

Univerza v Ljubljani



UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MOJCA PERKO

**RAZVOJ IN VALIDACIJA KROMATOGRFSKE
METODE ZA DOLOČANJE SILIMARINA V
RASTLINSKIH PRIPRAVKIH TER PROUČEVANJE
NJIHOVE STABILNOSTI**

MAGISTRSKO DELO

Ljubljana, julij 2010

Magistrsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr.prof. dr. Vojka Kmetca mag.farm. Vse analizne metode sem opravila v Kontrolno analiznem laboratoriju Mariborskih lekarn Maribor.

Zahvala izr. prof. dr. Vojku Kmetcu mag.farm, doc. dr. Alešu Mlinariču mag. farm. in prof. dr. Darinki Brodnjak Vončini za strokovno pomoč in podporo.

Posebej bi se zahvalila mojim biserom, ki v mojem srcu zavzemajo posebno mesto, možu Davidu in sinovoma Valu in Lanu.

Magistrsko nalogo posvečam očetu Stanislavu Razgoršku in mami Alojziji Razgoršek, ki sta s starševsko ljubeznijo, ki jo premoreta v nešteto oblikah, zaslužna za nastanek magistrskega dela.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Vojka Kmetca mag.farm. in somentorja doc.dr. Aleša Mlinariča mag.farm..

Podpis:

1.1 POVZETEK

Pegasti badelj vsebuje silimarin, ki predstavlja skupino antihepatotoksičnih učinkovin pegastega badlja. Silimarin ne učinkuje le preventivno, temveč tudi pospešuje obnovo jetrnih celic in zdravljenje jeter po poškodbah zaradi virusov in strupenih snovi.

Silimarin je najbolj priporočljivo uživati v obliki tablet ali kapsul, ki vsebujejo ekstrakt iz plodu pegastega badlja. Takšna priprava izdelujejo tudi v Mariborskih lekarnah. Izdelek Hepabion FORTE je registriran kot galenski izdelek. Izdelek Silibion je registriran kot prehransko dopolnilo.

Ker je pri kontroli kakovosti izdelkov pred sprostitvijo na trg in pri kontroli stabilnosti farmacevtskih izdelkov analizna metoda ključnega pomena, smo v nalogi razvili in validirali novo analizno metodo za kvantitativno določevanje silimarina v tabletah z ekstraktom pegastega badlja, s katero zagotavljamo, da je metoda selektivna in ustrezna za predvideno uporabo ter jo lahko vgradimo v koncept zagotavljanja kvalitete, varnosti in učinkovitosti farmacevtskega izdelka. Pri tem smo uporabili metodo HPLC. Za določitev silimarina smo izbrali gradientno metodo tekočinske kromatografije. Uporabili smo dve mobilni fazi, ki sta vsebovali vodo, metanol in fosforjevo kislino v različnih razmerjih. Ločitev je potekala na kromatografski koloni R18 in pri valovni dolžini 288 nm.

Tekom validacijskega procesa smo določili minimalne kriterije izbranim validacijskim parametrom, katerim je morala metoda zadostiti. Ustreznost ugotovljenih karakteristik smo preverili s primerno statistično analizo.

Pripravili smo dolgoročno in pospešeno študijo stabilnosti, ki izpolnjuje kriterije in zagotavlja spremljanje sproščanja in stabilnosti, z namenom določitve roka uporabnosti in določitev pogojev shranjevanja.

Rezultate smo statistično ovrednotili in v razpravi povzeli ugotovitve glede uporabnosti nove metode in glede kakovosti oziroma stabilnosti preučevanih izdelkov.

UPORABLJENE KRATICE in RAZLAGA POJMOV

CRM	Certificiran referenčni material
CTD	Common technical document Skupni tehnični dokument
EDQM	European Directorate for the Quality of Medicines Evropska direkcija za kakovost zdravil
FDA	US Food And Drug Administration Ameriška organizacija za prehrano in zdravila
GLP	Good laboratory practice Dobra laboratorijska praksa
HPLC	High performance liquid chromatography Visokotlačna kromatografija ali tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
ICH	International Conference on Harmonization Mednarodna konferenca za harmonizacijo
IUPAC	The International Union of Pure and Applied Chemistry Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo
LOD	Limit of Detection Meja zaznavnosti ali meja detekcije
LOQ	Limit of Quantification Meja določljivosti ali meja kvantifikacije
QA	Quality assurance Zagotavljanje kakovosti
RSD	Relative standard deviation Koeficient variacije ali relativni standardni odmik
USP	The United States Pharmacopeia Ameriška farmakopeja
UV / VIS	Ultraviolet and visible light Ultravijolična in vidna svetloba

UPORABLJENI SIMBOLI

b_0	odsek na y-osi regresijske premice
b_1	naklon regresijske premice
$\bar{x}$	povprečje meritev ali povprečna vrednost
s^2	varianca meritev
s	standardna deviacija (odklon)
$s_{\bar{x}}$	standardni odmik povprečja ali standardna napaka
t	tabelarična vrednost v t distribuciji
e_i	napaka
A	vrednost signala, ki predstavlja ploščino pod kromatografskim vrhom
σ	prava standardna deviacija
n	število meritev
μ	prava aritmetična sredina meritev
C_i	interval zaupanja

KAZALO:

1.	UVOD.....	1
1.1	Pegasti badelj.....	1
1.1.1	Predstavitev in zgodovinski aspekt	1
1.1.2	Mehanizmi delovanja silimarina	3
1.1.3	Kemija silimarina	6
1.2	Validacija HPLC analizne metode	8
1.2.1	Specifičnost in selektivnost metode	11
1.2.2	Linearnost in delovno območje metode	12
1.2.3	Točnost (Accuracy)	14
1.2.4	Natančnost (Precision).....	15
1.2.5	Meja zaznavnosti	16
1.2.6	Meja določljivosti.....	17
1.2.7	Robustnost metode	18
1.2.8	Zaporedje validacijskih preizkusov	19
1.2.9	Validacijsko poročilo.....	21
1.3	Vrednotenje analitske metode	22
1.3.1	Osnovni statistični pojmi	22
1.3.2	Napake pri meritvah	24
1.3.3	Statistični testi	24
1.4	Stabilnost	32
1.4.1	Ovojnina	32
1.4.2	Preizkusi stabilnosti farmacevtskega izdelka	33
1.4.3	Pogostost preizkušanja	36
1.4.4	Pogoji shranjevanja	36
1.4.5	Nadaljevanje testiranja stabilnosti	38
1.4.6	Ocena – evalvacija.....	39
1.4.7	Označevanje embalaže farmacevtskega izdelka.....	39
1.5	Regulatorne zahteve za rastlinske pripravke	40
1.5.1	Razvrstitev pegastega badlja	40
1.5.2	EMA	41
1.5.3	Tradicionalno zdravilo rastlinskega izvora.....	41
1.5.4	Registracijske zahteve za farm. oblike rastlinskega izvora	42
1.5.5	Prehransko dopolnilo	50
1.5.6	Galenski izdelek	51
2.	NAMEN DELA	53
3.	EKSPERIMENTALNO DELO	54
3.1	Materiali in metode.....	54
3.1.1	Kemikalije	54
3.1.2	Instrumentalna oprema za izvajanje stabilnostnih študij	55
3.1.3	Postopki priprave mobilnih faz in vzorcev	56
3.2	Kromatografski pogoji končne optimizirane metode	58
3.3	Pogoji za izvajanje stabilnostne študije	59
3.3.1	Postopki izvedbe stabilnostne študije	60
4.	REZULTATI IN RAZPRAVA	60
4.1	Razvoj analizne metode.....	60
4.2	Validacija.....	63

4.2.1	Meritve standardnih raztopin in vzorcev	63
4.2.2	Specifičnost	73
4.2.3	Linearnost in delovno območje metode	73
4.2.4	Točnost	75
4.2.5	Natančnost	76
4.2.6	Statistična obdelava podatkov	81
4.2.7	Izračun koncentracije silibinina v tabletah	84
4.3	Stabilnost	85
4.3.1	Rezultati dolgoročne študije stabilnosti.....	85
4.3.2	Rezultati pospešene študije stabilnosti	86
5.	SKLEP	87
6.	Literatura	89

1. UVOD

1.1 Pegasti badelj

1.1.1 Predstavitev in zgodovinski aspekt

Pegasti badelj (*Silybum marianum* L. Gaertner) spada v družino nebinovk (Asteraceae). Rod *Silybum* obsega dve vrsti, ki rasteta samoniklo v Sredozemlju in Prednji Aziji: *S. marianum* (L.) Gaertn. (slika 1) in *S. eburneum* Cosson et Durien.

Pegasti badelj je osatu podobno zelišče. Ima vretenasto korenino iz katere požene do poldruga metra enostavno ali razraslo pajčevinasto dlakavo steblo. Listi so pri dnu v močni rozeti in po stebelu spiralasto razvrščeni. Listna ploskev je bleščeče zelena, srebrnkasto belo marmorirana, gola ali ob žilah rahlo dlakava, podolgovato ovalna, s štirimi trikotnimi bodičastimi krpami. Cveti od junija do avgusta.

Pri nas v Primorju gojijo pegasti badelj tudi kot okrasno rastlino. Za pegasti badelj je značilno socvetje rožnato vijolične barve in bodeči listi z značilnimi belkasto obarvanimi žilami. V zdravilstvu suvereno nastopa že skoraj 2000 let.

Že v šestnajstem stoletju so ugotovili, da uporaba pripravkov iz pegastega badlja ugodno vpliva na jetra. Danes kot drogo za izdelavo zdravilnih pripravkov uporabljamo plod pegastega badlja (*Sylibi fructus*), ki mu odstranimo kodeljico (papus). Plod je dolg med 6 in 7 mm in širok 3 mm. Ima svetlečo, črnorjavo do sivkasto semensko ovojnico. Vonj sveže zmletih semen spominja na vonj kakava. Plod vsebuje zmes učinkovin flavolignanov, ki jo imenujemo, izpeljano iz latinskega imena rastline, silimarin. Silimarin je sestavljen iz štirih podobnih učinkovin, silibinina, isosilibinina, silidianina in silikristina. Poleg teh učinkovin, ki jih je od 2 do 3 %, plod vsebuje še od 15 do 30 % maščobnega olja in 20 do 30 % beljakovin. Največja koncentracija silimarina je prav v beljakovinski plasti semenske ovojnice. Zelo pomembna lastnost učinkovin v plodu pegastega badlja je ta, da tudi pri velikem predoziranju ne povzročajo neželenih učinkov, razen blagih prebavnih motenj.

Pegasti badelj je ena redkih zdravilnih rastlin ki jih lahko uporabljamo za lajšanje težav pri boleznih jeter. Flavonoidi, kamor spadajo tudi flavolignani, so učinkovine v plodu pegastega badlja in v rastlinah opravljajo tudi varovalno vlogo. Kot antioksidanti jih varujejo pred radikali katerih nastanek povzročijo ultravijolični žarki (1).

Silimarín je najbolj priporočljivo uživati v obliki tablet ali kapsul, ki vsebujejo ekstrakt iz plodu pegastega badlja. Takšen pripravek izdelujejo tudi v Mariborskih lekarnah. Čaj je manj učinkovit od takšnega pripravka. Plodove pegastega badlja lahko dobro zmeljemo (uprašimo) in prašek uživamo z jogurtom.

Bolnikom so v kliničnih raziskavah dajali tudi po 800 mg silimarina dnevno, več tednov, brez neželenih učinkov. Priporočajo pa, da se uživajo pripravki, ki so pripravljene le iz pegastega badlja in ne vsebujejo drugih izvlečkov (5).

Uživanje silimarina se odsvetuje pri malignih boleznih jeter (tumorjih na jetrih), ker podatkov o takšnih raziskavah ali učinkih v literaturi ni. Pri jemanju silimarina oziroma pripravkov iz pegastega badlja se je potrebno posvetovati z zdravnikom, saj je zdravljenje potrebno spremljati z ustreznimi preiskavami delovanja jeter (4).



Slika 1: Pegasti badelj

1.1.2 Mehanizmi delovanja silimarina

Že pred štiridesetimi leti so s poskusi na živalih ugotovili, da pripravki iz pegastega badlja, ki so jih preventivno dajali podganam, preprečujejo učinke jetrom škodljivih snovi, kot so ogljikov tetraklorid, galaktozamin in tioacetamid. Ugotovili so tudi, da so z dajanjem takih pripravkov preprečili neželene učinke nekaterih zdravil na jetra. Leta 1980 pa so ugotovili, da silimarin ne učinkuje le preventivno, temveč tudi pospešuje obnovo jetrnih celic in zdravljenje jeter po poškodbah zaradi virusov in strupenih snovi. Danes so z veliko verjetnostjo ugotovljeni učinki silimarina na jetra:

- antioksidativni učinek,
- stabilizacija membrane jetrnih celic in preprečevanje vstopa strupenih snovi v celico,
- pospeševanje sinteze beljakovin v jetrnih celicah in pomoč pri obnovi poškodovanih celic,
- preprečevanje pretvorbe zvezdastih hepatocitov v cirotične celice.

1. Antioksidativni učinek

Flavonoidi lovijo radikale in preprečujejo poškodbe jetrnih celic zaradi snovi, ki pri presnovi v jetrih povzročajo nastanek radikalov. Takšen primer so klorirani ogljikovodiki (ogljikov tetraklorid, trikloroetilen, diklorometan), s katerimi se pogosto srečamo v kemičnih čistilnicah in v industriji barv in lakov. Silimarin naj bi tudi ščitil jetrne celice v primeru tako imenovanega oksidativnega stresa, stanja, pri katerem pride do močno povečanega nastanka kisikovih radikalov. Med snovmi, ki tak stres povzročijo, so poleg že omenjenih kloriranih ogljikovodikov še alkohol in zelo znan in uporabljan analgetik in antipiretik paracetamol. Paracetamol je učinkovito in varno zdravilo, ki ga vsak dan uporabljamo za lajšanje različnih bolečin in za zniževanje povišane telesne temperature, pri veliki prekoračitvi odmerka pa lahko povzroči poškodbo jeter.

2. Silimarin stabilizira membrano jetrnih celic in preprečuje vstop strupenih snovi v celico

Tu so bile najbolj zanimive raziskave na poskusnih živalih, kjer so ugotovili, da silimarin prepreči vstop smrtno nevarnih proteinov iz zelene mušnice (amanitin, faloidin) v jetrne

celice in njihov strupeni učinek. Zaščitni učinek pa je močno odvisen od časa dajanja. Najboljši je bil, če so silimarini dali poskusnim živalim pred zaužitjem zelene mušnice, kar seveda v praksi ni mogoče. Učinkovitost po že zaužitju zeleni mušnici pa je bila močno odvisna od časa, v katerem so dali še silimarini in od načina dajanja. Rezultati teh poskusov so zelo pomembni tudi za ljudi, saj so zastrupitve z zeleno mušnico pogoste. Upoštevati moramo, da poleg zelene mušnice tudi nekatere druge vrste gob vsebujejo podobne strupe, na primer kučmice (*Galerina*) in nekateri dežnički (*Lepiota*). Zelena mušnica povzroča hude zastrupitve že od nekdaj in je nevarna in aktualna še danes. Intravensko dajanje pripravkov iz silimarina je običajna praksa poleg drugih ukrepov pri zastrupitvi z zeleno mušnico ali drugimi glivami, ki povzročijo faloidinski sindrom. Faloidinski sindrom je ena od oblik zastrupitve z glivami (npr.: orelaninski, giromitrinski, paksilinski), ki povzročijo v 90 % smrt. Tu je še posebno pomembno, da takšen pripravek damo čimprej. Izida takšnega zdravljenja žal ne moremo napovedati, po dosedanjih izkušnjah in nekaterih retrospektivnih raziskavah pa je dajanje silimarina oziroma silibinina v obliki infuzije smiselno. Znaki zastrupitve z amanitinom oziroma faloidinom nastopijo šele 6 do 24 ur po zaužitju strupene glive. Takrat se pojavi bolečina v trebušnem predelu, hudo bruhanje, driska in vročina. Posledično se pojavijo dehidracija in izguba elektrolitov, tudi kri v urinu in v blatu. Po dnevu ali dveh ti gastrointestinalni znaki nekoliko izvenijo, pojavi se navidezno izboljšanje. Potem pa se nenadoma pojavijo znaki hude poškodbe jeter in ledvic, ki vodijo v komo in smrt. Zastrupitev zdravijo s pomočjo penicilina in dajanjem silibinina, glavne sestavine zmesi silimarina. Po dostopnih podatkih naj bi se smrtnost pri zastrupitvi z zeleno mušnico po uvedbi zdravljenja s silibininom zmanjšala. Silimarini oziroma silibinini naj bi bil uporabljen tudi pri zdravljenju oziroma zaščiti jetrnih celic pri jemanju nekaterih zdravil, zlasti tuberkulostatikov, vendar so na voljo zgolj podatki iz posameznih primerov, ne pa kontrolirane raziskave.

3. Silimarini pospešuje sintezo beljakovin v jetrnih celicah in pripomore k obnovi poškodovanih celic

Domnevajo, da naj bi bil ta učinek pomemben pri zdravljenju poškodb jeter zaradi nekaterih strupov. Raziskovali so tudi vpliv silimarina na okrevanje po boleznih jeter, kot je virusni hepatitis. Empirične izkušnje so pozitivne in zdravniki svetujejo jemanje silimarina pri okrevanju po prebolelem virusnem hepatitisu. V našem okolju, ki je naklonjeno uživanju alkohola, so pogosta tudi obolenja jeter, ki jih povzroči kronično

uživanje alkohola. Tudi pri teh bolnikih so izvedli nekaj dvojno slepih in skrbno kontroliranih raziskav, precej raziskav pa je bilo manj skrbno nadzorovanih. Ugotovili so, da je jemanje silimarina v primerjavi s placebom izboljšalo nekatere dejavnike, kot so vrednosti jetrnih encimov v krvi, ki so v primeru takšne jetrne bolezni povečane. Izboljšanje je bilo vidno tudi pri histološkem pregledu jetrnega tkiva. Pri drugih raziskavah, kjer so opazovali tudi subjektivne znake, je bilo izboljšanje po jemanju silimarina opazno. Končna posledica kroničnega uživanja alkohola je jetrna ciroza, kar pomeni, da v jetrnih celicah začne nastajati vezivno tkivo. Funkcionalna sposobnost jeter se tako zmanjšuje, dokler ne odpovedo. Ugotovili so, da so bili rezultati pri jemanju silimarina pri jetrni bolezni zaradi alkohola slabi, če so bolniki še vedno nadaljevali z uživanjem alkohola. Tu je zato zelo pomembno poudariti, da jemanje silimarina ni smiselno, če bolnik še vedno uživa alkohol. Izboljšanja ne bo. Pogosto so bili rezultati raziskav slabi tudi zato, ker je bilo alkoholike težko prepričati, da so redno jemali silimarin. Zgodilo se je tudi, da so imeli še virusni hepatitis, ki je dodatno prizadel jetra ali pa, da so jemali prenizke odmerke silimarina oziroma, da so silimarin jemali prekratek čas. Načeloma za zdravljenje s pripravki iz pegastega badlja velja, da jih je potrebno jemati v ustreznem odmerku. V začetku zdravljenja se priporoča med 420 in 450 mg silimarina dnevno, v preventivi in kot vzdrževalni odmerek pa med 200 in 250 mg silimarina dnevno. Preventivno jemanje je potrebno na primer ves čas izpostavljenosti za jetra strupenim snovem, če pa silimarin uporabljamo kot dopolnilno zdravilo pri okrevanju po boleznih jeter ali zastrupitvah, pa jemanje lahko traja nekaj mesecev ali celo let. V eni izmed kliničnih raziskav so bolniki s cirozo jeter jemali silimarin štiri leta. Jemanje silimarina pri cirozi je utemeljeno in tu lahko zapišemo tudi učinek silimarina, da preprečuje pretvorbo zvezdastih hepatocitov v cirotične celice.

4. Silimarin preprečuje pretvorbo zvezdastih hepatocitov v cirotične celice

Nekateri avtorji so mnenja, da jemanje silimarina pri cirozi vpliva tudi na zmanjšanje smrtnosti, vsekakor pa je priporočljivo, ker privede do izboljšanja merljivih dejavnikov (vrednosti jetrnih encimov, velikosti jeter, lastnosti jetrnega tkiva) ter kakovosti življenja bolnikov (2, 3).

1.1.3 Kemija silimarina

Silimarin ekstrahirajo iz posušenih semen, v katerih se dokazano zadržuje največji odstotek silimarina glede na druge dele rastline (3, 7).

