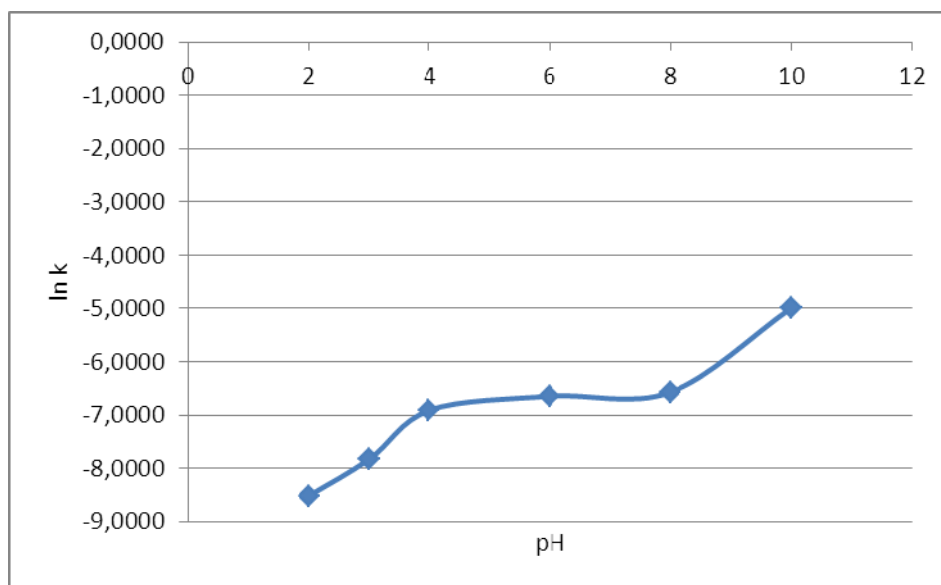


Slika 20: Vpliv pH vrednosti na hitrost hidrolize ASA pri 25 °C.

Iz podatkov, ki smo jih dobili z analizo vzorcev, smo določili premice s pripadajočimi enačbami in determinacijskimi koeficienti za 1. red reakcije. Iz kvantitativnih podatkov o konstanti reakcijske hitrosti se razbere, da je hitrost hidrolize ASA pri pH 2 petkrat manjša kot pri pH 4 in 34 krat manjša kot v pH 10 (Preglednica XIX). Iz teh podatkov smo izdelali tudi pH profil, ki je prikazan na Sliki 21.

Preglednica XIX: Enačbe premic ter hitrostne konstante 1. reda hidrolize ASA pri različnih pH vrednostih pri 25 °C.

pH	Enačba premice	R ²	k [min ⁻¹]	ln k
2	$y = -0.0002x + 4.6054$	0,9951	0,0002	-8,5172
3	$y = -0.0004x + 4.6065$	0,9995	0,0004	-7,8240
4	$y = -0.0010x + 4.6096$	0,9998	0,0010	-6,9078
6	$y = -0.0013x + 4.6082$	0,9999	0,0013	-6,6454
8	$y = -0.0014x + 4.6101$	0,9999	0,0014	-6,5713
10	$y = -0.0068x + 4.5492$	0,9994	0,0068	-4,9908

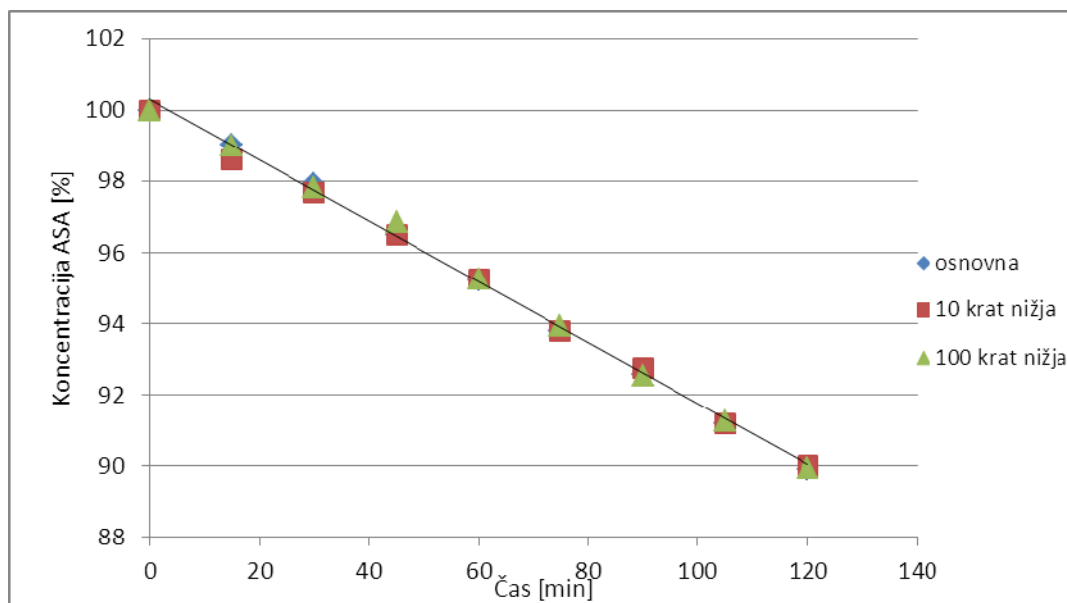


Slika 21: pH profil ASA pri 25 °C.

4.3.4 STABILNOST STANDARDA ASA PRI RAZLIČNIH KONCENTRACIJAH

V literaturi smo zasledili, da bolj nasičene vodne raztopine ASA izkazujejo daljšo razpolovno dobo (35), zato smo tudi mi spremljali stabilnost ASA v fosfatnem pufru pH 6,8 pri treh različnih koncentracijah: 0,89 mmol/L (osnovna), 0,089 mmol/L (10 krat nižja) in 0,0089 mmol/L (100 krat nižja). Naši rezultati niso pokazali značilnih razlik v stabilnosti ASA v odvisnosti od koncentracije, saj so vsebnosti ASA po 120 min znašale 89,91 % za osnovno raztopino, 90,00 % za 10 krat redčeno raztopino in 89,95 % za 100 krat redčeno raztopino (Slika 22). Na podlagi razlike med našimi ugotovitvami in literaturnimi podatki, sklepamo, da smo v našem poskusu očitno nismo uporabili nasičene

raztopine, da bi lahko pokazali spremembe v stabilnosti ASA v odvisnosti od koncentracije raztopine.