Pegasti badelj pred letom 1950 ni bil deležen večje pozornosti raziskovalcev. V rastlini so poleg lipidov, proteinov, sladkorjev in grenkih spojin našli tudi histamin in tiramin. V plodovih so odkrili alkaloide, saponine, mukolitične snovi, smole, organske kisline ter vitamina C in K. V hidrolizatu mukolitičnih snovi so ugotovili ramnozo, ksilozo, glukozo in galakturonsko kislino.

Leta 1952 so v plodovih pegastega badlja odkrili derivate flavona (Schindler 1952, Herzog 1954). Raziskave so pokazale, da to niso niti hidroksilni derivati flavona, ki so v naravi dokaj razširjeni, niti flavonoidi, ampak povsem nove flavonske spojine, ki jih dotlej še niso poznali. Novost je vzpodbudila raziskovalce k izolaciji in identifikaciji sestavine pegastega badlja. Domnevali so, da so prav derivati flavona nosilci antihepatotoksičnega delovanja. Raziskave so kmalu dale rezultate. Iz acetonskega izvlečka razmaščenih plodov so s kolonsko kromatografijo izolirali štiri spojine flavonskega porekla (Neu 1960). Skoraj istočasno so iz plodov izolirali dve fenolni spojini, ki so ju označili kot spojini E₅ in E₆ (Janiak 1960). Na osnovi njunih spektralnih značilnosti so menili, da sta spojini flavona, verjetno derivata 3-hidroksiflavona.

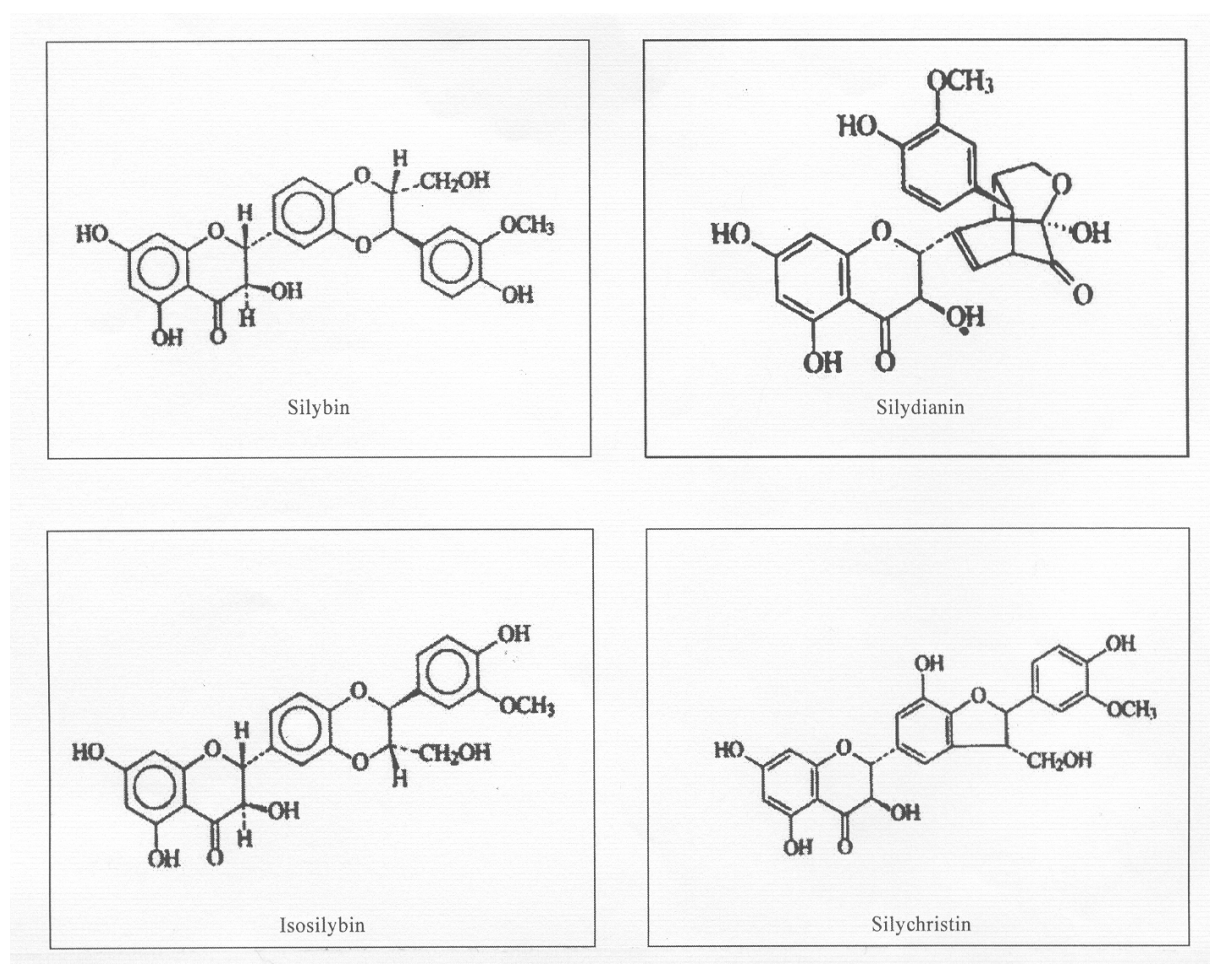
Najpomembnejša razjasnitev kemije učinkovin izhaja iz leta 1965, ko so iz etilacetatnega izvlečka razmaščenih plodov izolirali kromatografsko homogeno spojino, za katero so ugotovili, da je identična z že omenjeno spojino E₆. To novo skupino naravnih učinkovin so imenovali flavonolignani. Drugo začetno ime teh učinkovin je bilo silimarin, pozneje pa so predlagali novo ime, silibin (Wagner 1974). Z imenom silimarin pa so zajeli vso skupino antihepatotoksičnih učinkovin pegastega badlja. Novejša literatura je glavno sestavino silimarina, silibin, preimenovala v silibinin (Hansel 1983). Kemično zgradbo silibinina so precej težko določili. Dokončno zgradbo silibinina so določili z jedrsko magnetno resonanco in masno spektroskopijo (Pelter 1968). To zgradbo silibinina so kasneje večkrat potrdili. Silibinin je prvi predstavnik do tedaj še neznane skupine naravnih bioloških učinkovin, imenovanih tudi flavonolignani (slika 2). Danes flavonolignane uvrščamo med flavonoide v širšem smislu, kamor npr. spadajo tudi izoflavonoidi in neoflavonoidi. Flavonoide v ožjem smislu predstavljajo flavoni, flavonoli, njihovi

dihidrogen derivati, njihovi dimeri, auron in halkoni. Flavonoidi so zelo razširjeni rastlinski pigmenti, ki ščitijo rastline pred poškodbami celic in tkiv z UV žarki.

V plodovih pegastega badlja je poleg silibinina tudi isosilibinin. Silibinin in isosilibinin sta diastereoizomera in imata enako razporeditev substituentov na ogljikovih atomih na mestih 2 in 3, toda zamenjani razporeditvi na ogljikovih atomih na mestih 2' in 3'.

Naslednji predstavnik flavonolignanov je silidianin, ki je izomeren silibininu in je identičen s spojino E₅, ki so jo izolirali že 10 let prej.

Silikristin je tretji flavonolignan in je stereoizomer dveh že omenjenih flavonolignanov (6).



Slika 2: Strukture izomerov flavonolignanov silimarina (3)

1.2 Validacija HPLC analizne metode

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) je zelo uporabna metoda za kontrolo kakovosti farmacevtskih izdelkov ter za preizkušanje njihove stabilnosti. HPLC metoda je zelo uporabna predvsem zaradi zmogljivosti ločevanja različnih učinkovin ter ponovljivosti dobljenih meritev.

Validacije HPLC metode ne moremo ločiti od razvoja nove metode za določen namen. Razvoj in validacija sta medsebojno tesno povezana procesa. Prvi korak pri razvoju in validaciji nove metode je določitev minimalnih kriterijev, katerim mora metoda zadostiti (8, 20).

Pri izvajanju validacijskih preizkusov so nam v pomoč številne mednarodne smernice, ki natančno definirajo parametre in metodologijo preizkusov s katerimi ovrednotimo posamezne parametre. Najbolj poznana smernica je smernica Mednarodne konference o harmonizaciji (ICH), ki definira osem validacijskih parametrov za analizne metode (9). Mednarodna konferenca za harmonizacijo ICH (International Conference on Harmonization), ki združuje regulatorne organe iz Evrope, Japonske in ZDA, je pripravila podrobno smernico Validation of Analytical procedures: Text and Methodology, ki služi kot smernica pri validaciji analiznih metod v omenjenih treh regijah. Smernica navaja štiri skupine najpogostejše uporabljenih analiznih postopkov, ki jih je potrebno validirati:

- identifikacija,
- kvantitativno določevanje vsebnosti nečistoč,
- limitni test za kontrolo nečistoč,
- kvantitativno določevanje vsebnosti učinkovin.

V smernici je podrobno definiranih tudi vseh osem parametrov validacije: specifičnost, natančnost, točnost, meja zaznavnosti, meja določljivosti, linearnost, delovno območje in robustnost. Za vsak parameter je v smernici podrobno opisana metodologija, kako izvedemo in izračunamo ustrezne parametre, ki jih je potrebno predložiti pri registracijski dokumentaciji:

- **Specifičnost metode** – zmožnost metode, da lahko nedvoumno loči posamezne učinkovine v prisotnosti drugih komponent. Te tipično predstavljajo nečistote, razpadne produkte in spojine iz nosilca farmacevtske oblike.

- **Linearnost metode** – zmožnost metode, da v določenem območju daje rezultate, ki so linearno odvisni od koncentracije oz. vsebnosti iskane učinkovine v vzorcu.
- **Delovno območje** – je koncentracijsko območje, znotraj katerega nam metoda zagotavlja točne in natančne podatke.
- **Točnost** – je merilo, kako se rezultati pridobljeni z analizno metodo skladajo z dejanskimi vrednostmi.
- **Natančnost** – je merilo, kako skladni so posamezni rezultati.
- **Meja zaznavnosti** – je najmanjša koncentracija učinkovine, ki jo lahko z našo metodo zaznamo, vendar ne nujno tudi kvantificiramo.
- **Meja določljivosti** – je najmanjša koncentracija učinkovine, ki zagotavlja dovolj visok signal, da ga lahko kvantificiramo z ustrezno natančnostjo.
- **Robustnost metode** – je preizkus, kako sprememba različnih parametrov analize vpliva na končne rezultate. Pri HPLC metodi so ti parametri: sestava in pH mobilne faze, različni dobavitelji kolone, temperatura kolone, pretok mobilne faze, volumen injiciranja, valovna dolžina detekcije.

V preglednici 1 je navedeno katere od parametrov je potrebno ovrednotiti za določene analizne postopke.

Preglednica 1: Parametri validacije pri določenih vrstah analiznih postopkov

Parameter	Identifikacija	Test za nečistote		Kvantitativno določanje vsebnosti
		Kvantitativno	Limitni test	
Specifičnost	+	+	+	+
Linearnost	-	+	-	+
Delovno območje	-	+	-	+
Točnost	-	+	-	+
Natančnost				
– ponovljivost	-	+	-	+
– vmesna natančnost	-	+	-	+
Meja zaznavnosti	-	-	+	-
Meja določljivosti	-	+	-	-

Chandran in Singh sta v svojem članku natančneje opisala razlike za posamezne parametre validacije, ki jih predpisujejo različne mednarodne smernice, kot so ICH, FDA, USP in IUPAC. Zelo podrobno sta pregledala posamezne definicije parametrov, metodologijo in posamezne izračune, ter kriterije sprejemljivosti, ki jih predpisujejo omenjene smernice (16).

FDA je pripravila smernico za pošiljanje vzorcev in analiznih podatkov za validacijo analiznih metod (10, 11, 12). Prav tako pa najdemo smernice o validaciji v ameriški farmakopeji (USP) (13, 48).

Razvoj in validacija analizne metode sta ključnega pomena pri razvoju novih farmacevtskih izdelkov. Analizne metode so nujne pri kontroli stabilnosti farmacevtskih izdelkov in kontroli kakovosti izdelkov pred sprostitvijo na trg. Z validacijo analiznih metod zagotavljamo, da so metode uporabne za predvideno uporabo (14, 21). Priprava in izvedba validacije HPLC metode mora natančno slediti validacijskemu protokolu, v katerem mora biti točno definiran potek validacije, korak za korakom (15, 22).

Validacijski protokol:

1. Določimo namen uporabe HPLC metode.
2. Določimo parametre analize in minimalne kriterije sprejemljivosti.
3. Določimo validacijske preizkuse.
4. Preverimo pomembne karakteristike aparatur (šum detektorja, ...).
5. Preverimo kvaliteto materialov, čistost standardov in kemikalij.
6. Izvedemo predvalidacijske preizkuse.
7. Prilagodimo parametre analize ali minimalne kriterije sprejemljivosti.
8. Izvedemo popolno validacijo.
9. Napišemo SOP za prenos metode v rutinsko uporabo.
10. Določimo kriterije za revalidacijo.
11. Določimo kriterije in pogostost izvajanja testa ustreznosti sistema (System suitability test), vključno s predlogi kaj storiti v primeru če kriterijem ne zadostimo.
12. Validacijske preizkuse dokumentiramo in pripravimo validacijsko poročilo.

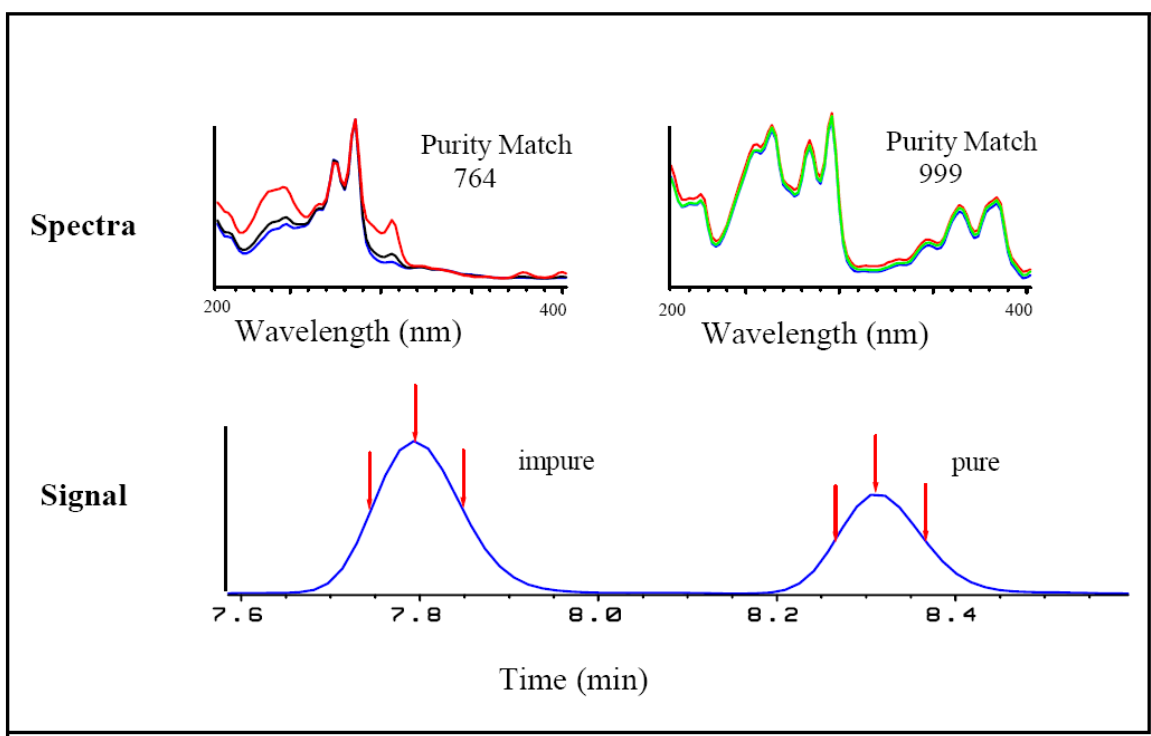
1.2.1 Specifičnost in selektivnost metode

Izraza specifičen in selektiven se pogosto zamenjujeta. Vessmann je oba pojma opisal v natančni diskusiji (17). Izraz specifičen se nanaša na metodo, ki daje odziv samo za en analit, selektiven pa na metodo, ki daje odziv za več analitov, ki jih lahko ali ne moremo med seboj razlikovati. Če odzive lahko med seboj razlikujemo, lahko rečemo, da je metoda selektivna. Sama definicija se od smernice do smernice nekoliko razlikuje, vendar je v splošnem zelo podobna. Specifičnost metode smernice definirajo kot sposobnost metode, da točno in natančno izmeri signal določenega analita ob prisotnosti vseh komponent iz realnega vzorca (16). Zelo podobne definicije se poslužuje tudi ICH smernica, ki definira specifičnost metode kot zmožnost, da metoda lahko nedvoumno loči posamezen analit v prisotnosti drugih komponent. Te tipično predstavljajo nečistote, razpadne produkte in spojine iz nosilca farmacevtske oblike (9).

Različne smernice pa uporabljajo tudi različne pristope pri ugotavljanju in dokazovanju specifičnosti oziroma selektivnosti metode. Tako ICH smernica in ameriška farmakopeja predpisujeta objavo tipičnega kromatograma, pri čemer lahko za dokazovanje čistote vrhov uporabimo »peak purity« test. Po smernici IUPAC pa zadošča že izračun indeksa selektivnosti (16).

Specifičnost oziroma selektivnost metode je nujna za natančno določitev vsebnosti učinkovin v farmacevtski obliki, vendar jo je pogosto zelo težko zagotoviti in dokazati. Najenostavneje jo dokažemo s primerjavo kromatograma realnega vzorca s kromatogramom slepega vzorca, vzorca brez iskanega analita. Vzorec je potrebno izpostaviti tudi stresnim pogojem, da zagotovimo selektivnost tudi ob prisotnosti potencialnih razpadnih produktov. Pogosto je zelo težko pridobiti vse uporabljene sestavine za izdelavo farmacevtske oblike in vse potencialne razpadne produkte in nečistote, s katerimi bi lahko pripravili ustrezen slepi vzorec. V takšnem primeru lahko uporabimo primerjavo naše metode z neko drugo že uveljavljeno in ovrednoteno metodo (najpogosteje so te metode opisane v farmakopejah). Čistoto posameznih vrhov v kromatografskih metodah lahko pri sodobnih kromatografskih sistemih opremljenih z diode array detektorjem ali masnim detektorjem, potrdimo tudi s »peak purity« testom. Oba detektorja tekom celotne analize zajemata ves spekter. Posnete spektre znotraj posameznega vrha normaliziramo in prekrijemo za grafično ponazoritev čistote vrha (slika 3). V kolikor se spektri med seboj ujemajo, lahko z veliko verjetnostjo trdimo, da

posamezen vrh predstavlja samo ena spojina, če pa se spektri preveč razlikujejo, predstavljata naš vrh vsaj dve spojini (14).

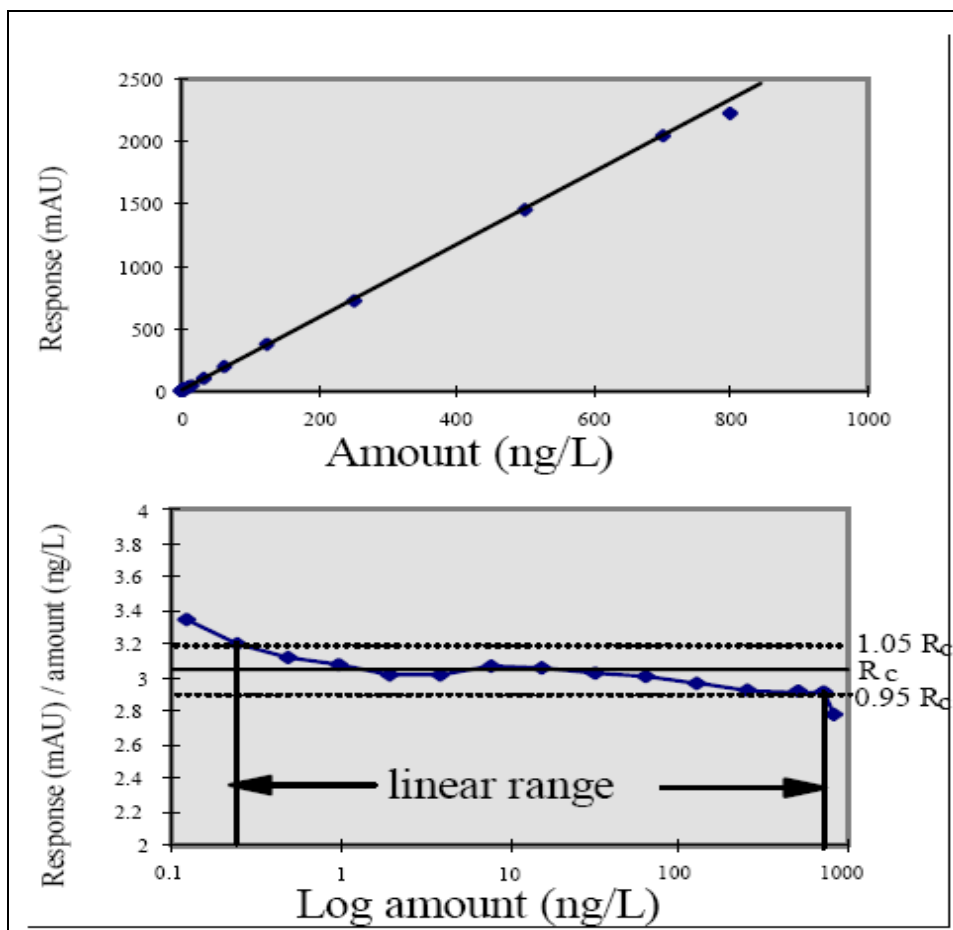


Slika 3: Določitev čistote vrha s pomočjo »peak purity« testu, z diode array detektorjem (14).