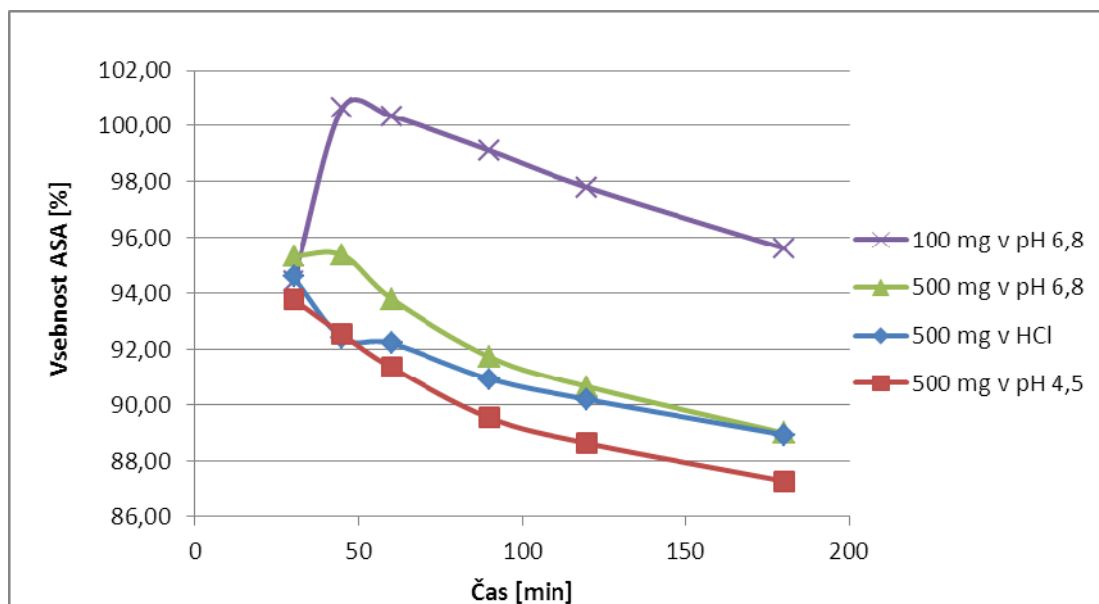


Slika 22: Upad koncentracije ASA pri različnih koncentracijah ASA v fosfatnem pufru s pH 6,8.

4.4 APLIKACIJA METODE ZA DOLOČANJE CELOKUPNE ASA NA PODROČJU STABILNOSTI

V nadaljevanju smo želeli preveriti uporabnost nove metode na realnih primerih iz prakse, hkrati pa nas je zanimala tudi stabilnost ASA v pripravkih. Najprej smo metodo uporabili na vzorcih sproščanja, kasneje pa smo si izbrali še dve zdravili- Aspirin protect, 100 mg smo pripravili v obliki metanolne raztopine (postopek za določanje vsebnosti ASA) in Aspirin migran, 500 mg, v obliki vodne raztopine (v obliki za zaužitje) .

Sproščanje smo izvajali na dveh realnih vzorcih, Aspirin protect, 100 mg in Aspirin, 500 mg, v treh različnih medijih: 0,1 M HCl, acetatnem pufru pH 4,5 in v fosfatnem pufru pH 6,8. Vzorci so bili odvzeti in analizirani v časovnih točkah: 30, 45, 60, 90, 120 in 180 min. Profil sproščanja je prikazan na Sliki 23.



Slika 23: Vzorci odvzeti med testom sproščanja in njihova vsebnost ASA pri koncentraciji 2,78 mmol/L ob času 0.

Odvzete vzorce med sproščanjem smo analizirali še po 24 h, saj je bila takrat vsebnost izračunana po klasični metodi pričakovano nižja, saj je v roku 24 h prišlo do hidrolize ASA. Z našo alternativno metodo smo preračunali vsebnost ASA v vzorcih in dobili rezultate, ki so podani v Preglednicah XX-XXIII. Rezultati za Aspirin 500 mg so podani v vseh treh medijih, Aspirin protect pa se zaradi gastrozistentne obloge v medijih 0,1 M HCl in pufru pH 4,5 sploh ni raztopil, zato so navedeni samo podatki v pufru pH 6,8.

Preglednica XX: Vsebnost ASA analizirana s klasično metodo in z alternativno metodo v vzorcih sproščanja Aspirina 500 mg (5) v 0,1 M HCl (A).

Vzorec	Vsebnost t = 0		Vsebnost t = 24 h	
	ASA	Celokupna ASA	ASA	Celokupna ASA
A5/30	94,59	96,29	76,16	89,49
A5/45	92,41	94,67	81,21	96,17
A5/60	92,23	95,52	80,75	96,29
A5/90	90,94	95,44	79,90	95,91
A5/120	90,20	95,84	80,08	96,18
A5/180	88,93	96,67	78,93	96,43

Preglednica XXI: Vsebnost ASA analizirana s klasično metodo in z alternativno metodo v vzorcih sproščanja Aspirina 500 mg (5) v acetatnem pufru s pH 4,5 (B)

Vzorec	Vsebnost t = 0		Vsebnost t = 24 h	
	ASA	Celokupna ASA	ASA	Celokupna ASA
B5/30	93,81	95,70	77,69	95,15
B5/45	92,54	95,61	77,51	95,72
B5/60	91,35	95,70	76,67	95,53
B5/90	89,54	95,59	71,23	89,86
B5/120	88,64	96,24	76,00	95,86
B5/180	87,29	97,52	74,28	95,68

Preglednica XXII: Vsebnost ASA analizirana s klasično metodo in z alternativno metodo v vzorcih sproščanja Aspirina 500 mg (5) v fosfatnem pufru s pH 6,8 (C).