1.2.2 Linearnost in delovno območje metode

Linearnost analizne metode nam predstavlja zmožnost metode, da v določenem območju daje rezultate, ki so linearno odvisni od koncentracije oziroma vsebnosti iskanega analita v vzorcu. Določimo jo na seriji petih standardov različnih koncentracij, pri čemer je potrebno za vsak standard izvesti tri do šest meritev. Standarde lahko pripravimo z redčenjem začetne raztopine ali pa jih pripravimo z natehtanjem ustrezne količine standarda. Odziv detektorja mora biti odvisen od koncentracije analita direktno ali pa preko jasno definirane matematične operacije (14). Linearnost metode lahko ovrednotimo vizualno iz grafa, na katerega nanašamo signal v odvisnosti od koncentracije analita, kakor tudi potrdimo z regresijskimi parametri. Izračunamo parametre linearne regresije in podamo rezultate, kateri morajo zajemati korelacijski koeficient (r), odsek na y osi, naklon regresijske premice, vsota kvadriranih odklonov. Enačba premice linearne regresije mora sekati y os v

bližini koordinatnega izhodišča. Rezultatom moramo priložiti tudi ustrezne grafe (14). Ker je vizualno pogosto težko opaziti odstopanja posameznih točk od premice linearne regresije, lahko kot pomoč uporabimo še dve dodatni grafični metodi. Pri prvi metodi na graf narišemo rezidualne posameznih točk od premice linearne regresije v odvisnosti od koncentracije. V linearnem območju morajo biti točke enakomerno porazdeljene okoli vrednosti nič.



Slika 4: Grafična določitev delovnega območja metode (14).

Drugi način je, da delimo signal določene koncentracije s pripadajočo koncentracijo in s tem izračunamo relativni odziv detektorja. Na grafu relativnega odziva detektorja v odvisnosti od logaritma koncentracije, moramo dobiti vodoravno črto v območju linearnosti naše metode (slika 4). V višjih koncentracijskih območjih bomo opazili odklon od premice. Zaradi tega moramo območje uporabnosti metode zožati. Delovno območje metode je koncentracijsko območje znotraj katerega nam metoda zagotavlja točne in

natančne rezultate. ICH smernica predpisuje minimalna delovna območja za različne namene (9).

- Metode za določanje vsebnosti analitov v farmacevtskih izdelkih: od 80 do 120 % pričakovane vsebnosti.
- Metode za določevanje enakomernosti vsebnosti: vsaj 70 do 130 % pričakovane vsebnosti.
- Za določanje nečistot mora delovno območje obsegati koncentracije od nivoja poročanja do 120 %. Nivo poročanja (reporting threshold) je meja, nad katero moramo nečistoto določiti oziroma poročati (sinonim je reporting level). Zahteve za nečistote so podane v specifičnih posameznih monografijah in v splošni monografiji Substances for Pharmaceutical Use (2034). Specifične monografije in splošna monografija so komplementarne. Specifična monografija predpisuje kriterije sprejemljivosti (acceptance criteria) za nečistote, splošna monografija pa opredeljuje potrebo po kvalifikaciji, identifikaciji in poročanju (reporting) katerekoli organske nečistote, ki se pojavi v zdravilni učinkovini.

1.2.3 Točnost (Accuracy)

Točnost analizne metode je merilo, kako se rezultati pridobljeni z analizno metodo skladajo z dejanskimi vrednostmi. Po ICH smernici lahko točnost analizne metode pri analizi farmacevtskih izdelkov ocenimo na več načinov (9):

- Analiziramo sintetično placebo mešanico sestavin farmacevtskega izdelka, kateri dodamo znano količino učinkovine.
- Kadar ni mogoče pridobiti vseh sestavin farmacevtskega izdelka, lahko točnost dokažemo z dodatkom znane količine učinkovine farmacevtskemu izdelku ali s primerjavo rezultatov nove metode z drugo dobro definirano metodo, za katero so poznane karakteristike (metode v farmakopejah).
- Točnost lahko privzamemo, v kolikor smo dokazali, da je metoda specifična, linearna in natančna v delovnem območju. Točnost analizne metode je potrebno dokazati v

Preglednica 2: Primer podatkov in izračunov pri preizkusu točnosti metode (18)

Željena koncentracija (%)	Dodana koncentracija (mg/ml)	Izmerjena koncentracija (mg/ml)	Razmerje (%)
50	0,50	0,49	98,0
75	0,75	0,74	98,7
100	1,00	1,03	103,0
125	1,25	1,24	99,2
150	1,50	1,48	98,7
Povprečen izkoristek	99,52 %		
Standardna deviacija	1,99 mg/ml		
RSD %	2,00 %		

1.2.4 Natančnost (Precision)

Tekom validacije je potrebno dokazati tudi natančnost meritev. Z natančnostjo ocenimo, kako skladni so posamezni rezultati. Podajamo jo kot standardno deviacijo (SD) ali relativno standardno deviacijo (RSD%). ICH loči tri vrste merjenja in podajanja natančnosti:

- Ponovljivost (Repeatability)

Ponovljivost metode je podana kot natančnost znotraj kratkega časovnega obdobja, pri čemer mora en sam analitik opraviti vse preizkuse znotraj enega laboratorija. Ponovljivost moramo določiti z vsaj 9 meritvami znotraj delovnega območja (npr. 3 koncentracije / 3 ponovitve) ali z vsaj 6 meritvami pri 100% pričakovane koncentracije analita (9). Izračunati je potrebno standardno deviacijo in interval zaupanja za pridobljene podatke. Kriterij sprejemljivosti je zelo odvisen od vrste analizne metode. Pri določanju vsebnosti

učinkovine s HPLC metodami v farmacevtskih izdelkih pogosto zahtevamo ponovljivost nižjo od 2 % (14).

- Vmesna natančnost (Intermediate precision)

Vmesno natančnost največkrat opredelimo z meddnevno ponovljivostjo. ICH smernica jo definira kot dolgoročno natančnost izmerjenih rezultatov. Namen preiskave je, da bo metoda zagotavljala enake in ponovljive rezultate znotraj istega laboratorija tudi po končanem razvoju metode. Pri tem je potrebno preizkusiti ponovljivost metode in vpliv različnih analitikov tekom več zaporednih dni.

- Obnovljivost (Reproducibility)

Obnovljivost se nanaša na natančnost metode v različnih laboratorijih na različni opremi. Preizkus obnovljivosti je potrebno opraviti, v kolikor želimo metodo standardizirati in objaviti (npr. v farmakopeji). Ta se zlasti določa v fazi razvoja metode (menjava kolon, temperature...).

1.2.5 Meja zaznavnosti

Meja zaznavnosti je najmanjša koncentracija analita, ki jo lahko z našo metodo zaznamo, vendar ne nujno tudi kvantificiramo. Pri HPLC metodah je meja zaznavnosti koncentracija analita, ki daje vsaj 2 do 3 krat večji signal kot je povprečen šum detektorja na bazni liniji kromatograma. Mejo zaznavnosti lahko določimo na več načinov (9):

- Vizualna ocena (Based on visual evaluation)

Mejo zaznavnosti lahko ocenimo vizualno iz kromatogramov analiz vzorcev pri mejni koncentraciji analita. V takšnem primeru je potrebno končnemu validacijskemu poročilu dodati ustrezne kromatograme, na podlagi katerih je bila meja zaznavnosti ocenjena.

- Ocena na podlagi razmerja signal / šum (Based on Signal to Noise)

Mejo zaznavnosti lahko ocenimo s primerjavo signalov analita pri nizkih koncentracijah, s signalom praznega vzorca in tako določimo minimalno koncentracijo, pri kateri lahko analit še z gotovostjo zaznamo. Za mejo zaznavnosti zadostuje razmerje med signalom in šumom na bazni liniji 2 do 3 : 1.

- Ocena na podlagi standardne deviacije odziva detektorja pri merjenju slepega vzorca in naklona umeritvene premice (Based on the standard deviation of the response and the slope)

Limito detekcije lahko izračunamo s pomočjo enačbe:

$$\text{LOD} = 3,3 \cdot \sigma / S \quad (1.1)$$

pri čemer je S naklon umeritvene premice, σ pa standardna deviacija odziva detektorja pri merjenju slepega vzorca.

1.2.6 Meja določljivosti

Mejo določljivosti pri HPLC metodah predstavlja koncentracija analita, ki zagotavlja višino vrhov vsaj 10 do 20 krat višje od šuma bazne linije. Podobno kot mejo zaznavnosti, lahko tudi mejo določljivosti določimo na več načinov:

- Vizualna ocenitev (Based on visual evaluation)

Limito določljivosti lahko ocenimo vizualno iz kromatogramov analiz vzorcev pri pričakovani meji določljivosti. Enako kot pri meji zaznavnosti moramo v končno validacijsko poročilo priložiti ustrezne kromatograme, iz katerih smo ocenili mejo določljivosti.

- Ocena na podlagi razmerja signal/šum (Based on Signal to Noise)

Na podlagi primerjave signala pri pričakovani meji določljivosti s signalom praznega vzorca lahko določimo minimalno koncentracijo, pri kateri lahko analit še z dovolj veliko natančnostjo kvantificiramo. Razmerje signal/šum za mejo določljivosti mora znašati vsaj 10:1.

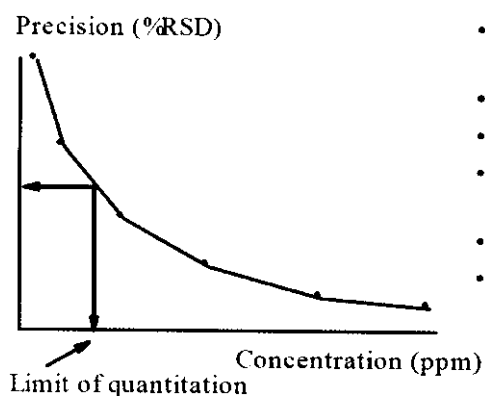
- Ocena na podlagi standardne deviacije odziva detektorja pri merjenju slepega vzorca in naklona umeritvene premice (Based on the standard deviation of the response and the slope).

Limito določljivosti lahko izračunamo tudi s pomočjo enačbe 1.2.

$$LOQ = 10 \cdot \sigma / S, \quad (1.2)$$

pri čemer sta S in σ enaka kot pri meji zaznavnosti.

V kolikor smo dokazali ustrezno ponovljivost metode tudi pri nizkih koncentracijah analita, lahko za določitev limite določljivosti uporabimo tudi EURACHEM način (glej Slika 5). Analizirati moramo serijo vzorcev s padajočimi koncentracijami analita in vsakega analizirati vsaj 6 krat. Grafično prikažemo odvisnost relativne standardne deviacije (RSD%) od koncentracije analita. Za limito določljivosti tako izberemo koncentracijo, ki zagotavlja želeno ponovljivost meritev (RSD%) (14).



Slika 5: Grafična določitev meje določljivosti.

1.2.7 Robustnost metode

Robustnost metode je potrebno preizkusiti že tekom razvoja in optimizacije same metode. Namen preizkusa je ugotoviti, kako sprememba različnih parametrov analize vpliva na rezultate. Za dokaz robustnosti HPLC metode pripravimo serijo preizkusov, pri katerih

realno spreminjamo osnovne parametre analize. Ti parametri so sestava in pH mobilne faze, različni dobavitelji kolone, temperatura kolone, pretok mobilne faze, volumen injiciranja, valovna dolžina detekcije. Podatki pridobljeni pri teh preizkusih nam zagotovijo pogoje, ko je potrebno metodo revalidirati. Podatkov o robustnosti metode ni potrebno dodajati registracijski dokumentaciji. Heyden in kolegi so različne parametre in pripravo testov za dokazovanje robustnosti metode zelo podrobno opisali v članku. Opisali so različne korake pri testiranju robustnosti vključno s primeri (19).

1.2.8 Zaporedje validacijskih preizkusov

Zaporedje validacijskih preizkusov ni predpisan v nobeni od smernic. Optimalen potek validacijskih preizkusov je precej odvisen od same metode. Zelo uporabno zaporedje validacijskih preizkusov za kromatografske metode je prikazano v preglednici 13:

Preglednica 3: Predlagana validacijska sekvenca (15)

Validacijski parameter	Meritve
Selektivnost s standardi	Zadostna ločljivost med vsemi komponentami vzorca. Resolucijski faktor mora biti večji kot 2,5.
Linearnost	Vsaj pet standardov različnih koncentracij, ki pokrijejo celotno delovno območje metode. Za vsak standard naredimo po vsaj tri meritve. Izračunamo povprečje ploščin pod kromatografskim vrhom in izrišemo graf ploščin v odvisnosti od koncentracije analita. Izračunamo parametre linearne regresije.
Natančnost	Standarde pri petih različnih koncentracijah znotraj delovnega območja injiciramo trikrat zaporedoma.
Ponovljivost	
Vmesna natančnost kot meddnevna ponovljivost	Standarde pri petih različnih koncentracijah injiciramo tekom treh dni. V analizo lahko vključimo tudi več analitikov, različne serije kolon.

Obnovljivost	Petkrat injiciramo standarde treh različnih koncentracij v različnih laboratorijih, na različni opremi in izračunamo relativno standardno deviacijo ploščin pod kromatografskim vrhom.
Točnost	Trikrat injiciramo pet različnih koncentracij standarda znotraj delovnega območja, ki predstavlja pravo vrednost. Izračunamo razlike med izračunano koncentracijo in nominalno koncentracijo. Slepemu vzorcu dodamo znano količino standarda v treh različnih koncentracijah. Izračunamo razmerje med dobljenimi rezultati s HPLC metodo in pravo vrednostjo.
Meja zaznavnosti	Trikrat injiciramo standard s koncentracijo blizu meje zaznavnosti. Izračunamo povprečje signala in šuma na bazni liniji. LOD = 2 - 3 krat večji signal kot je povprečni šum na bazni liniji.
Meja določljivosti	Pripravimo šest standardov s koncentracijami v območju pričakovane meje določljivosti, ki predstavlja 10 - 20 kratno višino vrha šuma na bazni liniji. Vsak standard injiciramo šestkrat in izračunamo standardno deviacijo koncentracije. Na graf narišemo odvisnost standardne deviacije od koncentracije standarda. Iz grafa odčitamo, pri kateri koncentraciji metoda zagotavlja dovolj nizko standardno deviacijo.
Specifičnost / selektivnost na realnih vzorcih	Metodo preizkusimo na realnih vzorcih. S pomočjo diode-array detektorja preverimo čistost kromatografskih vrhov.
Reproducibilnost	Preverimo natančnost in točnost metode v različnih laboratorijih.
Robusnost	Sistematično spreminjamo kromatografske pogoje, kot so temperatura kolone, pretok mobilne faze, potek gradienta,

	pH mobilne faze, valovna dolžina detekcije. Preverimo vpliv teh parametrov na ločljivost pikov in ploščine pod krivuljo.
--	--

Tekom validacije HPLC metode je potrebno določiti kriterije sprejemljivosti in pogostost testov ustreznosti sistema (system suitability test). Namen je zagotoviti, da bo metoda dolgotrajno zagotavljala ustrezne rezultate ob minimalnem številu kontrolnih analiz.

1.2.9 Validacijsko poročilo

Po končanem postopku validacije je potrebno napisati validacijsko poročilo, ki mora vsebovati naslednje podatke:

- Namen za katerega se bo HPLC metoda uporabljala.
- Povzetek metodologije.
- Seznam in opis priprave vseh kemikalij, reagentov, mobilnih faz, referenčnih standardov.
- Postopki kontrole kakovosti uporabljenih standardov in kemikalij.
- Varnostna opozorila.
- Načrt vpeljave metode v rutinsko analitiko.
- Parametri metode.
- Kritični parametri pridobljeni pri testiranju robustnosti.
- Seznam opreme.
- Podroben opis pogojev, vključno s pripravo vzorcev. Poročilo mora biti dovolj detajlno, tako da lahko izkušen analitik z ustrezno opremo ponovi preizkuse.
- Statistične obdelave in reprezentativni izračuni.
- Postopki za kontrolo kakovosti v rutini («system suitability test») s kriteriji sprejemljivosti.
- Reprezentativni grafi, kromatogrami, spektri in umeritvene premice.
- Kriteriji za revalidacijo.
- Oseba, ki je metodo razvila in izvedla prvo validacijo.
- Reference.
- Seznam oseb, ki so pregledale in odobrile analizni postopek in validacijsko poročilo, vključno s podpisi.

1.3 Vrednotenje analitske metode

Statistika je del matematike in se ukvarja s kvantitativnim proučevanjem različnih pojavov v naravi in družbi ter s pomočjo statističnih metod odkriva zakonitosti teh pojavov (50, 54).

Sprva so statistiko uporabljali predvsem za zbiranje, urejanje in prikazovanje podatkov, kasneje pa tudi za analizo podatkov. Naslednji korak v razvoju je bila analizna statistika, ki omogoča delo na vzorčnih predstavnikih populacije, nato pa ugotovitve posploši na celotno populacijo. Statistične metode nam pomagajo tudi pri vrednotenju rezultatov, podajanju rezultatov, iskanju virov različnih sistematičnih napak, ocenjevanju metod (validacija in določanje parametrov validacije), primerjavi različnih metod, različnih analitikov, načinov dela, različnih vzorcev.

1.3.1 Osnovni statistični pojmi

Vsak rezultat mora vsebovati podatek o napakah, zato izvajamo vse analize v več ponovitvah. Ponovitve so analize, ki jih naredimo večkrat pod enakimi pogoji. Število ponovitev je odvisno od vrste analize, od časa ki je potreben za analizo, od tega ali je analiza rutinska ali ne, od števila vzorcev ter drugih faktorjev. Statistično gledano je šest minimalno število ponovitev, ki jih moramo izvesti, da lahko ovrednotimo nek rezultat. Iz n ponovitev meritev izračunamo osnovne statistične vrednosti, kot so:

- Povprečje meritev je aritmetična sredina meritev:

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n} \quad (1.3)$$

- Varianca meritev je povprečje kvadratov odstopanja posameznih vrednosti od povprečja meritev. Je merilo odstopanja vrednosti posameznih meritev od povprečne vrednosti meritev:

$$s^2 = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1} \quad (1.4)$$

Varianca je osnovno merilo variabilnosti vzorcev. $(n-1)$ je število prostostnih stopenj.

- Standardni odmik:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (1.5)$$

- Standardni odmik povprečja ali standardna napaka je količnik standardnega odmika in korena števila ponovitev n :

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (1.6)$$

- Koeficient variacije ali relativni standardni odmik (RSD %) je standardni odmik, izražen v odstotkih, glede na povprečno vrednost meritev:

$$RSD\% = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}} \quad (1.7)$$

Normalno porazdeljene meritve so porazdeljene tako, kot to opredeljuje normalna ali Gaussova porazdelitev. Zakonitosti Gaussove porazdelitve veljajo le za veliko število meritev, ki znašajo nad 30. Za manjše število ponovitev veljajo zakonitosti Studentove porazdelitve. Studentova krivulja je po obliki podobna Gaussovi, le da je nižja in razpotegnjena v primerjavi z Gaussovo krivuljo. Interval zaupanja je območje kjer pričakujemo določen delež rezultatov. Najpogostejši je 95% interval zaupanja (51).

1.3.2 Napake pri meritvah

Analitski problemi so lahko kvalitativne ali kvantitativne narave. Pri kvantitativnih analizah ločimo tri vrste napak:

- Velike ali grobe napake so lahko določljive in jih običajno odkrije že izvajalec analize. Analizo je potrebno ponoviti.
- Slučajne napake so vedno prisotne in so posledica majhnih nekontroliranih napak, ki se jim med izvajanjem analiz ne moremo izogniti. Analize so sestavljene iz posameznih delov in vsak del je vir določenih slučajnih napak. Slučajne napake povzroča razpršenost rezultatov meritev okoli povprečne vrednosti na končni rezultat, ki je povprečje in ne vplivajo na končni rezultat, saj se med seboj izničijo.
- Sistematične napake so posledica konstantnih vzrokov, ki sistematično vplivajo na rezultat analize. Viri te vrste napak so lahko metoda, instrument ali človek. Sistematične napake odkrijemo s primerjavo medlaboratorijskih rezultatov. Izognemo se jim s študijem vsake stopnje analize, z dobrim načrtom eksperimenta in z uporabo standardnih referenčnih materialov ter opreme in točnih metod.
Ko testiramo instrument in metodo na sistematično napako, je to testiranje podvrženo slučajni napaki. Gre za kombinacijo obeh napak, ki jo velikokrat podajamo kot merilno negotovost. Merilna negotovost je parameter, ki posredno podaja stopnjo usposobljenosti laboratorija (52).

1.3.3 Statistični testi

Pri interpretaciji eksperimentalnih rezultatov, primerjavi podatkov in iskanju povezav med različnimi skupinami podatkov si pomagamo z različnimi statističnimi testi, ki z določeno verjetnostjo potrdijo ali ovržejo določene trditve. Našteti so najosnovnejši parametrični statistični testi in njihova uporaba:

▪ **Grubbs – Beckov test za odkrivanje zunaj ležečih meritev (ubežnikov)**

Ponovitve neke analize pri enakih pogojih večkrat sestavljajo skupino meritev. Pred njihovo statistično obdelavo in določitvijo osnovnih statističnih parametrov (povprečje, standardni odklik, interval zaupanja) meritve pogledamo in skušamo ugotoviti, če katera od meritev zelo odstopa od ostalih. Take meritve imenujemo zunaj ležeče meritve ali ubežniki («outliers»). Te meritve vplivajo na točnost in natančnost meritev. Pred nadaljnjo statistično obdelavo jih določimo s pomočjo enega od znanih statističnih testov in izločimo, če je to v skladu s splošno veljavnimi predpisi. Vendar pa moramo vsako izločitev utemeljiti tako, da skušamo najti vzroke njenega odstopanja od ostalih meritev.

Grubbsov test ima dobre teoretične osnove in navaja posebna izraza za odkrivanje ubežnikov na obeh skrajnih koncih vzorca. Pri vseh testih velja izraz za test objekta z najmanjšo, alternativni pa za test objekta z največjo vrednostjo:

$$G_i^{enubeznik} = \frac{\bar{x} - x_{\min}}{s} \text{ ali } \frac{x_{\max} - \bar{x}}{s} \quad (1.8)$$

$$G_1^{meritev} > G^{tabela} \Rightarrow \text{meritev je ubežnik} \quad (1.9)$$

Z izrazom 1.8 izračunamo kritično vrednost za možna ubežnika na obeh koncih objektov. Odločitev o ničelni hipotezi je odvisna od 1.9. Tabelarične vrednosti odčitamo iz preglednice (npr. preglednica 2.4 v Kemometriji) (60).

V primeru, da sta oba ubežnika na isti strani, ju testiramo z izrazoma 1.10. in 1.11.:

$$G_2^{dvaubeznika} = \frac{\sum_{i=3}^n (x_i - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (1.10)$$

$$G_2^{meritev} < G_2^{tabela} \Rightarrow \text{meritvi sta ubežnika} \quad (1.11)$$

Pri Grubbsovem testu za dva ubežnika, ki sta na isti strani, je treba opozoriti, da je primerjava med meritvijo in tabelarično vrednostjo ravno obratna, kot pri ostalih testih. Ničelna hipoteza H_0 : meritev je ubežnik, zahteva, da je alternativna hipoteza H_1 : količnik

je manjši od kritične vrednosti. V števcu izraza 1.11 je namreč varianca meritev brez potencialnih ubežnikov, torej mora biti količnik manjši od kritične vrednosti, če naj bi bile obe izpuščeni vrednosti res ubežnika (60).

▪ **t – test: primerjava prave vrednosti in povprečja skupine**

Primerjavo vrednosti in povprečja skupine izvedemo pogosto takrat, ko določamo točnost analitske metode. Pri tem merimo vzorec z znano količino snovi. Ponovitve tvorijo skupino meritev. Povprečje skupine meritev in pravo vrednost primerjamo s t - testom. V uporabi sta dva načina. Pri prvem določimo interval zaupanja C_i z enačbo (1.12).

$$C_i = \bar{x} \pm t \cdot s_{\bar{x}} \quad (1.12)$$

Kjer je:

t – tabelarična vrednost za določeno statistično tveganje (npr.: $\alpha = 0,05$)

$s_{\bar{x}}$ – standardni odklik povprečja

Če leži prava vrednost znotraj tega intervala je metoda točna, sicer ni.

Pri drugem, pogostejše uporabljenem načinu, izračunamo t vrednost po enačbi 1.13:

$$t_{izr} = \frac{(\bar{x} - \mu) \cdot \sqrt{n}}{s} \quad (1.13)$$

Kjer je:

μ – prava vrednost

$\bar{x}$ – povprečje meritev

n – število meritev

s – standardni odklik

Če je $t_{izr} < t_{tab}$ (npr.: $\alpha = 0,05$), potem lahko smatramo rezultat kot ustrezen ali točen.

▪ **F – test: primerjava standardnih odklikov dveh skupnih meritev**

Velikokrat moramo primerjati slučajno napako dveh skupin meritev. Če je standardni odklik prve skupine meritev s_1 in druge s_2 in je v prvi n_1 , v drugi pa n_2 meritev, potem izračunamo razmerje varianc obeh skupin po enačbi 1.14:

$$F_{izr} = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (1.14)$$

Izberemo s_1 in s_2 tako, da je $F \geq 1$ oziroma v števcu podamo večjo varianco.

Opisan F – test uporabljamo kadarkoli imamo dve skupini meritev, ki se med seboj razlikujeta glede na način analize, glede na dan izvedbe analize, glede na izvajalce analiz, glede na različne vzorce in drugo. Ključno vprašanje je, ali sta metodi enako natančni ali ne. Ta test je eden najpogostejše uporabljenih testov kadar primerjamo natančnost dveh skupin meritev, torej analitikov, metod, priprav vzorca.

Če je ta vrednost $F_{izr} < F_{tab} (\alpha = 0,05)$, potem lahko potrdimo podobnost varianc.

▪ **t – test: primerjava povprečij dveh skupin meritev**

Kot pri F – testu, imamo dani dve skupini podatkov. Prva ima standardni odklik s_1 in druga s_2 . V prvi je n_1 podatkov, v drugi pa n_2 podatkov. Za primerjavo povprečij dveh skupin podatkov sta na voljo dva različna t – testa. Katerega bomo uporabili je odvisno od tega, ali sta standardna odklika obeh skupin meritev primerljiva ali ne. Ko z F – testom primerjamo standardna odklika obeh skupin meritev, se glede na rezultat primerjave odločimo med obema možnostma. Če sta standardna odklika obeh meritev primerljiva, izračunamo skupni standardni odklik po enačbi 1.15:

$$s = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \cdot s_1^2 + (n_2 - 1) \cdot s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}} \quad (1.15)$$

V tem primeru vrednotimo rezultate v skladu s prej opisanim t testom.

Kadar sta standardna odklika obeh skupin meritev različna, vrednost t izračunamo z enačbo 1.16:

$$t_{izr} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad (1.16)$$

Pri čemer sta $\bar{x}_1$ in $\bar{x}_2$ povprečja meritev v obeh skupinah.

V teh primerih statistično signifikantnost primerjamo s posebnimi izračuni. Lahko uporabimo t - test s prilagojenimi stopinjami prostosti ali Fischer – Behrensov test.

Podobno kot F – test, tudi enega od obeh t – testov uporabimo, kadar primerjamo povprečne vrednosti dveh skupin meritev, ki se med seboj razlikujejo glede na izvajalca analiz, čas analiz, vzorce ali priprave vzorcev in podobno.

▪ F – test (ANOVA): primerjava več skupin

Analizo variance (ANOVA) običajno uporabimo kadar moramo primerjati več kot dve skupini. Pri meritvah sta možna dva vira razlik oziroma varianc. Prvi vir je posledica slučajne napake meritev. Drugi vir je posledica vpliva enega ali več kontroliranih faktorjev. Kontrolirani faktorji so na primer temperatura, čas, način priprave vzorca in drugo. S spreminjanjem velikosti vpliva kontroliranega faktorja pa ugotavljamo, kdaj njegov vpliv privede do pomembnih razlik v rezultatih. Z analizo variance lahko določimo vire variabilnosti.

Pri večjem številu skupin uporabljamo ANOVA, ki upošteva variabilnost znotraj posameznih skupin in variabilnost med skupinami. To pomeni, da dejansko vključuje F – test.

Pri regresijski analizi nas zlasti zanimajo situacije, ko imamo več podatkov za posamezno koncentracijsko točko. V tem primeru je osnoven namen analize variance potrditev pravilnosti linearnega modela. Za takšno analizo variance je potrebno opraviti veliko število meritev. Potrebujemo veliko število koncentracijskih nivojev in veliko ponovitev meritev na vsakem koncentracijskem nivoju. Skupno odstopanje y vrednosti od srednje vrednosti lahko podamo:

$$SS_T = SS_{REG} + SS_R, \quad (1.17)$$

$$SS_R = SS_{PE} + SS_{LOF}, \quad (1.18)$$

SS_T – skupno odstopanje y vrednosti od srednje vrednosti vseh meritev,

SS_{REG} – odstopanje zaradi odvisnosti signala od koncentracije,

SS_R – odstopanje, ki je posledica eksperimentalne napake regresijske premice,

SS_{LOF} – odstopanje točk od linearnega modela,

SS_{PE} – prava eksperimentalna napaka in je neodvisna od izbranega modela regresije (predstavlja odstopanja posameznih meritev od povprečne vrednosti na enem koncentracijskem nivoju),

Za analizo variance pripravimo preglednico 4.

Preglednica 4: Analiza variance za k koncentracijskih nivojev in n ponovitev na posameznem koncentracijskem nivoju.

IZVOR VARIANCE	SS	STOPINJA PROSTOSTI	MS	F
REGRESIJA	SS_{REG}	1	MS_{REG}	MS_{REG} / MS_R
OSTANEK	SS_R	$n - 2$	MS_R	
SKUPNO	SS_T	$n - 1$		
NEUJEMANJE Z MODELOM	SS_{LOF}	$k - 2$	MS_{LOF}	MS_{LOF} / MS_{PE}
PRAVA EKSP. NAPAKA	SS_{PE}	$n - k$	MS_{PE}	

V preglednici 4 pomeni SS vsoto kvadriranih odklonov, MS pa ocenimo pri določeni prostostni stopinji. Test linearnosti izvedemo tako, da izračunamo vrednost F :

$$F = \frac{MS_{LOF}}{MS_{PE}} \quad (1.19)$$

in jo primerjamo s tabelarično vrednostjo $F(\alpha, k-2, n-k)$.

Kadar je ugotovljena vrednost manjša od tabelarične ($\alpha = 0,05$), potem razlike niso statistično različne oz. odstopanje od linearnega modela ni statistično signifikantno.

▪ Umeritvene premice

Umerjanje je eden najvažnejših postopkov v kemijski analizi. Dobro natančnost in točnost lahko dosežemo samo z dobro kalibracijo. Umerjanje obsega izbiro umeritvene premice, določitev parametrov modela z metodo najmanjših kvadratov, validacijo modela in izračun meje zaupanja za parametre modela ter analitski rezultat. Le malo analitskih metod ne potrebuje umerjanja (titrimetrija, gravimetrija). V teh primerih vzorca ne merimo direktno, ampak določimo rezultat z merjenjem neke druge fizikalne količine. Pogoji za to je, da obstaja empiričen ali teoretičen odnos med ustrezno količino in koncentracijo.

Umeritveno premico dobimo tako, da postavimo matematičen model, ki se prilega eksperimentalnim podatkom. Najbolj običajna in uporabna je linearna umeritvena premica, ki gre skozi središče in je uporabna v širokem dinamičnem območju. V praksi so seveda prisotna odstopanja (53, 54, 55).

Postopek priprave umeritvene premice s pomočjo regresije

Postopek umerjanja temelji na merjenju signala standardnih raztopin z znano koncentracijo. Nato izmerimo na instrumentu pri enakih pogojih še signal vzorca. Koncentracija vzorca mora biti med najnižjo in najvišjo koncentracijo standardnih raztopin, tako da lahko določimo vrednost koncentracije z interpolacijo na umeritveni premici. Za določitev umeritvene premice uporabimo metodo najmanjših kvadratov.

Regresijska analiza proučuje odnos med spremenljivko x in y . X je kontrolirana ali neodvisna spremenljivka (koncentracija standarda), y je odvisna spremenljivka, ki predstavlja merjeni signal. Za pripravo regresijske premice moramo sprejeti predpostavko,

da x vrednosti nimajo napake. Napake pri pripravi standardnih raztopin so zares mnogo manjše od napak katere delamo pri merjenju signala. Vrednosti neznanih parametrov odseka (b_0) in naklona (b_1) regresijske premice moramo ugotoviti na tak način, da se model prilega eksperimentalnim točkam kot je to najbolj mogoče. Signal je sestavljen iz determinirane komponente, predstavljene z linearnim modelom in slučajne komponente e_i . Potrebno je izračunati vrednosti (b_0) in (b_1) tako, da je vsota kvadratov ostankov, $\sum (e_i)^2$, minimalna. Zato to metodo imenujemo metoda najmanjših kvadratov.

Komponente e_i predstavljajo razlike med opazovanimi y_i vrednostmi in y vrednostmi, predstavljenimi z modelom. Vrednost e_i imenujemo ostanek.

$$e_i = y_i - \hat{y}_i \quad (1.20)$$

Vrednosti odseka (b_0) in naklona (b_1) regresijske krivulje izračunamo iz enačb:

$$b_0 = \bar{y} - b_1 \cdot \bar{x} \quad (1.21)$$

Pri čemer je : $\bar{y}$ – povprečje y_i

$\bar{x}$ – povprečje x_i

Test homogenosti varianc

Lastnost, da imajo vsi ostanki (e_i) konstantno varianco preko celega dinamičnega koncentracijskega območja in so neodvisni od koncentracije, imenujemo homoskedastičnost. Statistično preverjanje homoskedastičnosti temelji na primerjavi varianc s Cochran-ovim ali F – testom. V primeru, ko imamo homoskedastične podatke, regresijsko premico izračunamo po metodi najmanjših kvadratov.

Heteroskedastičnost je pojav, pri katerem je varianca signala y_i odvisna od koncentracije. Pri mnogih analitskih postopkih pogoj konstantne variance v območju celotne kalibracijske premice ni izpolnjen. Takrat je potrebno analizirati slučajno napako, ki jo povzroča šum in jo dobimo pri ponovitvah merjenj istega vzorca.

Če homogenosti ni, lahko:

- zožimo koncentracijsko območje ali
- razdelimo koncentracijsko območje na več manjših področij ali

- če so podatki heteroskedastični, regresijsko premico izračunamo po metodi uteženih najmanjših kvadratov ali pa izvedemo transformacijo v homoskedastične podatke, npr. z logaritemsko pretvorbo obeh spremenljivk.

1.4 Stabilnost

1.4.1 Ovojnina

Uporabnost zdravil je mnogokrat odvisna od primerne ovojnine, zaradi česar se njenemu proučevanju posveča vedno večja pozornost. Industrijski način proizvodnje pomeni v splošnem podaljšan čas kontakta zdravila z ovojnino, mednarodno trženje pa z izpostavljanjem zdravila različnim vplivom okolja še dodatno vpliva na zdravilo kot celoto. Spremembe temperature, vlažnosti in drugi stresni vplivi tako ob transportiranju ali shranjevanju povzročajo različne spremembe, ki lahko vodijo do neuporabnosti zdravila. Zdravila ne moremo distribuirati, niti ne more imeti ustreznega roka uporabnosti, če ni embalirano v ustrezno ovojnino, kar pa lahko dosežemo le s kakovostno povezavo obeh komponent: embalaže in zdravila.

Namen in naloge ovojnine:

1. Omogoča zaščito pred kemičnimi in fizikalnimi agensi ter mikrobiološkim okuženjem.
2. Omogoča priročnost (lažja aplikacija) in vsebnost zdravila (zagotovljena količina učinkovine v zdravilu).
3. Posreduje identifikacijo in informacijo o zdravilu (ime proizvajalca in učinkovin, ki so vsebovane v zdravilu, količine sestavin, oblika zdravila, način aplikacije, datum izteka roka uporabnosti, serijska številka...).
4. Daje izgled zdravilu (omogoča zaupanje pacienta) in omogoča enostavnost rokovanja.

Z ekološkega vidika je pomembno, koliko energije se pri proizvodnji embalaže porabi in predvsem, ali je ovojnina uničljiva oz. sposobna recikliranja.

Glede na zahteve kvalitete ločimo 3 tipe ovojnine:

- Primarna ovojnina

Je v neposrednem stiku z zdravilom. Zanje so zahteve glede kakovosti najstrožje. Njena naloga je predvsem zaščita zdravila pred kvarnimi vplivi iz okolja.

- Sekundarna ovojnina

Zdravilo z njo ni v neposrednem stiku, zato zahteve zanje niso tako stroge. Njena naloga je zaščita med transportom in shranjevanjem ter posredovanje identifikacije in informacije o zdravilu.

- Terciarna ovojnina

Uporabimo jo za izdelavo pomagala pri aplikaciji zdravila (žličke, dozirne brizge). Njihova kvaliteta mora ustrezati aplikaciji.

Embalažna materiala, ki ju v farmaciji najpogosteje uporabljamo, sta steklo in plastika. S ciljem zagotavljanja integralne kakovosti zdravila je zato potrebno preverjati tudi kakovost teh dveh materialov, pri čemer so kriteriji kakovosti odvisni od namena uporabe (38).

1.4.2 Preizkusi stabilnosti farmacevtskega izdelka

Smernice ICH so izdelali eksperti ICH delovne skupine in so naslednje:

- ICH Q1A(R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products (Preizkusi stabilnosti novih učinkovin in izdelkov),
- ICH Q1B: Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products (Preizkusi fotostabilnosti novih učinkovin in izdelkov),
- ICH Q1C: Stability Testing for New Dosage Forms (Preizkusi stabilnosti novih farmacevtskih oblik),
- ICH Q1D: Bracketing and Matrixing Designs for Stability Testing of New Drug Substances and Products (Načrtovanje postopkov »bracketinga« in »matrixinga« za preizkušanje stabilnosti novih učinkovin in izdelkov),
- ICH Q1E: Evaluation for Stability Data (Ocenitev podatkov preizkusov stabilnosti).

Smernice so namenjene svetovanju pri regulatornih zadevah. Smernice so predpisane za regulatorne organe v Evropski uniji, Japonskem in Združenih državah Amerike. Sledenje smernicam posledično zadošča za registracijo zdravil v teh treh omenjenih regijah. Medtem pa le ti preizkusi niso nujno zadostni za registracijo ali izvoz zdravila na druga področja po svetu.

Namen testiranja stabilnosti je zagotoviti dokaze, kako se kakovost zdravilne učinkovine ali izdelka pod vplivom različnih okoljskih dejavnikov, kot so temperatura, vlažnost in svetloba, s časom spreminja. Namen je določiti čas ponovitve preizkusov za učinkovine, določiti rok uporabnosti za zdravila in določiti pogoje skladiščenja oziroma shranjevanja.

Izbira preizkusnih pogojev opredeljenih v tej smernici temelji na analizi učinkov klimatskih razmer v regijah Evropske unije, Japonske in Združenih držav Amerike. Povprečne kinetične temperature v katerem koli delu sveta je mogoče izpeljati iz podnebnih podatkov. Svet lahko razdelimo v štiri klimatske cone od I do IV. Smernica ICH Q1A(R2) obravnava I in II klimatsko cono, v katero spada Slovenija.

Zasnova formalne študije stabilnosti farmacevtskega proizvoda mora temeljiti na poznavanju zdravilne učinkovine. Potrebni so podatki o lastnostih, o obnašanju in o osnovnih stabilnostnih študijah učinkovin. Prav tako mora formalna študija temeljiti na izkušnjah študij oblikovanja farmacevtskega izdelka. Potrebno je navesti vse možne spremembe, ki bi lahko nastale med skladiščenjem in jih je potrebno vključiti v formalne študije stabilnosti (39).

Testiranje fotostabilnosti je potrebno opraviti na najmanj eni primarni seriji zdravila. Standardni pogoji za testiranja fotostabilnosti so opisani v ICH Q1B (43).