Vzorec	Vsebnost t = 0		Vsebnost t = 24 h	
	ASA	Celokupna ASA	ASA	Celokupna ASA
C5/30	95,34	97,68	79,61	98,76
C5/45	95,37	98,98	78,14	98,17
C5/60	93,81	98,89	77,44	98,23
C5/90	91,73	98,88	76,28	97,98
C5/120	90,66	99,45	75,95	97,65
C5/180	88,99	100,47	74,47	97,97

Preglednica XXIII: Vsebnost ASA analizirana s klasično metodo in z alternativno metodo v vzorcih sproščanja Aspirina protect, 100 mg (1) v fosfatnem pufru s pH 6,8 (C).

Vzorec	Vsebnost t = 0		Vsebnost t = 24 h	
	ASA	Celokupna ASA	ASA	Celokupna ASA
C1/30	94,42	95,49	77,40	96,28
C1/45	100,65	103,23	81,42	102,94
C1/60	100,35	104,52	81,82	104,58
C1/90	99,12	105,45	80,88	105,21
C1/120	97,80	106,01	80,73	105,15
C1/180	95,62	107,07	79,33	106,51

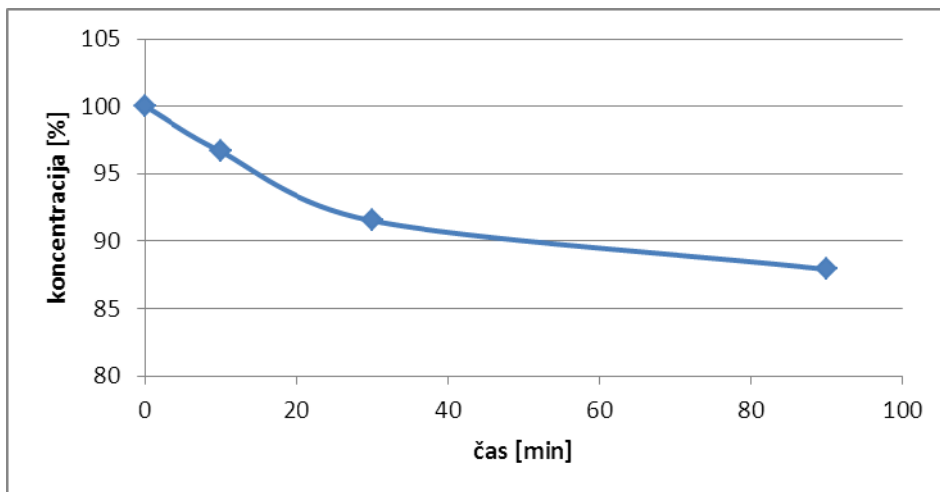
Na podlagi rezultatov v zgornjih preglednicah lahko zaključimo, da daje nova metoda primerljive rezultate ob času t = 0 in t = 24 h, medtem ko se rezultati klasične metode med