Študije stabilnosti moramo zagotoviti na vsaj treh serijah zdravila, ki morajo biti v isti obliki in v isti primarni in sekundarni ovojnini, kot je predlagano za trženje. Proizvodni proces, ki je uporabljen za izdelavo primarnih serij zdravila, mora zagotoviti izdelek enake kakovosti in mora izpolniti enake specifikacije kot tisti, ki bo namenjen za trženje. Dve od treh serij morata biti pilotni seriji. Če lahko upravičimo, je lahko tretja serija manjša. Če je le mogoče, se za izdelavo serij zdravila uporabijo različne serije zdravilne učinkovine.

Stabilnostno študijo je potrebno opraviti na vsakem posameznem zdravilu različnih jakosti in na vseh velikostih primarnega pakiranja, razen če uporabimo metode »bracketinga« ali »matrixinga« (39).

Metoda »bracketing« je načrt preizkušanja stabilnosti zasnovan tako da izberemo vzorce z ekstremnimi lastnostmi (n.pr.: največjo dozo, največjo velikost pakiranja). Preizkušanje se izvaja na določenih skrajnih dejavnikih, na vseh časovnih točkah kot v celotnem načrtu preizkušanja stabilnosti. Predpostavi se, da je stabilnost na ekstremnih primerih reprezentativna za celotno paleto zdravila. Bracketing se lahko uporabi v primeru različnih velikosti vsebnika oziroma pri različnih polnitvah v istem sistemu zapiranja vsebnika (41).

Metoda »matrixing« je načrt preizkušanja stabilnosti zasnovan tako, da izberemo skupino vzorcev, ki zajemajo vse možne kombinacije zdravila in jih preizkusimo v določeni časovni točki. V kasnejših časovnih točkah se testirajo še vse kombinacije vzorcev. Načrt predvideva, da stabilnost za vsako skupino vzorcev predstavlja stabilnost vseh vzorcev na določeni časovni točki. Razlike, ki jih zajemajo vzorci, za isto zdravilo so vzorci:

- ki zajemajo različne serije,
- ki zajemajo različne jakosti oziroma odmerke,

različne velikosti istega sistema zapiranja vsebnika in morda v nekaterih primerih različne sisteme zapiranja vsebnika (41).

Specifikacije predstavljajo seznam preizkusov, sklice na analitske postopke, predlagane kriterije sprejemljivosti. Vsebujejo tudi koncept različnih kriterijev sprejemljivosti za sprostitvev izdelka in specifikacije roka uporabnosti, ki jih opisujeta ICH Q6A in Q6B. Specifikacije za razgradne produkte v izdeleku opisuje Q3B.

Stabilnostne študije morajo vključevati preizkušanje tistih lastnosti izdelka, ki so dovzetne za spremembe med skladiščenjem, transportom in uporabi ter lahko vplivajo na kakovost, varnost in/ali učinkovitost zdravila. Preizkušanje mora zajemati fizikalne, kemijske, biološke in mikrobiološke parametre, morebitne stabilizatorje (npr. antioksidanti, protimikrobni konzervansi), preizkuse funkcionalnosti (npr. za sisteme sproščanja odmerka). Analitski postopki morajo biti v celoti validirani in indikativni za stabilnost. Izvajanje replikacij je odvisno od rezultatov validacijskih študij.

Kriteriji sprejemljivosti roka uporabnosti morajo biti določeni na podlagi vseh razpoložljivih informacij o stabilnosti (39).

Potrebno je imeti upravičene razlike med rokom uporabnosti zdravila in med kriteriji sprejemljivosti za sproščanje pred prodajo, ki bi temeljila na oceni stabilnosti in na spremembah opaženih med skladiščenjem (40).

1.4.3 Pogostost preizkušanja

Pri dolgoročnih študijah mora biti frekvenca preizkušanja zadostna, da lahko vzpostavimo stabilnostni profil izdelka. Za izdelke s predlaganim rokom uporabnosti najmanj dvanajst mesecev je pogostost preizkušanja običajno vsake tri mesece v prvem letu, vsakih šest mesecev v drugem letu in potem enkrat letno glede na predlagan rok uporabnosti (39).

Pri pospešenih pogojih za shranjevanje je priporočeno preizkušanje v najmanj treh časovnih točkah vključno z začetno in končno časovno točko. Za šestmesečno študijo je priporočljivo preizkušanje na začetku študije, tretji in šesti mesec. Če na podlagi izkušenj in razvoja pričakujemo, da obstaja možnost bistvenih sprememb na zdravilu med pospešeno študijo stabilnosti, potem povečamo obseg preizkušanja. Bodisi z dodajanjem vzorcev v zadnjem časovnem obdobju preizkušanja ali z vključitvijo četrte časovne točke v študiji (39).

Z uporabo metod »bracketinga« in »matrixinga« lahko zmanjšamo število vzorcev samo v primeru, če je to upravičeno (40, 41, 44, 45).

1.4.4 Pogoji shranjevanja

Na splošno je potrebno zdravilo oceniti v skladu s pogoji shranjevanja, kateri vključujejo določeno stopnjo tolerance. Izbrani pogoji shranjevanja in sama dolžina študije mora zadostovati pogojem skladiščenja, pošiljanja in kasnejše uporabe.

Pri dolgoročnih študijah mora preizkušanje trajati najmanj dvanajst mesecev na vsaj treh serijah in se mora nadaljevati do konca predpisanega roka uporabnosti. Podatki, ki so pridobljeni tokom pospešenih študij se lahko uporabijo za ocenitev stabilnosti izdelka v stanju izven predpisanih pogojev shranjevanja, ki se lahko zgodijo med prevozom.

Podatke zbrane med ocenjevanjem stabilnosti zdravila je potrebno predložiti pri registraciji zdravila (39).

V preglednici 5 so opisani osnovni pogoji shranjevanja zdravila v primeru dolgoročne in pospešene študije stabilnosti. Prav tako so opisani pogoji za vmesno skladiščenje zdravila.

Preglednica 5: Osnovni pogoji shranjevanja zdravil

Študija	Pogoji shranjevanja	Minimalen zahtevan čas
Dolgoročno preizkušanje*	25°C ± 2°C / 60% RH ± 5% RH ali 30°C ± 2°C / 65% RH ± 5% RH	12 mesecev
Vmesno preizkušanje**	30°C ± 2°C / 65% RH ± 5% RH	6 mesecev
Pospešeno preizkušanje	40°C ± 2°C / 75% RH ± 5% RH	6 mesecev

* Izbira pogojev je odvisna od predlagatelja registracije.

** Če so izbrani pogoji za dolgoročno preizkušanje 30°C ± 2°C / 65% RH ± 5% RH, potem ne rabimo dodatno izvajati vmesnega preizkušanja.

Če so za dolgoročno preizkušanje izbrani pogoji 25°C ± 2°C / 60% RH ± 5% RH in se v šestmesečnem pospešenem preizkušanju pojavijo signifikantne spremembe, potem moramo izvesti dodatna preizkušanja pod pogoji vmesnega preizkušanja in izvesti evalvacijo po signifikantno spremenjenih kriterijih. Začetna vloga mora vključevati podatke najmanj šest od dvanajst mesecev vmesnega preizkušanja (39).

Signifikantne spremembe na splošno definiramo kot:

1. 5 % odmik vsebnosti učinkovine od začetne vrednosti.
2. Vsak razgradni produkt, ki odstopa od predpisanih kriterijev sprejemljivosti.
3. Napake, ki niso primerne kriterijem sprejemljivosti videza, fizičnih lastnosti in preizkusom funkcionalnosti (npr. barva, ločevanje faz, strjevanje, trdota). Upoštevati

moramo, da so določene spremembe pričakovane pod pogoji pospešenega preizkušanja (npr. mehčanje supozitorij, taljenje krem) in se dajo napovedati.

4. Neizpolnjevanje kriterijev sprejemljivosti za pH (46).

1.4.5 Nadaljevanje testiranja stabilnosti

Smernica ICH Q1A(R2) zahteva, da ko podatki dolgoročnega testiranja stabilnosti na primarnih serijah ne zajemajo celotnega priporočenega obdobja roka uporabnosti, mora predlagatelj nadaljevati preizkuse stabilnosti po odobritvi, z namenom določiti natančen rok uporabnosti zdravila. Če predložitev podatkov vsebuje podatke dolgoročnega testiranja stabilnosti na treh proizvodnih serijah, ki zajemajo predlagani rok uporabnosti, potem nadaljnje preverjanje stabilnosti ni potrebno. V nasprotnem primeru se morajo izpolniti naslednje obveznosti:

1. Če predlagatelj predloži podatke študij stabilnosti na vsaj treh proizvodnih serijah, je njegova obveznost, da nadaljuje dolgoročno preizkušanje stabilnosti do konca predlaganega roka uporabnosti in pridobi podatke o pospešenem preizkušanju za obdobje šestih mesecev.
2. Če predlagatelj predloži podatke študij stabilnosti na manj kot treh proizvodnih serijah, je njegova obveznost, da nadaljuje dolgoročno preizkušanje stabilnosti do konca predlaganega roka uporabnosti in pridobi podatke o pospešenem preizkušanju za obdobje šestih mesecev. Prav tako pa mora pripraviti dolgoročno preizkušanje za vsaj še dve proizvodni seriji v okviru predlaganega roka uporabnosti in pridobiti podatke o pospešenem preskušanju za obdobje šestih mesecev za še dve proizvodni seriji.
3. Če predlagatelj ne predloži podatkov stabilnostega preizkušanja, je obvezan, da pripravi dolgotrajne študije stabilnosti na prvih treh proizvodnih serij v obdobju predlaganega roka uporabnosti in pospešene študije stabilnosti na prvih treh proizvodnih serij za šest mesecev.

Protokol za izvajanje preizkusov stabilnosti za predlagane serije zdravila mora biti enak kot za primarne proizvodne serije, razen če je znanstveno utemeljeno, da je lahko drugačen (39).

1.4.6 Ocena – evalvacija

Pri predstavitvi in vrednotenju stabilnosti izdelka je potreben sistematičen pristop, ki zajema vse možne in primerne informacije za določeno zdravilo. To so rezultati iz fizikalnih, kemičnih, bioloških in mikrobioloških preizkusov, vključno z lastnostmi farmacevtske oblike.

Namen preizkusov stabilnosti je določitev roka uporabnosti in določitev navodil za shranjevanje, ki bodo veljala za vse prihodnje serije proizvedenega zdravila in ki bodo embalirana v istih pogojih. Stopnja spremenljivosti posameznih serij vpliva na zaupanje, da bodo prihodnje proizvodne serije ostale v mejah specifikacij celoten rok uporabnosti.

Če rezultati preizkusov stabilnosti pokažejo nizko stopnjo degradacije in nizko stopnjo variabilnosti in zadostujejo zahtevam v času roka uporabnosti, je običajno nepotrebno izvajati formalne statistične analize.

Odvisno od primera je, ali bomo podatke preoblikovali za linearno regresijsko analizo. Ponavadi se lahko odnos predstavi kot linearna, kvadratna ali kubična funkcija na aritmetični ali logaritemski skali. Statistične metode moramo preizkusiti tako, da bodo ustrezale vsem serijam.

Podatke pridobljene iz dolgotrajnega preizkušanja stabilnosti lahko omejeno ekstrapoliramo z namenom, da podaljšamo rok uporabnosti izven opazovanega časa. Utemeljitev mora temeljiti na poznavanju mehanizmov degradacije, na rezultatih preizkušanj pod pospešenimi pogoji, na velikosti serije. Ekstrapolacija predpostavlja, da bo proces degradacije enak tudi po opazovanem času stabilnosti.

Vsako vrednotenje stabilnosti mora vsebovati ocenitev vsebnosti, učinkovin, vsebnosti razgradnih produktov in ostala ustrezna dejstva (42).

1.4.7 Označevanje embalaže farmacevtskega izdelka o roku uporabnosti in pogojih shranjevanja

Oznako za shranjevanje je potrebno določiti v skladu z ustreznimi nacionalnimi zahtevami. Izjava mora temeljiti na oceni stabilnosti izdelka. Če je potrebno, moramo dodati posebna navodila (npr. če zdravilo ne sme zamrzniti). Navedenim pogojem za shranjevanje, kot so »sobna temperatura«, se je potrebno izogniti.

Obstajati mora neposredna povezava med izjavo za shranjevanje in dokazano stabilnostjo izdelka. Datum roka uporabnosti mora biti naveden na stični in zunanji embalaži (39, 40, 42).

1.5 Regulatorne zahteve za rastlinske pripravke

1.5.1 Razvrstitev pegastega badlja

Pegasti badelj je po Pravilniku o razvrstitvi zdravilnih rastlin razvrščen v kategorijo H (28). V kategorijo H so razvrščene zdravilne rastline, ki se lahko uporabljajo tudi kot živila, če se uporabljajo deli rastlin v določeni stopnji rasti (dozorelosti). Za izdelke, ki vsebujejo visoko koncentrirane in visoko prečiščene ekstrakte iz teh rastlin, je treba pridobiti mnenje organa, pristojnega za zdravila.

Če se izdelkom, ki vsebujejo zdravilne rastline iz kategorije H, na kakršen koli način pripisujejo zdravilne učinke v smislu preprečevanja, zdravljenja ali ozdravljenja bolezni pri ljudeh, se razvrstijo med zdravila.

Izdelki, ki vsebujejo ekstrakte iz zdravilnih rastlin iz kategorije H v terapevtskih odmerkih, se praviloma razvrščajo med zdravila (28).

Ker ima pegasti badelj status H, ga lahko tržimo z različnimi statusi:

- kot tradicionalno zdravilo rastlinskega izvora,
- kot prehransko dopolnilo ali
- kot galenski izdelek.

1.5.2 EMEA

Odbor za zdravila rastlinskega izvora (HMPC) je strokovni organ Evropske agencije za zdravila (EMA). Odbor pripravlja monografije Skupnosti o zdravilih rastlinskega izvora in tradicionalnih zdravilih rastlinskega izvora, ter osnutek seznama Skupnosti o rastlinskih snoveh, pripravkih rastlinskega izvora in kombinacijah iz njih v skladu z Direktivo 2001/83/ES (24).

Monografije Skupnosti o zdravilih rastlinskega izvora in tradicionalnih zdravilih rastlinskega izvora so povzetek farmacevtskih, kliničnih in farmakoloških značilnosti zadevnega zdravila. Za pegasti badelj monografija še ni napisana, so pa določene države, ki bodo to področje obdelale (24).

Seznam Skupnosti je seznam rastlinskih snovi, pripravkov rastlinskega izvora in kombinacij iz njih, ki se uporabljajo v tradicionalnih zdravilih rastlinskega izvora, skupaj z binominalnim znanstvenim imenom, jakostjo, tradicionalnim področjem uporabe, odmerjanjem, načinom uporabe in drugimi podatki, potrebnimi za varno uporabo rastlinskih snovi, pripravkov rastlinskega izvora in kombinacij iz njih (24).

1.5.3 Tradicionalno zdravilo rastlinskega izvora

Tradicionalno zdravilo rastlinskega izvora je zdravilo, ki kot učinkovino vsebuje izključno eno ali več rastlinskih snovi, enega ali več pripravkov rastlinskega izvora, ali eno ali več rastlinskih snovi v kombinaciji z enim ali več pripravki rastlinskega izvora, in ki izpolnjuje naslednje zahteve:

- Imeti smejo izključno terapevtske indikacije, primerne za tradicionalna zdravila rastlinskega izvora, ki so zaradi svoje sestave in namena primerna za samozdravljenje.
- So izključno za dajanje v skladu z določeno jakostjo in odmerjanjem.
- So za peroralno ali zunanjo uporabo (dermalna aplikacija) ali za inhaliranje.
- So v obdobju tradicionalne uporabe, za katero štejejo bibliografski ali drugi strokovni dokazi, da je bilo zadevno zdravilo v medicinski uporabi najmanj 30 let pred datumom vloge za registracijo, od tega najmanj 15 let v državah članicah Evropske unije.

- Podatki o tradicionalni uporabi zdravila morajo biti zadostni, da izdelek dokazano ni škodljiv v določenih pogojih uporabe, farmakološki učinki ali učinkovitost zdravila pa so verjetni na podlagi dolgotrajne uporabe in izkušenj.

Če se tradicionalna uporaba nanaša na uporabo rastlinske snovi, priprava rastlinskega izvora ali tradicionalnega zdravila rastlinskega izvora v ustni ali nosni votlini, v danki, vagini, zunanjem sluhovodu ali na očeh, je tudi te načine mogoče upoštevati v okviru tradicionalne uporabe, če ni zadržkov glede varnosti in gre predvsem za lokalno delovanje.

Tradicionalna zdravila rastlinskega izvora lahko vsebujejo tudi vitamine in minerale, če zanje obstajajo dokumentirana dokazila o varnosti, pod pogojem, da vitamini ali minerali podpirajo delovanje rastlinskih učinkovin glede navedenih terapevtskih indikacij.

Za tradicionalna zdravila rastlinskega izvora ne štejejo zdravila, ki vsebujejo kemično definirane, izolirane sestavine rastlin (npr. mentol, glikozidi digitalisa ...) (24).

1.5.4 Registracijske zahteve za farmacevtske oblike rastlinskega izvora

Tradicionalno zdravilo rastlinskega izvora sme biti v prometu le na podlagi dovoljenja za promet s tradicionalnim zdravilom rastlinskega izvora. Za tradicionalna zdravila rastlinskega izvora se uporablja poenostavljeni postopek pridobitve dovoljenja za promet (postopek registracije tradicionalnega zdravila), v katerem predlagatelju ni treba predložiti klinične dokumentacije o zdravilu (24). Predlagatelj in imetnik dovoljenja za promet s tradicionalnim zdravilom rastlinskega izvora morata izpolnjevati naslednje:

Postopek za izdajo dovoljenja za promet z zdravilom se začne z vlogo predlagatelja, ki je pravna ali fizična oseba s sedežem v Evropski uniji. To je lahko proizvajalec zdravila ali pravna ali fizična oseba, ki ima s proizvajalcem sklenjeno pisno pogodbo in izpolnjuje zahteve skladno z določbami tega zakona. Imetnik dovoljenja za promet z zdravilom mora imeti vzpostavljen sistem vodenja farmakovigilance in določeno odgovorno osebo za farmakovigilanco, ki je nenehno dosegljiva. Odgovorna oseba za farmakovigilanco mora imeti stalno prebivališče na območju Evropske unije in univerzitetno izobrazbo medicinske ali farmacevtske smeri oziroma pri zdravilih za uporabo v veterinarski medicini veterinarske ali farmacevtske smeri. Če odgovorna oseba nima take izobrazbe, mora imeti

stalno in neprekinjeno možnost pridobitve strokovne podpore osebe, ki ima univerzitetno izobrazbo medicinske smeri za zdravila za uporabo v humani medicini oziroma veterinarske smeri za zdravila za uporabo v veterinarski medicini. Če imetnik dovoljenja za promet z zdravilom nima sedeža v Republiki Sloveniji, lahko poleg odgovorne osebe določi tudi kontaktno osebo za farmakovigilanco na območju Republike Slovenije (Zakon o zdravilih (24), Pravilnik o postopkih glede dovoljenja za promet z zdravilom (32)).

1.5.4.1 Vsebina vloge za registracijo tradicionalnega zdravila rastlinskega izvora

Vloga za registracijo tradicionalnega zdravila rastlinskega izvora mora vsebovati naslednje podatke in dokumente v skladu s Prilogo I Direktive 2001/83/ES:

- ime, naziv in naslov predlagatelja ter, kadar je to primerno, proizvajalca,
- ime zdravila,
- podatke o kakovostni in količinski sestavi zdravila z navedbo mednarodnega nelastniškega imena (INN), ki ga priporoča Svetovna zdravstvena organizacija, kadar tako ime obstaja, ali navedbo ustreznega drugega splošnega imena, ki mora praviloma vključevati tudi del rastline, ki se uporablja in latinsko ime rastline v skladu z binominalnim sistemom (rod, vrsta, varieteta in avtor),
- oceno možnih tveganj za okolje, ki jih predstavlja zdravilo. Vpliv na okolje je treba oceniti in za vsak primer posebej sprejeti posebne ureditve za omejevanje tega vpliva,
- opis postopka izdelave,
- terapevtske indikacije, kontraindikacije in neželene učinke,
- odmerjanje, farmacevtsko obliko, postopek in pot uporabe zdravila ter pričakovani rok uporabnosti,
- navedbo razlogov za previdnostne in varnostne ukrepe pri shranjevanju zdravila, pri dajanju zdravila bolnikom ter pri odlaganju odpadkov, skupaj z navedbo vseh možnih tveganj, ki jih zdravilo predstavlja za okolje,
- opis kontrolnih metod, ki jih uporablja izdelovalec,
- rezultate farmacevtsko-kemičnih in bioloških preskusov,

- predlog povzetka glavnih značilnosti zdravila (brez farmakoloških podatkov iz 5. točke 11. člena Direktive 2001/83/ES), osnutek zunanje ovojnine in osnutek stične ovojnine zdravila v naravni velikosti, skupaj z navodilom za uporabo,
- dokazilo, da ima izdelovalec dovoljenje za izdelavo zdravil,
- podatke o že izdanih dovoljenjih za promet z zdravilom, ki je predmet vloge, ali o zavrnitvi ali preklicu teh dovoljenj v drugih državah članicah ali v tretjih državah, ter podrobne razloge za zavrnitev,
- bibliografske ali strokovne dokaze, da je bilo zadevno ali drugo ustrezno zdravilo v medicinski uporabi najmanj 30 let pred datumom vložitve vloge, od tega najmanj 15 let v Evropski uniji, vključno s podatki o tradicionalnem področju uporabe, jakosti, odmerjanju, načinu uporabe, trajanju uporabe,
- bibliografski pregled podatkov o varnosti skupaj z izvedenskim poročilom in na zahtevo organa, pristojnega za zdravila, katere koli dodatne podatke, ki so potrebni za oceno varnosti zdravila,
- v primeru kombinacij, kjer posamezne učinkovine niso zadosti poznane, morajo biti podatki predloženi tudi za posamezne učinkovine,
- dokumentacijo o rezultatih farmacevtsko-kemičnega in biološkega preskušanja mora spremljati podrobni povzetek izvedenca, ki mora biti ustrezno strokovno in tehnično usposobljen za objektivni opis in vrednotenje rezultatov preskušanj zadevnega zdravila. To mora biti razvidno iz njegovega predloženega življenjepisa in drugih podatkov, če je potrebno. O izpolnjevanju svojih dolžnosti kot izvedenca jamči s svojim podpisom (24).