obema časoma precej razlikujejo. Tu se pokaže prednost naše metode, saj čas analize ne vpliva nanjo, pri klasični metodi pa je pomembna praktično vsaka minuta med pripravo vzorca in analizo. Pri simulaciji možnih okoliščin eksperimenta sproščanja, npr. ponovna analiza vzorcev sproščanja po 1 dnevu zaradi problemov v analitiki, bi bili takšni vzorci neustrezni, saj bi večji del ASA že hidroliziral. Iz rezultatov je razvidno, da bi bila vsebnost ASA določena s klasično metodo v vseh primerih le blizu 80%, z novo pa blizu 100 % in primerljiva z meritvami celokupne ASA ob času 0 (Preglednice XX-XXIII). Prednost celokupnega določanja ASA se opazi tudi pri rezultatih ob času $t = 0$, saj se vsebnost ASA med obema metodama razlikuje, kar pomeni, da je tudi v času sproščanja že prišlo do hidrolize. Te razlike niso tako velike kot po 24 urah, a se povečujejo glede na čas odvzema vzorca. Tako se npr. v primeru sproščanja v fosfatnem pufru s pH 6,8 vsebnost ASA ob času 30 min razlikuje za približno 2,5% (97,68 % proti 95,34 %) ob 180 min pa že za 11,5 % (100,47 % proti 88,99 %) (Preglednica XXII). Klasična metoda, ki meri le vsebnost ASA, podaja zavajajoče in netočne rezultate, saj zaradi hidrolize v vodni raztopini sklepamo na prenizko vsebnost sproščene učinkovine bodisi zaradi nestabilnosti med testom sproščanja ali kasneje pred analizo vzorca. Naša alternativna metoda pa upošteva tudi hidrolizo ASA, saj določa celokupno ASA, ki je vsota prisotne ASA in njenega razpadnega produkta SA.

Pri opazovanju hidrolize ASA v metanolni raztopini Aspirina protect, ki smo jo pripravili v skladu s farmakopejskim predpisom za določanje ASA v pripravkih, smo ugotovili, da je vsebnost ASA po 24 h še vedno zelo visoka (99,30 %), kar je posledica ustrezne stabilizacije v pripravku oz. samega farmakopejskega predpisa. Ker je kljub temu del ASA razpadel, smo določali vsebnost ASA po 24 h tudi z novo metodo in dobili rezultat 100,1 %. S tem smo potrdili aplikativnost naše metode, vendar v takšnem primeru, ko je obseg hidrolize minimalen metoda za celokupno določanje ASA ne predstavlja bistvene prednosti, saj se rezultati zaradi tako male hidrolize ne razlikujejo bistveno.

V zaključku pa smo preverili še stabilnost ASA v zdravilu Aspirin migran, kjer je ASA pred zaužitjem v tekoči obliki. Zanimala nas je predvsem hitrost in obseg hidrolize, saj je v takšnem primeru zelo pomemben čas od priprave do zaužitja zdravila. Ugotovili smo, da je vsebnost ASA po 10 min znašala 96,1 %, po 30 min 91,5 % in po 90 min 87,9 %

(Slika 24). Tako lahko povzamemo, da je v tem primeru čas med pripravo in zaužitjem vzorca zelo pomemben, saj vsebnost ASA pada relativno hitro in je po 30 min že pod predpisano mejo 95 % vsebnosti.



Slika 24: Upad vsebnosti ASA v zdravilu Aspirin migran, pripravljenem v vodi, v odvisnosti od časa.