1.5.4.2 Vsebina vloge za tradicionalno zdravilo rastlinskega izvora, ki je na seznamu Skupnosti

Ne glede na določila zgoraj opisane vsebine vloge predlagatelju ni treba predložiti podatkov iz trinajste, štirinajste in petnajste alineje prvega odstavka, če se vloga za registracijo tradicionalnega zdravila rastlinskega izvora nanaša na rastlinsko snov, pripravek rastlinskega izvora ali kombinacijo iz njih, ki je na seznamu Skupnosti v skladu z Direktivo 2001/83/ES.

Če rastlinska snov, pripravek rastlinskega izvora ali kombinacija iz njih preneha biti vključena v seznam Skupnosti, se dovoljenja za promet na podlagi prejšnjega odstavka za tradicionalna zdravila rastlinskega izvora, ki vsebujejo to snov, prekličejo, razen če imetnik dovoljenja za promet s tradicionalnim zdravilom rastlinskega izvora v treh mesecih ne predloži podatkov in listin, kakor jih zahteva prejšnji opis vsebine vloge.

Kadar je sprejeta monografija Evropske unije o rastlinski snovi ali pripravku rastlinskega izvora ali če je tradicionalno zdravilo rastlinskega izvora sestavljeno iz rastlinskih snovi, pripravkov rastlinskega izvora ali kombinacij iz njih s seznama Skupnosti, se uporabljajo določbe predpisa o dovoljenju za promet z zdravilom za uporabo v humani medicini v delu, ki se nanaša na postopek z medsebojnim priznavanjem in decentralizirani postopek za pridobitev dovoljenja za promet (24). Centralizirani postopek je postopek pridobitve dovoljenja za promet z zdravilom v Evropski uniji, kakor ga določa Uredba 726/2004/ES. Decentralizirani postopek je postopek za pridobitev dovoljenja za promet z zdravilom, ki se začne hkrati v referenčni in v zadevnih državah članicah Evropske unije. Obvezen je za zdravila, ki se ne obravnavajo po centraliziranem postopku in še niso pridobila dovoljenja za promet z zdravilom v Evropski uniji in ki bodo na trgu v več kakor eni državi članici Evropske unije, kakor to določata Direktiva 2001/83/ES in Direktiva 2001/82/ES (23, 25, 26).

1.5.4.3 Posebne zahteve za dokumentacijo za tradicionalna zdravila rastlinskega izvora

Poleg splošnih zahtev za zdravila mora farmacevtsko-kemična in biološka dokumentacija za registracijo tradicionalnega zdravila rastlinskega izvora smiselno glede na vsebino vsebovati naslednje podatke o rastlinskih snoveh in pripravkih rastlinskega izvora:

a) Podatke v zvezi z nomenklaturo rastlinske snovi:

- binominalno znanstveno ime rastline (rod, vrsta, varieteta in avtor),
- del rastline,
- opis rastlinske snovi,
- druga imena (sopomenke, navedene v drugih farmakopejah),

- laboratorijsko oznako.

b) Podatke v zvezi z nomenklaturo pripravka rastlinskega izvora:

- binominalno znanstveno ime rastline (rod, vrsta, varieteta in avtor),
- del rastline,
- opis pripravka rastlinskega izvora,
- razmerje med rastlinsko snovjo in pripravkom rastlinskega izvora,
- ekstrakcijsko topilo,
- druga imena (sopomenke, navedene v drugih farmakopejah),
- laboratorijsko oznako.

c) Podatke o strukturi rastlinske snovi in pripravka rastlinskega izvora:

- fizikalno stanje,
- opis sestavin s poznanim zdravilnim učinkom ali označevalcev (molekulska formula, relativna molekulska masa, strukturna formula, vključno s stereoizomerijo),
- opis drugih sestavin.

d) Podatke o izdelovalcu rastlinske snovi:

- ime, naslov in odgovornost vsakega pridelovalca oziroma dobavitelja, vključno s pogodbeniki,
- vsako predlagano lokacijo ali objekt, vključen v pridelavo oziroma nabiranje in preskušanje rastlinske snovi,
- podatke o zagotavljanju sistema kakovosti.

e) Podatke o izdelovalcu pripravka rastlinskega izvora:

- ime, naslov in odgovornost vsakega izdelovalca, vključno s pogodbeniki,
- vsako predlagano lokacijo ali objekt, vključen v izdelavo in preskušanje pripravka rastlinskega izvora,
- podatke o izpolnjevanju načel dobre proizvodne prakse.

f) Podatke o postopku izdelave rastlinske snovi in kontroli postopka, ki opisujejo:

- pridelavo in nabiranje rastlin, vključno z geografskim izvorom zdravilne rastline,
- pogoje gojenja, pridelovanja, sušenja in shranjevanja,
- velikost serij.

g) Podatke o postopku izdelave pripravka rastlinskega izvora in kontrolah postopka, ki opisujejo:

- postopek izdelave, vključno s shemo postopka,
- topila in reagente,
- faze čiščenja,
- standardizacijo,
- velikost serij.

h) Kratek povzetek o razvoju postopka izdelave rastlinske snovi in pripravka rastlinskega izvora ob upoštevanju predlaganega načina uporabe. Primerjati je treba, kjer je to primerno, fitokemično sestavo rastlinskih snovi in pripravkov rastlinskega izvora, navedeno v literaturi, ter fitokemično sestavo tistih rastlinskih snovi in pripravkov rastlinskega izvora, ki jih kot učinkovine vsebuje tradicionalno zdravilo rastlinskega izvora, ki je predmet vloge.

i) Razlago strukture in drugih značilnosti rastlinske snovi s podatki o botaničnih, makroskopskih, mikroskopskih in fitokemičnih lastnostih, ter če je potrebno, o biološki aktivnosti.

j) Razlago strukture in drugih značilnosti pripravka rastlinskega izvora s podatki o fitokemični sestavi in fizikalno-kemijskih lastnostih, ter če je potrebno, o biološki aktivnosti.

k) Specifikacije rastlinske snovi in pripravka rastlinskega izvora.

l) Podatke o analiznih postopkih, ki se uporabljajo za preskuse rastlinske snovi in pripravka rastlinskega izvora.

m) Podatke o validaciji analiznih postopkov za preskušanje rastlinske snovi in pripravka rastlinskega izvora.

n) Podatke o serijah in rezultate analiz serij rastlinske snovi in pripravka rastlinskega izvora.

o) Utemeljitev specifikacij rastlinske snovi in pripravka rastlinskega izvora.

p) Podatke o referenčnih standardih ali referenčnih snoveh, uporabljenih za preskušanje rastlinske snovi in pripravka rastlinskega izvora.

r) Kratek povzetek razvoja formulacije (sestave in farmacevtske oblike) tradicionalnega zdravila rastlinskega izvora ob upoštevanju predlaganega načina uporabe. Primerjati je treba, kjer je to primerno, fitokemično sestavo zdravila oziroma zdravil rastlinskega izvora, navedeno v literaturi, ter fitokemično sestavo tradicionalnega zdravila rastlinskega izvora, ki je predmet vloge.

Kadar je rastlinska snov ali pripravek rastlinskega izvora predmet monografije Evropske farmakopeje, predlagatelj lahko zaprosi za certifikat ustreznosti Evropske direktije za kakovost zdravil (EDQM). Podatke o rastlinski snovi iz prvega in drugega odstavka je treba predložiti tudi, če je učinkovina v tradicionalnem zdravilu rastlinskega izvora pripravek rastlinskega izvora (24).

1.5.4.4 Oblika in način predložitve vloge za registracijo tradicionalnega zdravila rastlinskega izvora

Podatke in dokumente v vlogi za registracijo tradicionalnega zdravila rastlinskega izvora mora predlagatelj predložiti v obliki skupnega tehničnega dokumenta (CTD), pri čemer mora smiselno uporabljati določbe predpisa o dovoljenju za promet z zdravilom za uporabo v humani medicini, ter upoštevati navodila in smernice, ki jih je Evropska komisija objavila v pravilih, ki urejajo zdravila v Evropski skupnosti, The rules governing medicinal products in the European Union, Volume 2, Notice to applicants, Medicinal products for human use, European Commission, Directorate General III – Pharmaceuticals and Cosmetics (podrobnejša navodila skupine za usklajevanje (Coordination Group for Mutual Recognition and Decentralised Procedure, Human Medicinal Products; v nadaljnjem besedilu: CMD(h); spletna stran: <http://heads.medagencies.org/>) ter smernice, ki jih organ, pristojen za zdravila, objavi na svoji spletni strani: <http://www.mz.gov.si> oziroma zadnjem relevantnem spletnem naslovu.

Za način predložitve vloge za registracijo tradicionalnega zdravila rastlinskega izvora se smiselno uporablja predpis o dovoljenju za promet z zdravilom za uporabo v humani medicini (24).

1.5.4.5 Označevanje tradicionalnega zdravila rastlinskega izvora

Tradicionalno zdravilo rastlinskega izvora mora biti označeno in imeti navodilo za uporabo v skladu s predpisi o označevanju zdravil in navodilu za uporabo. Poleg tega morata ovojnina in navodilo za uporabo vsebovati še navedbe, da:

- gre za tradicionalno zdravilo rastlinskega izvora za navedeno področje uporabe, ki temelji izključno na podlagi dolgotrajnih izkušenj;
- naj se uporabnik posvetuje z zdravnikom ali s farmacevtom, če se znaki bolezni med uporabo zdravila ne izboljšajo ali če se pojavijo neželeni učinki, ki niso navedeni v navodilu za uporabo. V posameznih primerih organ, pristojen za zdravila, lahko zahteva, da je na ovojnini in v navodilih za uporabo navedena tudi vrsta tradicije (24).

1.5.4.6 Oglaševanje tradicionalnega zdravila rastlinskega izvora

Poleg zahtev predpisov o oglaševanju zdravil mora vsako oglaševanje tradicionalnega zdravila rastlinskega izvora, vsebovati še naslednjo navedbo:

» je tradicionalno zdravilo rastlinskega izvora za navedeno področje uporabe, ki temelji izključno na podlagi dolgotrajnih izkušenj.«

Navedba mora biti glede na vrsto medija v pisni ali govorni obliki. Pisna navedba mora biti poudarjena (npr.: krepko, barvno izstopajoče, v okviru) v taki velikosti črk, da jo je mogoče normalno prebrati in je ni mogoče spregledati. Govorna navedba mora biti razločna in razumljiva. Pri oglasih na medmrežju mora biti navedba prikazana kot sestavni del glavne strani oglasa in ne kot povezava nanjo (24).

1.5.5 Prehransko dopolnilo

Prehranska dopolnila so živila, katerih namen je dopolnjevati običajno prehrano. So koncentrirani viri posameznih ali kombiniranih hranil ali drugih snovi s hranilnim ali fiziološkim učinkom, ki se dajejo v promet v obliki kapsul, pastil, tablet in drugih podobnih oblikah, v vrečkah s praškom, v ampulah s tekočino, v kapalnih stekleničkah in v drugih podobnih oblikah s tekočino in praškom, ki so oblikovane tako, da se jih lahko uživa v odmerjenih majhnih količinskih enotah.

Pogoje, ki jih morajo izpolnjevati prehranska dopolnila, ki se dajejo v promet kot živila in se predstavljajo kot prehranska dopolnila morajo izpolnjevati pogoje po Pravilniku o prehranskih dopolnilih.

Prehranska dopolnila se lahko dajo v promet le kot predpakirana živila.

Prehranska dopolnila, ki vsebujejo rastline in rastlinske izvlečke morajo biti v skladu s predpisom, ki ureja razvrstitev zdravilnih rastlin.

Pri označevanju, predstavljanju in oglaševanju se prehranskim dopolnilom ne sme pripisovati lastnosti preprečevanja, zdravljenja ali ozdravljenja bolezni pri ljudeh. Pri navajanju lastnosti prehranskega dopolnila se lahko navajajo le z znanstvenimi dokazi potrjeni učinki. Označevanje, predstavitev in oglaševanje prehranskih dopolnil ne sme vsebovati navedb, ki bi navajale ali pomenile, da uravnotežena in raznovrstna prehrana ne more zagotoviti ustreznih količin hranil. Prehranska dopolnila morajo biti označena kot »prehransko dopolnilo«. Poleg pogojev iz predpisa, ki ureja splošno označevanje predpakiranih živil, mora označba prehranskega dopolnila vsebovati še naslednje podatke:

- Imena vrste hranil ali snovi, ki so značilne za prehransko dopolnilo ali podatek o naravi hranil ali snovi.
- Priporočena dnevna količina oziroma odmerek prehranskega dopolnila.
- Opozorilo: "Priporočene dnevne količine oziroma odmerka se ne sme prekoračiti".
- Navedba: "Prehransko dopolnilo ni nadomestilo za uravnoteženo in raznovrstno prehrano".
- Opozorilo: "Shranjevati nedosegljivo otrokom!" (30, 31).

1.5.6 Galenski izdelek

Galenski izdelek za uporabo v humani medicini je zdravilo, ki ga pripravijo v galenskem laboratoriju lekarne v skladu z veljavnimi farmakopejami in je namenjen za izdajo na drobno v zadevni lekarni. Galenski izdelek spada med izjeme glede uporabe Zakona o zdravilih, ker se določbe tega zakona ne uporabljajo za galenske izdelke. Galenske izdelke urejajo predpisi o lekarniški dejavnosti (23, 34, 36).

Galenski izdelek je zdravilo, ki se izda v lekarni brez recepta (33).

Oglaševanje je predpisano v Pravilniku o oglaševanju zdravil in medicinskih pripomočkov (35). Prepovedano je oglaševanje v javnosti in neposredno obveščanje o zdravilih, za katera ni bilo izdano dovoljenje za promet v skladu z zakonom.

Galenski izdelki, ki se izdajajo v lekarnah, morajo biti označeni na zunanji ovojnini, kolikor zunanje ovojnine ni, pa na stični ovojnini, z naslednjimi podatki v slovenskem jeziku:

- ime galenskega izdelka,
- navedba »galenski izdelek«,
- farmacevtska oblika,
- vsebina, izražena v enotah mase, prostornine ali v številu enot zdravila,
- količinska navedba zdravilnih učinkovin,
- navedba pomožnih snovi,
- področje uporabe,
- način uporabe in odmerjanje zdravila,
- opozorilo: »Zdravilo shranjujte nedosegljivo otrokom!«,
- druga opozorila, če so potrebna,
- pogoji shranjevanja,
- številka serije,
- datum izteka roka uporabnosti,
- ime in naslov proizvajalca,

- način izdaje,
- posebni varnostni ukrepi za odstranjevanje neuporabljenih zdravil ali iz njih nastalih odpadnih snovi, kadar so potrebni, kot tudi napotitev na ustrezen uveljavljen sistem zbiranja teh snovi,
- pri zdravilih, ki ustrezajo definiciji tradicionalnega zdravila rastlinskega izvora, navedbi, da gre za tradicionalno zdravilo rastlinskega izvora za navedeno področje uporabe, ki temelji izključno na podlagi dolgotrajnih izkušenj in da naj se uporabnik posvetuje z zdravnikom ali s farmacevtom, če so znaki bolezni med uporabo zdravila ne izboljšajo ali če se pojavijo neželeni učinki, ki niso navedeni v navodilu za uporabo,
- če je izdelku priloženo navodilo za uporabo, poudarjeno opozorilo: »Pred uporabo preberite priloženo navodilo!«.

Galenski izdelki, ki so namenjeni nadaljnji uporabi v lekarni, morajo biti označeni na zunanji ovojnini, kolikor zunanje ovojnine ni, pa na stični ovojnini, z naslednjimi podatki v slovenskem jeziku:

- ime zdravila,
- navedba »galenski izdelek«,
- farmacevtska oblika,
- vsebina, izražena v enotah mase, prostornine ali v številu enot zdravila,
- kakovostna in količinska navedba zdravilnih učinkovin,
- pogoji shranjevanja,
- številka serije,
- datum izteka roka uporabnosti,
- ime in naslov proizvajalca (37).

Galenski izdelki, ki se izdajajo v lekarnah, morajo imeti navodilo za uporabo v slovenskem jeziku, pri čemer se smiselno uporabljajo določbe Pravilnika o označevanju zdravil in navodilu za uporabo (Uradni list RS, št. 54/06).

2. NAMEN DELA

Trenutna situacija na področju rastlinskih pripravkov, ki vsebujejo pegasti badelj, ne predpisuje ustrezne analizne metode, s katero bi lahko ovrednotili naš izdelek in dokazali primerno stabilnost. V literaturi obstajajo opisi analiznih metod za določevanje silimarina v ekstraktu pegastega badlja, ne obstaja pa predpisana metoda za določevanje silimarina v rastlinskih pripravkih, zaradi česar Galenski laboratorij nima analizne metode za kvantitativno določevanje učinkovine v izdelku.

Cilj razvoja HPLC metode za vrednotenje silimarina v tabletah pegastega badlja je validirana metoda s primernimi karakteristikami, ki bo omogočala zanesljivo spremljanje vsebnosti učinkovine za potrjevanje kakovosti rastlinskih pripravkov in dokazovanje njihove stabilnosti.

V ta namen nameravamo na osnovi obstoječih podatkov iz literature in trenutnih zahtev v proizvodnji rastlinskih pripravkov razviti takšno HPLC metodo, da bo dosegala predvidene kriterije, ter nato potrditi njeno uporabnost tudi pri izvedbi stabilnostnih študij. V prvem delu bomo optimizirali iz literature poznano obstoječo metodo, ki predpisuje določevanje

silimarina v ekstraktu pegastega badlja tako, da bo metoda ustrezna za določevanje silimarina v tabletah pegastega badlja. Doseči želimo predvsem krajše čase analize, zmanjšati porabo topil in zagotoviti ustrezno selektivnost, tako da bomo zadostili kriterijem analiznega laboratorija.

Po opravljenem razvojnem delu bomo metodo dokončno validirali in podatke statistično obdelali. Na njihovi osnovi rezultatov bomo lahko potrdili uporabnost razvite metode za predviden namen.

Po končani validaciji HPLC metode bomo pripravili obširno poročilo, ki bo vključevalo vse validacijske preizkuse in rezultate. Napisano bo dovolj podrobno, da bo lahko vsak izkušen analitik z ustrezno opremo ponovil opravljene preizkuse. Pripravili bomo tudi standardni operacijski postopek (SOP) za rutinsko analitiko.

Zatem nameravamo metodo uporabiti v dolgoročni stabilnostni študiji, s katero želimo spremljati obstojnost izdelka pri deklariranih eksperimentalnih pogojih. S tem želimo hkrati potrditi dolgoročno uporabnost metode in potrditi kakovost obravnavanih izdelkov z vidika obstojnosti.

3. EKSPERIMENTALNO DELO

3.1 Materiali in metode

3.1.1 Kemikalije

- Visoko prečiščena voda (električna prevodnost = 0,064 $\mu\text{S}/\text{cm}$)

Uporabljen je bil sistem za visoko prečiščeno vodo

Proizvajalec: Micro Pure

Model: 08.1204 - ST

- Metanol (Sigma - Aldrich)
- 85 % H_3PO_4 (Sigma - Aldrich)

Instrumentalna oprema za določanje vsebnosti učinkovine

Uporabljen je bil instrument HPLC Bischoff, sestavljen iz naslednjih delov:

- črpalka Bischoff 2250
- črpalka Bischoff
- detektor : spektrofotometer Lambda 1010
- interface
- vzorčevalnik
- pečica Variotherm Bischoff
- računalnik: BiroCom
- printer : HP Laser Jet 5P

Zajemanje podatkov in njihova obdelava je bila vodena z računalniškim programom McDacq 32 (Bischoff Chromatography Data System, Version 1,46).