5 SKLEP

- Razvili smo HPLC metodo za sočasno določanje ASA in SA za katero lahko na podlagi validacije trdimo, da je selektivna, linearna, ponovljiva in točna.
- Uspešno smo vpeljali novo metodo za določanje celokupne ASA preko faktorja odziva, ki smo jo potrdili tako znotraj validacije kakor tudi na stabilnostnih vzorcih standardov ASA in pripravkov z ASA.
- Predpogoj za ustreznost metode je predstavljal faktor odziva, ki smo ga določili pri treh valovnih dolžinah (210, 228, 276 nm) in ugotovili, da so vse primerne za vrednotenje celokupne ASA v vzorcu. Vendar je najprimernejša valovna dolžina 210 nm, saj je pri njej razmerje med odzivom ASA in SA najmanjše in je metoda posledično najbolj občutljiva.
- Stabilnost ASA je odvisna od medija v katerem se nahaja. Med preizkušenimi mediji je najustreznejši 0,1 % H_3PO_4 : ACN = 1 : 1, v katerem hidrolizira približno 1 % ASA v 24 urah..
- Temperatura ima velik vpliv na stabilnost ASA, saj je pri 4 °C hitrost hidrolize najmanjša in narašča sorazmerno z naraščajočo temperaturo ter je pri 37 °C 10-20 krat hitrejša kot pri 4 °C, odvisno od medija za sproščanje v katerem se nahaja. ASA je najbolj stabilna v 0,1 M HCl in najmanj v fosfatnem pufru pH 6,8. V vseh proučevanih medijih velja tudi Arrheniusova enačba.
- Rezultati kažejo tudi na povezavo med pH in stabilnostjo ASA. Najbolj stabilna je bila pri pH 2, najmanj pa pri pH 12, vmes je stabilnost padala z naraščajočim pH.
- Stabilnost ASA ni odvisna od koncentracije ASA v vzorcu, saj smo pri treh različnih koncentracijah zasledili popolnoma enako stabilnost.
- Aplikacija nove metode za določanje celokupne ASA na področju stabilnosti se je izkazala za uspešno, bolj opazno pri tistih vzorcih pri katerih je bil obseg hidrolize večji, saj smo določili ASA, ki je primerljiva z začetno vsebnostjo ASA pred hidrolizo. Prednost te metode v smislu natančnosti in točnosti se je še posebej pokazala pri analizi vzorcev sproščanja, saj prihaja do hidrolize ASA že med samim izvajanjem testa in tudi pred analizo vzorcev.

6 LITERATURA

1. A. S. Tarnawski, T. C. Caves: Aspirin in the XXI century: its major clinical impact, novel mechanisms of action, and new safer formulations, *Gastroenterology*, 2004; 127: 341-343
2. K. K. Wu: Novel mechanisms of aspirin pharmacologic actions: A model for study in herbal natural products, *Tromb Res*, 2005; 117:61-64
3. J.R.Vane, R.M.Botting: The mechanism of action of aspirin, *Tromb Res*, 2003; 110: 255-258
4. D. Jeffreys: Aspirin: the remarkable story of a wonder drug, Bloomsbury, London, 2005
5. F. H. Moll, J. Leißner: Aspirin-wonder drug with dark spots? A history about physicians, fads and pharmaceuticals, *J Urology*, 2009; 181:387
6. <http://www.lek.si/si/skrb-za-zdravje/medicinski-slovar/>, dostopano julija 2013
7. K. K. Wu: Novel mechanisms of aspirin pharmacologic actions: A model for studying herbal natural products, *Tromb Res*, 2005; 117: 61-64
8. C.Michaux, X. de Leval, F.Julémont, J.Dogné, B.Pirotte, F.Durant: Structure-based pharmacophore of COX-2 selective inhibitors and identification of original lead compounds from 3D database searching method, *Eur J Med Chem*, 2006; 41: 1446-1455
9. D. L.Simmons: Variants of cyclooxygenase 1 and their roles in medicine, *Tromb Res*, 2003;110:265-268
10. W. Greffrath, T. Kirschstein, H. Nawrath, R.Treede: Acetylsalicylic acid reduces heat responses in rat nociceptive primary sensory neurons—evidence for a new mechanism of action, *Neurosci Lett*, 2002; 320: 61-64
11. Povzetek glavnih značilnosti zdravila Aspirin 500 mg tablete
12. D. M. Aronoff, E. G. Neilson: Antipyretics: mechanisms of action and clinical use in fever suppression, *Am J Med*, 2001; 111: 304-315
13. E. V. Hersh, P. A. Moore, G. L. Ross: Over-the-counter analgetics and antipyretics: A critical assessment, *Clin Ther*, 2000; 22: 500-548

14. S. Takahashi, M. Ushida, R. Komine, A. Shimodaira, T. Uchida, H. Ishihara, T. Shibano, G. Watanabe, Y. Ikeda, M. Murata: Platelet responsiveness to in vitro aspirin is independent of COX-1 and COX-2 protein levels and polymorphisms, *Tromb Res*, 2008; 121: 509-517
15. R.B. Ghooi, S.M. Thatte, P.S. Joshi: The mechanism of action of aspirin-Is there anything beyond cyclo-oxygenase?, *Med Hypotheses*, 1995; 44: 77-80
16. <http://www.ivz.si/register>, dostopano julija 2013
17. https://www.astrazeneca.si/uploads/product/pil_file/184/Navodilo_za_uporabo_Axanum_81mg_I_20mg_hard_capsules_25-9-2012.pdf, dostopano julija 2013
18. <http://www.draagle.com/>, dostopano julija 2013
19. <http://www.mb-lekarne.si/>, dostopano julija 2013
20. X.Wang: Achelate theoryfor the mechanism of action of aspirin-like drugs, *Med Hypotheses*,1998; 50: 239-251
21. H. T.Sørensen, L.Mellemkjær, W. J. Blot, G.L.eNielsen, F. H.Steffensen, J. K. McLaughlin, J. H. Olsen: Risk of upper gastrointestinal bleeding associated with use of low-dose aspirin, *Am J Gastroenterol*, 2000; 95: 2218-2224
22. A. I.Lanas: Current approaches to reducing gastrointestinal toxicity of low-dose aspirin, *Am J Med*, 2001; 110: S70-S73
23. K.Egger, H. D.Allescher: Antiplatelet Therapy During Gastrointestinal Bleeding: Risk or Benefit?, *Gastroenterology*, 2010; 139: 687-689
24. O.Erdem, A.Aydin, A.Sayal, A.Cemal, V.Kesik, A. E.Kurekci: In vivo investigation of efficiency and preventive role of selenium and zinc on aspirin induced impairment on antioxidant system, hepatic and renal toxicity, *Toxicol Lett*, 2006; 164: S131
25. M.Setkowicz, L.Mastalerz, M.Podolec-Rubis, M.Sanak, A.Szczeklik: Clinical course and urinary eicosanoids in patients with aspirin-induced urticaria followed up for 4 years, *J Allergy Clin Immun*, 2009; 123: 174-178
26. J. Bae, S. Kim, Y. Ye, H. J.Yoon, C. Suh, D. Nahm, H. Park: Significant association of FcεRIα promoter polymorphisms with aspirin-intolerant chronic urticaria, *J Allergy Clin Immun*, 2007; 119: 449-456

27. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@rn+50-78-2>, dostopano julija 2013
28. M. Feldman, B. Cryer : Aspirin absorption rates and platelet inhibition times with 325-mg buffered aspirin tablets (chewed or swallowed intact) and with buffered aspirin solution, *Am J Cardiol*, 1999; 84: 404-409
29. <http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/aspirin.htm#SectionTitle:6.1>
Absorption by route of exposure, dostopano septembra 2013
30. K. A. Connors, G. L. Amidon , V. J. Stella: Chemical stability of Pharmaceuticals. A Handbook for Pharmacists, 2nd Edition, John Wiley & Sons, New York, 1986: 221-229
31. R. O. Williams III, J.Liu: Influence of formulation technique for hydroxypropyl- β -cyclodextrin on the stability of aspirin in HFA 134a, *Eur J Pharm Biopharm*, 1999; 47:145-152
32. Lund W: The Pharmaceutical Codex: Principles and Practice of Pharmaceutics, 12th Edition, The Pharmaceutical Press, London, 1994: 741-745
33. S. Yoshioka, V. J. Stella: Stability of drugs and dosage forms, Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, 2000; 56-60, 86-88, 163
34. O. M. N. Al-Gohary, R. S. Al-Kassas: Stability studies of aspirin–magaldrate double layer tablets, *Pharm Acta Helv*, 2000; 74: 351-360
35. F. Kees, D. Jehnich, H. Grobecker: Simultaneous determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr B*, 1996; 677:172-177
36. M. Ferrit, C. del Valle, F. Martínez: The influence of the structural characteristics of the substrate and the medium on the stability of triflusal and acetylsalicylic acid in micellar systems, *J Mol Liq*, 2008; 142: 64-71
37. I. T. Some, P. Bogaerts, R. Hanus, M. Hanocq, J. Dubois: Improved kinetic parameter estimation in pH-profile data treatment, *Int J Pharm*, 2000; 198: 39-49
38. M. Angberg, C. Nyström: Evaluation of heat-conduction microcalometry in pharmaceutical stability studies, *Acta Pharm*, 1988; 25: 307-320
39. M. M. Sena, J. C. B. Fernandes, L. Rover Jr., R. J. Poppi, L. T. Kubota: Application of two-and three-way chemometric methods in the study of acetylsalicylic acid and