Statistična obdelava podatkov je bila izvedena z računalniškim programom (61).

3.1.2 Instrumentalna oprema za izvajanje stabilnostnih študij

Uporabljeni so bili naslednji instrumenti:

- Klima komora za izvajanje dolgoročne študije stabilnosti

Proizvajalec: BINDER TUTTLINGEN

Model: KBF240

- Klima komora za izvajanje pospešene študije stabilnosti

Proizvajalec: BINDER TUTTLINGEN

Model: KBF240

- Precizna tehtnica

Proizvajalec: METTLER

Model: P1210N

- Naprava za preizkušanje razpadnosti

Proizvajalec: Erweka

Model: ZT21

- Naprava za preizkušanje trdnosti

Proizvajalec: Erweka

Model: TDH300 20

- Naprava za preizkušanje krušljivosti

Proizvajalec: Erweka

Model: TA10

- Instrument za določanje vsebnosti učinkovine

HPLC Bischoff

3.1.3 Postopki priprave mobilnih faz in vzorcev

Priprava mobilnih faz razvoja, validacije in stabilnostnih študij

- Sestava mobilne faze A:

85% fosforjeva kislina, metanol, voda = 0,5 : 35 : 65 V / V / V

- Sestava mobilne faze B:

85% fosforjeva kislina, metanol, voda = 0,5 : 50 : 50 V / V / V

Priprava vzorcev za razvojno fazo

- Priprava standardne raztopine:

43,2 mg standarda predstavlja 100 % količino silibinina A in B v tableti. 43,2 mg standarda smo raztopili v 40 ml metanola in raztopino postavili na ultrazvočno kopel. Po 20 minutah smo raztopino ohladili na 20 °C in jo dopolnili z metanolom do 100,0 ml.

- Priprava vzorcev ekstrakta pegastega badlja:

198 mg ekstrakta ustreza količini ekstrakta v tableti. 198 mg smo raztopili v 90 ml metanola in raztopino postavili na ultrazvočno kopel. Po 20 minutah smo raztopino ohladili na 20 °C in jo dopolnili z metanolom do 100,0 ml. Raztopino smo najprej prefiltrirali skozi naguban filter papir in nato še 5 ml prefiltrirali skozi 0,45 µm membranski filter.

- Priprava vzorcev:

V terilnici smo zdrobili in premešali 20 tablet. Tako smo dobili homogeno maso. 600 mg vzorca ustreza teži ene tablete. 600 mg homogene mase smo raztopili v 90 ml metanola in raztopino postavili na ultrazvočno kopel. Po 20 minutah smo raztopino ohladili na 20 °C in

jo dopolnili z metanolom do 100,0 ml. Raztopino smo najprej prefiltrirali skozi naguban filter papir in nato še 5 ml prefiltrirali skozi 0,45 μ m membranski filter. Vzorce smo redčili na koncentracijo 6 mg tablete / ml.

Priprava vzorcev za validacijo

- Priprava standardne raztopine:

Pripravili smo tri serije analiz za linearnost silibinina na petih koncentracijskih nivojih (preglednica 6).

Preglednica 6:

Enota	1. nivo	2. nivo	3. nivo	4. nivo	5. nivo
% silibinina / tableto	50	75	100	125	150
mg silibinina / 100 ml	21,6	32,4	43,2	54,0	64,8

Standard določene mase smo raztopili v 40 ml metanola in raztopino postavili na ultrazvočno kopel. Po 20 minutah smo raztopino ohladili na 20 °C in jo dopolnili z metanolom do 100,0 ml.

- Priprava vzorcev serij izdelka:

Pripravili smo si vzorce treh zaporednih serij izdelka. Za vsako serijo smo pripravili šest vzorcev na dan, tri dni zaporedoma. Vzorce smo si pripravljali vsak dan sproti. Vsak vzorec smo izmerili vsaj trikrat. Vzorce smo redčili na koncentracijo 6mg tablete / ml.

V terilnici smo zdrobili in premešali 20 tablet posamezne serije. Tako smo dobili homogeno maso.

600 mg vzorca smo raztopili v 90 ml metanola in raztopino postavili na ultrazvočno kopel. Po 20 minutah smo raztopino ohladili na 20 °C in jo dopolnili z metanolom do 100,0 ml. Raztopino smo najprej prefiltrirali skozi naguban filter papir in nato še 5 ml prefiltrirali skozi 0,45 μ m membranski filter.

Priprava vzorcev za študijo stabilnosti

Izbrali smo reprezentativne vzorce treh zaporednih serij končnega izdelka. Iz vsake serije smo izbrali 27 končnih izdelkov za dolgoročno študijo stabilnosti in 27 končnih izdelkov za pospešeno študijo stabilnosti.

3.2 Kromatografski pogoji končne optimizirane metode

- VZOREC

Tablete z ekstraktom pegastega badlja

- INJICIRANJE

Volumen: 10 μ L

Način: polno polnjenje zanke z uporabo vzorčevalnika

- MOBILNA FAZA

A: fosforjeva kislina, metanol, voda = 0,5 : 35 : 65 V / V / V

B: fosforjeva kislina, metanol, voda = 0,5 : 50 : 50 V / V / V

- PRETOK

0,8 ml / min

- TEMPERATURA

25 °C

- METODA

Gradientna metoda:

Čas (min)	Mobilna faza A	Mobilna faza B
-----------	----------------	----------------

0 – 31	100 → 0	0 → 100
31 – 35	0	100
35 – 39	0 → 100	100 → 0
39 – 55	100	0

- SEZNAM KOMPONENT

silikristin, silidianin, silibinin A, silibinin B, izosilibinin A, izosilibinin B

- DETEKTOR:

UV – VIS detektor (288 nm)

- KOLONA

Stacionarna faza: Eurospher 100 C18

Dolžina: 120 mm

Notranji premer: 4 mm

Velikost delcev: 5 μ m

Temperatura kolone: 25 °C

- STANDARD

USP standard Silibinin

3.3 Pogoji za izvajanje stabilnostne študije

- VZOREC

Rastlinski pripravek kot končni izdelek Hepabion FORTE

- KOMORA ZA DOLOČANJE DOLGOROČNE STABILNOSTI

Proizvajalec: BINDER TUTTLINGEN

Model: KBF240

Temperatura v komori: 25 °C $\pm$ 2 °C

Relativna vlažnost v komori: 60% RH $\pm$ 5% RH

Čas izpostavitve vzorcev: tri in šest mesecev

- KOMORA ZA DOLOČANJE POSPEŠENE STABILNOSTI

Proizvajalec: BINDER TUTTLINGEN

Model: KBF240

Temperatura v komori: 40 °C $\pm$ 2 °C

Relativna vlažnost v komori: 75% RH $\pm$ 5% RH

Čas izpostavitve vzorcev: tri in šest mesecev

3.3.1 Postopki izvedbe stabilnostne študije

- Dolgoročna študija stabilnosti

Za začetno preverjanje izdelka Hepabion Forte smo uporabili tri vzorce posamezne serije. Preverjanje smo izvedli na treh zaporednih serijah izdelka po predpisanih specifikacijah v odobrenem osnutku standardno operacijskega postopka.

Nato smo reprezentativne vzorce izdelka Hepabion Forte izpostavili predpisanim pogojem za dolgoročno študijo stabilnosti. Izpostavili smo vzorce treh zaporednih serij. Za vsako serijo smo izpostavili po tri vzorce za obdobje treh mesecev in po tri vzorce za obdobje šestih mesecev.

- Pospešena študija stabilnosti

Za začetno preverjanje izdelka Hepabion Forte smo uporabili tri vzorce posamezne serije. Preverjanje smo izvedli na treh zaporednih serijah izdelka po predpisanih specifikacijah v odobrenem osnutku standardno operacijskega postopka.

Nato smo reprezentativne vzorce izdelka Hepabion Forte izpostavili predpisanim pogojem za pospešeno študijo stabilnosti. Izpostavili smo vzorce treh zaporednih serij. Za vsako serijo smo izpostavili po tri vzorce za obdobje treh mesecev in po tri vzorce za obdobje šestih mesecev.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Razvoj analizne metode

V literaturi smo zasledili opise vrednotenja silimarina, vendar se to vrednotenje ne nanaša na določevanje silimarina v rastlinskem pripravku. V določenih člankih zasledimo opise določevanja silimarina v človeški plazmi in urinu (58, 59). Prav tako določevanje silimarina predpisuje evropska farmakopeja, vendar je postopek vezan na določevanje silimarina iz posušenega sadeža pegastega badlja (7). Ameriška farmakopeja 29 (48) in DAB 2003 opisujeta analizno metodo določevanja silimarina iz ekstrakta pegastega badlja in predstavljata izhodišče naše raziskave.

Najprej smo nastavili kromatografske pogoje predpisane v DAB 2003. Pripravili smo vzorce razvojne faze, kot je opisano v 3.1.4. Pri pogojih opisanih v DAB 2003 smo posneli kromatograme standarda, ekstrakta in izdelka.

DAB 2003 predpisuje štiri referenčne raztopine (silibinin, silikristin, silidianin, isosilibinin). Na tržišču v danem trenutku ni bilo ponudbe za vse štiri standarde. Ponujali so silimarinsko skupino, ki ni imela predpisane vsebnosti posameznih komponent, ampak celokupno vrednost učinkovin. Odločili smo se za uporabo standarda silibinina predpisanega po ameriški farmakopeji. Uporabljen standard vsebuje in ima predpisane posamezne koncentracije silibinina A in silibinina B. Posneti kromatogrami so bili ustrezni z dobro ločitvijo posameznih komponent (silibinin A, silibinin B).

Posneti kromatogrami ekstrakta in vzorca izdelka so pokazali naslednja odstopanja:

- Učinkovine so se eluirale šele med 42 in 51 minuto, kar je za potrebe analiznega laboratorija predolg čas analize.
- Izosilibinina A in B sta imela izredno slabo ločljivost.
- V vzorcih ekstrakta in izdelka se je silidianin izločil v zelo nizkih koncentracijah.
- Slaba ponovljivost.

Najprej smo se lotili reševanja problema z retenzijskimi časi in problema slabe ločljivosti silibinina A in silibinina B. Za doseg hitrih in učinkovitih analiz smo spreminjali naslednje sistemske parametre: kolono (dolžino, velikost delcev in notranji premer), temperaturo na koloni, zanko (velikost zanke, način in količino injiciranja), pretok in sestavo mobilne faze ter gradient. Problema smo odpravili s spreminjanjem gradientnih pogojev. Časovne intervale uporabe posamezne mobilne faze smo spreminjali toliko časa, da smo dosegli dobro ločitev izosilibinina A in izosilibinina B. Prav tako smo z določitvijo novih gradientnih pogojev dosegli krajše retenzijske čase in s tem skrajšali čas analize.

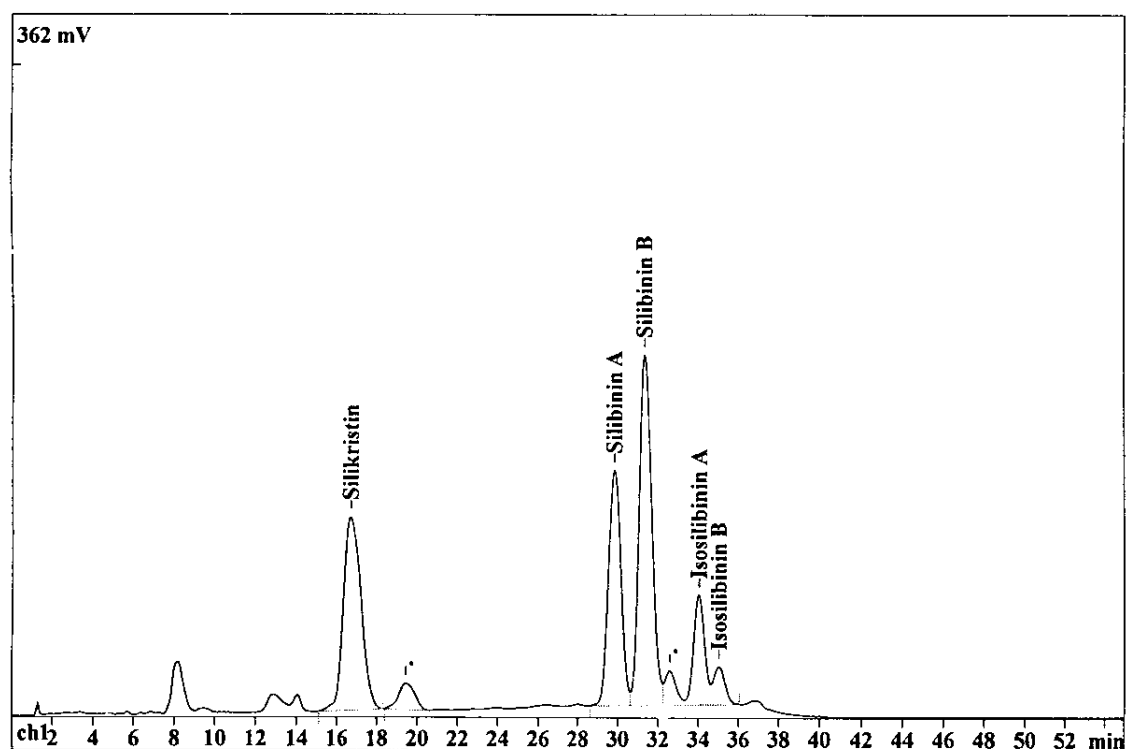
Še vedno se je pojavljal problem detekcije silidianina, ki je imel izredno majhno ploščino pod kromatografskim vrhom. Pri tako majhni ploščini nikakor nismo uspeli zagotoviti ponovljivosti rezultatov za silidianin. Evropska farmakopeja omenja možnost variranja ploščine kromatografskega vrha silidianina. Omenja tudi, da je lahko kromatografski vrh silidianina odsoten ali pa se pojavi kot največji v kromatogramu. Ponovljivost za celotni kromatogram je mogoče doseči samo v primeru, če dosežemo ponovljivost vseh kromatografskih vrhov v kromatogramu. Ker predstavlja kromatografski vrh silidianina nepomemben vpliv na določitev celotne vsebnosti silimarina, smo se odločili da bomo detekcijo silidianina izločili. To smo dosegli s spremembo integracijskih pogojev, ki smo

jih nastavili tako, da v izračunu nismo upoštevali ploščine pod kromatografskim vrhom manjše kot jo zaznamo za silidianin.

Naslednji problem, ki se je pojavil, je bila zelo slaba ponovljivost. Težavo smo odpravili z zamenjavo zanke. Prva uporabljena zanka je imela volumen 20 μL , pri kateri smo nastavili delno injiciranje. Zanko smo zamenjali z 10 μL zanko in nastavili polno injiciranje. Povečali smo tudi spiranje zanke z metanolom R med posameznimi injiciranjmi. Posledično smo dosegli ponovljivost rezultatov.

S spremembo pogojev smo dosegli, da je nova metoda ustrezna za naš izdelek in izpolnjuje vse kriterije analiznega laboratorija. Razvita gradientna metoda tekočinske kromatografije prav tako dosega primerne hitrosti glede na potrebe analiznega laboratorija. Z novo metodo smo tudi povečali število analiziranih vzorcev na časovno enoto. Posledično smo z razvojem nove metode znižali stroške analitike, tako da je cenovno ugodna v smislu manjše porabe organskih topil, kar pa je tudi ugodno s stališča varstva okolja.

Končni rezultat je optimizirana metoda, ki zagotavlja selektivnost, ima krajše retencijske čase in je ponovljiva.



Slika 6: Kromatogram tablet z ekstraktom pegastega badlja.

4.2 Validacija

Naslednji korak je bila izvedba validacije metode. V okviru validacije smo preverjali naslednje parametre: specifičnost, linearnost, delovno območje, natančnost in točnost. Med validacijskim procesom smo določili minimalne kriterije izbranim validacijskim parametrom, katerim je morala metoda zadostiti. Ustreznost ugotovljenih karakteristik smo preverili in potrjevali s primerno statistično analizo. Ker je metoda zadostila postavljenim validacijskim kriterijem, smo novo metodo izbrali kot ustrezno.

Z validacijo metode smo ugotovili, da je metoda selektivna in ustrezna za predvideno uporabo. Zato lahko novo validirano metodo vgradimo v koncept zagotavljanja kvalitete, varnosti in učinkovitosti farmacevtskega izdelka.

4.2.1 Meritve standardnih raztopin in vzorcev

Pripravili smo vzorce za validacijo, kot je opisano v poglavju 3.1.4. Najprej smo izmerili tri serije kalibracijskih raztopin na petih koncentracijskih nivojih. Rezultate meritev smo predstavili v preglednici 7 in 8. Sledila je priprava vzorcev treh zaporednih serij izdelka kot je opisano v poglavju 3.1.4. Rezultate meritev smo predstavili v preglednicah 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 in 17. Po predpisih analiznega laboratorija mora biti relativni standardni odklik za meritve nižji od 2 %. Relativni standardni odklik za vse izvedene meritve je nižji od 2 %, kar pomeni, da je bil sistem v času izvajanja meritev stabilen.

Preglednica 7: Meritve standardnih raztopin silibinina A (umeritvene premice)

	Koncentracija silibinina A in B (mg/ml)	A ₁	A ₂	A ₃
50%	0,217	3106,1	3174,2	3182,1
	0,211	3252,4	3225,1	3188,5
	0,211	3338,7	3320,7	3318,6
75%	0,326	4801,7	4740,7	4767,5
	0,325	4905,8	4990,4	4980,9
	0,326	4757,0	4886,6	4808,9
100%	0,432	6313,9	6353,9	6386,1
	0,434	6318,7	6500,0	6266,9
	0,430	6451,0	6253,9	6470,6
125%	0,542	8204,8	7950,2	8097,3
	0,549	8212,5	7972,7	7903,4
	0,540	8291,5	7966,9	7810,4
150%	0,650	9771,2	9442,8	9764,4

	0,660	9925,5	9801,3	9716,7
	0,663	10192,6	10200,8	10199,5

Merjenje ploščine kromatografskega vrha na različnih koncentracijskih nivojih za standard **silibinina A**.

Preglednica 8: Meritve standardnih raztopin silibinina B (umeritvene premice)

	Koncentracija silibinina A in B (mg/ml)	A ₁	A ₂	A ₃
50%	0,217	3259,6	3274,4	3271,7
	0,211	3355,2	3331,5	3253,8
	0,211	3428,4	3394,2	3412,8
75%	0,326	4943,6	4963,9	4895,9
	0,325	5216,9	5153,1	5202,7
	0,326	4923,6	5025,5	5021,3
100%	0,432	6476,8	6563,4	6565,1
	0,434	6686,4	6861,3	6668,1
	0,430	6761,6	6551,1	6878,7
125%	0,542	8474,6	8276,3	8349,2
	0,549	8383,5	8217,0	8262,7
	0,540	8574,9	8156,7	8122,4
150%	0,650	10071,9	9916,8	10076,3
	0,660	10188,7	10039,6	10097,9
	0,663	10492,9	10499,2	10498,3

Merjenje ploščine kromatografskega vrha na različnih koncentracijskih nivojih za standard **silibinina B**.