- ascorbic acid mixtures using ultraviolet Spectrophotometry, *Anal Chim Acta*, 2000; 409: 159-170
40. M.L Altun, T Ceyhan, M Kartal, T Atay, N Özdemir, Ş Cevheroğlu: LC method for the analysis of acetylsalicylic acid, caffeine and codeine phosphate in pharmaceutical preparations; *J Pharm Biomed Anal*, 2001; 25: 93-101
41. M. S. M. Quintino, D. Corbo, M. Bertotti, L. Angnes: Amperometric determination of acetylsalicylic acid in drugs by batch injection analysis at a copper electrode in alkaline solutions, *Talanta*, 2002; 58: 943-949
42. European Pharmacopoeia, 6th Edition, Council of Europe, Strasbourg 2007.
43. U.S. Pharmacopeia USP 34-NF29, U.S. Pharmacopeia Twinbrook Parkway, Rockville, 2010.
44. <http://www.answers.com/topic/hplc-high-performance-liquid-chromatography>, dostopano septembra 2013
45. R Pirola, S.R Bareggi, G. De Benedittis: Determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in skin and plasma by high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr B*, 1998; 705: 309-315
46. L. H. Shaw, T. H. Tsai: Simultaneous determination and pharmacokinetics of protein unbound aspirin and salicylic acid in rat blood and brain by microdialysis: An application to herbal-drug interaction, *J Chromatogr B*, 2012; 895-896: 31-38
47. I.M. Jalal, S.I. Sa'sa': Simultaneous determination of dextropropoxyphene napsylate, caffeine, aspirin and salicylic acid in pharmaceutical preparations by reversed-phase HPLC, *Talanta*, 1984; 31: 1015-1017
48. L. Y. Lo, A. Bye: Specific and sensitive method for the determination of aspirin and salicylic acid in plasma using reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr B*, 1980; 181: 473-477
49. D.M. Siebert, F. Bochner: Determination of plasma aspirin and salicylic acid concentrations after low aspirin doses by high-performance liquid chromatography with post-column hydrolysis and fluorescence detection, *J Chromatogr B*, 1987; 420: 425-431

50. G. P. McMahon, S. J. O' Connor, D. J. Fitzgerald, S. le Roy, M. T. Kelly: Determination of aspirin and salicylic acid in transdermal perfusates, *J Chromatogr B*, 1998; 707: 322-327
51. Z. Kokot, K. Burda: Simultaneous determination of salicylic acid and acetylsalicylic acid in aspirin delayed-release tablet formulations by second-derivative UV spectrophotometry, *J Pharm Biomed Anal*, 1998; 18: 871-875
52. A. Navalón, R. Blanc, M. del Olmo, J. L. Vilchez: Simultaneous determination of naproxen, salicylic acid and acetylsalicylic acid by spectrofluorimetry using partial least-squares (PLS) multivariate calibration, *Talanta*, 1999; 48: 469-475
53. A. J. Torriero, J. M. Luco, L. Sereno, J. Raba: Voltammetric determination of salicylic acid in pharmaceutical formulations of acetylsalicylic acid, *Talanta*, 2004; 62: 247-254
54. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf, dostopano julija 2013
55. <http://www.gmp-compliance.org/guidemgr/files/2-8-4-15--V4AN15.PDF>, dostopano septembra 2013