- Merjenje kromatografskih vrhov vzorcev 1.SERIJE – 1.dan

Vzorec 1 = 600,2 mg/100ml

Vzorec 4 = 600,6 mg/100ml

Vzorec 2 = 600,5 mg/100ml

Vzorec 5 = 600,0 mg/100ml

Vzorec 3 = 600,2 mg/100ml

Vzorec 6 = 600,2 mg/100ml

Preglednica 9: Merjenje ploščin kromatografskih vrhov silikristina, silidianina, silibinina in isosilibinina v vzorcih tablet z ekstraktom pegastega badlja

SILIKRISTIN					SILIDIANIN			
Vzorec	A ₁	A ₂	A ₃	Å	A ₁	A ₂	A ₃	Å
1	6277,8	6535,4	6761,3	6524,8	0	0	0	0
2	6471,1	6783,9	650,6	6598,5	0	0	0	0
3	6482,2	6131,4	6291,1	6301,6	0	0	0	0
4	6296,7	6386,4	6561,9	6415,0	0	0	0	0
5	6533,0	6479,3	6423,6	6478,6	0	0	0	0

6	6666,8	6729,1	6496,5	6630,8	0	0	0	0
SILIBININ A					SILIBININ B			
Vzorec	A ₁	A ₂	A ₃	Å	A ₁	A ₂	A ₃	Å
1	5290,7	5588,9	5685,2	5521,6	7811,8	8264,5	8395,9	8157,4
2	5623,2	5638,7	5535,9	5599,3	8194,2	8336,3	8216,1	8248,9
3	5504,4	5267,3	5592,8	5454,8	8122,3	7670,1	8203,3	7998,6
4	5338,5	5329,1	5484,8	5384,1	7861,6	7964,2	8182,2	8002,7
5	5748,1	5478,2	5492,8	5573,0	8625,5	8089,8	8106,9	8274,1
6	5637,8	5742,7	5567,7	5649,4	8433,5	8492,6	8240,1	8388,7
ISOSILIBININ A					ISOSILIBININ B			
Vzorec	A ₁	A ₂	A ₃	Å	A ₁	A ₂	A ₃	Å
1	2158,6	2277,3	2316,6	2250,8	765,4	812,3	821,8	799,8
2	2248,1	2291,9	2259,7	2266,6	819,5	853,7	851,2	841,5
3	2233,6	2104,5	2180,6	2172,9	824,8	765,9	788,5	793,1
4	2158,4	2187,7	2256,5	2200,9	798,9	828,6	830,6	819,4
5	2359,1	2219,8	2236,5	2271,8	870,1	834,5	809,8	838,1
6	2323,5	2353,5	2264,7	2313,9	844,1	827,6	810,9	827,5

- Merjenje kromatografskih vrhov vzorcev 1.SERIJE – 2.dan

Vzorec 1 = 600,2 mg/100ml

Vzorec 4 = 600,2 mg/100ml

Vzorec 2 = 599,6 mg/100ml

Vzorec 5 = 600,5 mg/100ml

Vzorec 3 = 600,5 mg/100ml

Vzorec 6 = 600,2 mg/100ml

Preglednica 10: Merjenje ploščin kromatografskih vrhov silikristina, silidianina, silibinina in isosilibinina v vzorcih tablet z ekstraktom pegastega badlja

SILIKRISTIN					SILIDIANIN			
Vzorec	A ₁	A ₂	A ₃	Å	A ₁	A ₂	A ₃	Å
1	6619,9	6685,2	6666,5	6657,2	0	0	0	0
2	6936,4	6648,8	6603,9	6729,7	0	0	0	0
3	6360,6	6376,9	6485,9	6407,8	0	0	0	0
4	6544,1	6585,6	6557,9	6562,5	0	0	0	0

5	5990,5	6405,7	6709,4	6368,5	0	0	0	0
6	7283,5	7169,7	7395,6	7282,9	0	0	0	0
SILIBININ A					SILIBININ B			
Vzorec	A ₁	A ₂	A ₃	Ä	A ₁	A ₂	A ₃	Ä
1	5590,6	5712,8	5563,8	5622,4	8309,9	8416,1	8335,1	8353,7
2	5900,4	5576,4	5576,4	5684,4	8681,7	8240,9	8236,7	8386,4
3	5334,2	5402,5	5390,2	5375,6	7857,9	8040,4	8138,8	8012,4
4	5414,8	5501,4	5546,0	5487,4	8123,7	8176,9	8223,1	8174,6
5	5173,3	5472,7	5689,0	5445,0	7637,7	8110,3	8369,1	8039,0
6	6252,9	6124,0	6318,9	6231,9	9192,1	9071,9	9344,7	9202,9
ISOSILIBININ A					ISOSILIBININ B			
Vzorec	A ₁	A ₂	A ₃	Ä	A ₁	A ₂	A ₃	Ä
1	2296,5	2301,4	2301,9	2299,9	857,6	838,6	865,5	853,9
2	2398,5	2274,2	2248,4	2307,0	851,1	810,4	843,8	835,1
3	2148,2	2142,6	2201,1	2164,0	814,9	813,9	859,7	829,5
4	2229,9	2197,8	2227,9	2218,5	855,7	838,7	834,7	843,0
5	2085,4	2211,1	2294,1	2196,9	774,9	819,2	868,9	821,0
6	2504,8	2478,6	2547,4	2510,3	932,1	925,3	959,9	939,1

- Merjenje kromatografskih vrhov vzorcev 1.SERIJE – 3.dan

Vzorec 1 = 600,3 mg/100ml

Vzorec 4 = 600,0 mg/100ml

Vzorec 2 = 600,4 mg/100ml

Vzorec 5 = 600,4 mg/100ml

Vzorec 3 = 600,6 mg/100ml

Vzorec 6 = 600,4 mg/100ml

Preglednica 11: Merjenje ploščin kromatografskih vrhov silikristina, silidianina, silibinina in isosilibinina v vzorcih tablet z ekstraktom pegastega badlja

SILIKRISTIN					SILIDIANIN			
Vzorec	A ₁	A ₂	A ₃	Ä	A ₁	A ₂	A ₃	Ä
1	6650,5	6413,1	6103,3	6389,0	0	0	0	0
2	6367,5	6451,3	6620,3	6479,7	0	0	0	0
3	6673,3	6635,1	6743,4	6683,9	0	0	0	0
4	6376,3	6492,5	6334,9	6401,2	0	0	0	0

5	6765,2	6699,0	6741,4	6735,2	0	0	0	0
6	6524,2	6439,9	6548,9	6504,3	0	0	0	0
SILIBININ A					SILIBININ B			
Vzorec	A ₁	A ₂	A ₃	Ä	A ₁	A ₂	A ₃	Ä
1	5690,7	5438,5	5217,4	5448,9	8421,0	8108,1	7740,3	8089,8
2	5437,6	5485,7	5629,3	5517,5	8092,1	8171,7	8370,6	8211,5
3	5601,1	5621,3	5665,4	5629,3	8319,3	8268,6	8407,6	8331,8
4	5362,9	5573,2	5289,4	5408,5	7950,0	8233,2	7873,9	8019,0
5	5575,7	5582,6	5570,4	5576,2	8404,2	8322,1	8262,1	8329,5
6	5510,8	5472,4	5519,5	5500,9	8103,1	8139,8	8351,0	8198,0
ISOSILIBININ A					ISOSILIBININ B			
Vzorec	A ₁	A ₂	A ₃	Ä	A ₁	A ₂	A ₃	Ä
1	2300,8	2222,9	2125,8	2216,5	860,7	825,8	785,1	823,9
2	2207,6	2252,4	2293,9	2251,3	829,9	836,4	861,6	842,6
3	2279,2	2238,2	2312,6	2276,7	859,8	832,4	866,9	853,0
4	2186,7	2269,1	2175,9	2210,6	810,1	838,9	807,1	818,7
5	2369,3	2330,1	2366,5	2355,3	947,3	950,0	992,7	963,3
6	2242,5	2265,6	2298,4	2268,8	805,6	841,3	857,1	834,7

- Merjenje kromatografskih vrhov vzorcev 3.SERIJE – 1.dan

Vzorec 1 = 600,5 mg/100ml

Vzorec 4 = 600,3 mg/100ml

Vzorec 2 = 599,9 mg/100ml

Vzorec 5 = 600,0 mg/100ml

Vzorec 3 = 600,4 mg/100ml

Vzorec 6 = 599,9 mg/100ml

Preglednica 12: Merjenje ploščin kromatografskih vrhov silikristina, silidianina, silibinina in isosilibinina v vzorcih tablet z ekstraktom pegastega badlja.

SILIKRISTIN					SILIDIANIN			
Vzorec	A ₁	A ₂	A ₃	Ä	A ₁	A ₂	A ₃	Ä
1	6355,1	6163,5	6459,7	6326,1	0	0	0	0
2	6352,1	6218,4	6218,4	6263,0	0	0	0	0
3	6259,9	6633,9	6693,3	6529,0	0	0	0	0
4	6716,2	6798,8	6485,2	6666,7	0	0	0	0

5	6566,6	6524,4	5886,0	6325,7	0	0	0	0
6	6262,6	6519,7	6627,0	6469,8	0	0	0	0
SILIBININ A					SILIBININ B			
Vzorec	A ₁	A ₂	A ₃	Ã	A ₁	A ₂	A ₃	Ã
1	5564,9	5374,6	5558,2	5499,2	8058,8	7876,0	8076,1	8003,6
2	5568,4	5431,7	5431,7	5477,3	8123,5	7845,1	7845,1	7937,9
3	5465,6	5699,6	5846,7	5670,6	8071,8	8457,1	8521,3	8350,1
4	5650,8	8522,7	5718,8	5730,8	8329,7	8529,2	8276,1	8378,3
5	5658,2	5703,6	5106,3	5489,4	8414,9	8455,1	7524,8	8131,6
6	5466,4	5703,5	5731,7	5633,9	7874,2	8319,8	8499,0	8231,0
ISOSILIBININ A					ISOSILIBININ B			
Vzorec	A ₁	A ₂	A ₃	Ã	A ₁	A ₂	A ₃	Ã
1	2208,1	2141,3	2212,9	2187,4	805,0	774,2	810,9	796,7
2	2217,8	2122,4	2122,4	2154,2	817,6	783,7	783,7	795,0
3	2185,3	2309,4	2326,1	2273,6	807,5	841,9	847,9	832,4
4	2274,7	2325,3	2266,8	2288,9	839,9	869,3	840,2	849,8
5	2286,9	2282,6	2029,5	2199,7	856,3	847,9	754,8	819,7
6	2180,2	2256,5	2309,2	2248,6	823,9	839,7	872,0	845,2

- Merjenje kromatografskih vrhov vzorcev 3.SERIJE – 2.dan

Vzorec 1 = 600,4 mg/100ml

Vzorec 4 = 600,5 mg/100ml

Vzorec 2 = 600,1 mg/100ml

Vzorec 5 = 600,2 mg/100ml

Vzorec 3 = 600,2 mg/100ml

Vzorec 6 = 599,9 mg/100ml

Preglednica 13: Merjenje ploščin kromatografskih vrhov silikristina, silidianina, silibinina in isosilibinina v vzorcih tablet z ekstraktom pegastega badlja

SILIKRISTIN					SILIDIANIN			
Vzorec	A ₁	A ₂	A ₃	Ã	A ₁	A ₂	A ₃	Ã
1	6274,7	6233,5	6360,4	6289,5	0	0	0	0
2	6239,6	6582,9	6399,1	6407,2	0	0	0	0
3	6030,6	6272,3	6030,6	6111,2	0	0	0	0
4	6176,5	6547,5	6498,3	6407,4	0	0	0	0

5	6500,9	6551,3	6575,2	6542,5	0	0	0	0
6	6597,4	6751,6	6748,8	6699,3	0	0	0	0
SILIBININ A					SILIBININ B			
Vzorec	A ₁	A ₂	A ₃	Ä	A ₁	A ₂	A ₃	Ä
1	5454,2	5435,4	5533,1	5474,2	8156,5	8059,8	8253,8	8156,7
2	5348,3	5625,8	5501,1	5491,7	7981,8	8239,7	8175,9	8132,5
3	5118,2	5468,9	5118,2	5235,1	7589,1	8092,9	7569,1	7743,7
4	5200,1	5533,6	5580,5	5438,1	7822,7	8383,8	8409,4	8205,3
5	5536,4	5582,4	5454,1	5524,3	8165,5	8301,5	8117,1	8194,7
6	5648,7	5665,9	5987,6	5767,4	8388,6	8389,4	8769,3	8515,8
ISOSILIBININ A					ISOSILIBININ B			
Vzorec	A ₁	A ₂	A ₃	Ä	A ₁	A ₂	A ₃	Ä
1	2198,4	2200,3	2230,1	2209,6	822,9	880,8	836,8	846,7
2	2125,1	2239,8	2214,1	2193,0	798,9	844,9	837,6	827,1
3	2079,1	2183,4	2079,1	2113,9	782,4	820,6	782,4	795,1
4	2133,6	2231,5	2269,9	2211,7	811,7	849,2	855,1	838,7
5	2193,4	2278,0	2192,3	2221,2	820,3	854,3	824,0	832,9
6	2238,9	2269,9	2362,7	2290,5	839,9	848,7	885,5	858,0

- Merjenje kromatografskih vrhov vzorcev 3.SERIJE – 3.dan

Vzorec 1 = 600,0 mg/100ml

Vzorec 4 = 600,0 mg/100ml

Vzorec 2 = 600,4 mg/100ml

Vzorec 5 = 599,8 mg/100ml

Vzorec 3 = 599,9 mg/100ml

Vzorec 6 = 600,0 mg/100ml

Preglednica 14: Merjenje ploščin kromatografskih vrhov silikristina, silidianina, silibinina in isosilibinina v vzorcih tablet z ekstraktom pegastega badlja

SILIKRISTIN					SILIDIANIN			
Vzorec	A ₁	A ₂	A ₃	Ä	A ₁	A ₂	A ₃	Ä
1	6513,3	6582,9	6592,8	6563,0	0	0	0	0
2	6742,9	6688,1	6667,7	6699,6	0	0	0	0
3	6630,4	6545,6	6535,9	6570,6	0	0	0	0
4	6784,4	6635,9	6847,9	6756,1	0	0	0	0

5	6570,5	6814,5	6634,4	6602,5	0	0	0	0
6	6417,4	6482,9	6762,1	6554,1	0	0	0	0
SILIBININ A					SILIBININ B			
Vzorec	A ₁	A ₂	A ₃	Ä	A ₁	A ₂	A ₃	Ä
1	5449,8	5555,2	5590,7	5531,9	8253,8	8247,5	9319,4	8606,9
2	5645,8	5547,5	5563,2	5585,5	8499,9	8415,5	8244,0	8386,5
3	5551,1	5543,9	5472,6	5522,5	8374,9	8261,7	8200,9	8279,2
4	5486,7	5598,2	5696,3	5593,7	8222,9	8236,5	8398,5	8286,0
5	5543,5	5719,8	5680,8	5648,0	8135,9	8457,9	8339,2	8311,0
6	5439,2	5441,2	5654,5	5511,6	8125,8	8227,3	8384,2	8245,8
ISOSILIBININ A					ISOSILIBININ B			
Vzorec	A ₁	A ₂	A ₃	Ä	A ₁	A ₂	A ₃	Ä
1	2194,5	2265,9	2287,9	2249,4	829,8	866,3	862,5	852,9
2	2310,7	2296,8	2267,2	2291,6	870,7	869,2	856,2	865,4
3	2282,3	2267,9	2250,6	2266,9	860,9	856,2	852,5	856,5
4	2257,4	2266,1	2297,5	2273,7	851,9	849,4	864,4	855,2
5	2256,7	2306,9	2295,2	2286,3	856,4	865,0	851,9	857,8
6	2215,3	2243,9	2299,4	2252,9	825,7	836,6	860,1	840,8

- Merjenje kromatografskih vrhov vzorcev 2.SERIJE – 1.dan

Vzorec 1 = 600,3 mg/100ml

Vzorec 4 = 600,6 mg/100ml

Vzorec 2 = 600,8 mg/100ml

Vzorec 5 = 600,1 mg/100ml

Vzorec 3 = 600,8 mg/100ml

Vzorec 6 = 600,3 mg/100ml

Preglednica 15: Merjenje ploščin ploščin kromatografskih vrhov silikristina, silidianina, silibinina in isosilibinina v vzorcih tablet z ekstraktom pegastega badlja

SILIKRISTIN					SILIDIANIN			
Vzorec	A ₁	A ₂	A ₃	Ä	A ₁	A ₂	A ₃	Ä
1	6233,7	6282,7	6282,1	6266,2	0	0	0	0
2	6166,3	6224,4	6059,9	6150,2	0	0	0	0
3	6381,3	6173,5	6270,7	6275,2	0	0	0	0
4	6259,2	6240,8	6240,8	6246,9	0	0	0	0

5	6340,6	6586,7	6276,7	6401,3	0	0	0	0
6	6544,5	6263,7	6744,2	6517,5	0	0	0	0
SILIBININ A					SILIBININ B			
Vzorec	A ₁	A ₂	A ₃	Ä	A ₁	A ₂	A ₃	Ä
1	5355,2	5445,7	5413,0	5404,6	8123,3	8192,1	8205,5	8173,6
2	5377,6	5428,7	5270,2	5358,8	8073,3	8120,4	7905,2	8033,0
3	5588,9	5401,8	5538,9	5509,9	8313,5	8064,8	8236,4	8204,9
4	5471,0	5356,3	5356,3	5396,5	8184,7	8186,6	8186,6	8186,0
5	5575,6	5825,9	5538,6	5646,7	8426,3	8760,2	8368,2	8518,2
6	5763,7	5335,5	5832,7	5644,0	8721,9	8114,6	8926,3	8587,6
ISOSILIBININ A					ISOSILIBININ B			
Vzorec	A ₁	A ₂	A ₃	Ä	A ₁	A ₂	A ₃	Ä
1	2219,9	2243,7	2246,6	2336,7	833,3	839,2	833,4	835,3
2	2207,2	2220,9	2165,1	2197,7	811,8	806,1	791,3	803,1
3	2285,4	2204,9	2259,1	2249,8	823,6	798,1	819,3	813,7
4	2243,1	2248,3	2248,3	2246,6	794,7	815,5	815,5	808,6
5	2474,3	2580,1	2484,1	2512,8	1191,8	1235,7	1206,9	1211,5
6	2604,9	2388,3	2619,1	2537,4	1222,4	1157,4	1258,5	1212,8

- Merjenje kromatografskih vrhov vzorcev 2.SERIJE – 2.dan

Vzorec 1 = 600,7 mg/100ml

Vzorec 4 = 600,1 mg/100ml

Vzorec 2 = 601,1 mg/100ml

Vzorec 5 = 600,4 mg/100ml

Vzorec 3 = 600,7 mg/100ml

Vzorec 6 = 600,2 mg/100ml

Preglednica 16: Merjenje ploščin kromatografskih vrhov silikristina, silidianina, silibinina in isosilibinina v vzorcih tablet z ekstraktom pegastega badlja

SILIKRISTIN					SILIDIANIN			
Vzorec	A ₁	A ₂	A ₃	Ä	A ₁	A ₂	A ₃	Ä
1	6131,6	6317,1	6152,8	6200,5	0	0	0	0
2	6296,7	6361,1	6331,6	6329,8	0	0	0	0
3	6375,9	6426,6	6345,7	6382,7	0	0	0	0
4	6414,1	6486,4	6871,3	6590,6	0	0	0	0

5	6417,6	6186,1	6218,3	6274,0	0	0	0	0
6	6072,8	6225,9	6062,9	6120,5	0	0	0	0
SILIBININ A					SILIBININ B			
Vzorec	A ₁	A ₂	A ₃	Ä	A ₁	A ₂	A ₃	Ä
1	5267,7	5460,7	5357,1	5361,8	7952,9	8211,5	8024,8	8063,1
2	5465,6	5514,6	5511,6	5497,3	8/237,4	8296,6	8294,4	8276,1
3	5355,9	5586,2	5457,9	5466,7	8094,2	8375,3	8281,9	8250,5
4	5491,5	5606,9	6025,4	5707,9	8435,5	8536,9	9195,9	8722,7
5	5662,9	5411,2	5430,7	5501,6	8561,7	8102,1	8314,9	8326,2
6	5352,6	5501,1	5339,1	5397,6	8105,5	8343,4	8113,4	8187,4
ISOSILIBININ A					ISOSILIBININ B			
Vzorec	A ₁	A ₂	A ₃	Ä	A ₁	A ₂	A ₃	Ä
1	2194,0	2274,9	2207,2	2225,4	748,6	774,7	765,8	763,0
2	2254,7	2264,9	2264,3	2261,3	809,4	825,6	825,2	820,1
3	2249,8	2327,3	2318,3	2298,5	763,7	789,3	767,5	773,5
4	2542,7	2581,9	2774,4	2633,0	1173,6	1191,8	1281,6	1215,7
5	2595,5	2284,9	2537,4	2472,6	1194,6	755,8	1191,8	1047,4
6	2595,5	2284,9	2537,4	2472,6	1194,6	755,8	1191,8	1047,4

- Merjenje kromatografskih vrhov vzorcev 2.SERIJE – 3.dan

Vzorec 1 = 600,3 mg/100ml

Vzorec 4 = 601,4 mg/100ml

Vzorec 2 = 599,9 mg/100ml

Vzorec 5 = 600,5 mg/100ml

Vzorec 3 = 600,0 mg/100ml

Vzorec 6 = 600,4 mg/100ml

Preglednica 17: Merjenje ploščin kromatografskih vrhov silikristina, silidianina, silibinina in isosilibinina v vzorcih tablet z ekstraktom pegastega badlja

SILIKRISTIN					SILIDIANIN			
Vzorec	A ₁	A ₂	A ₃	Ä	A ₁	A ₂	A ₃	Ä
1	6304,6	6377,7	6143,9	6275,4	0	0	0	0
2	6153,6	6319,2	6357,8	6276,9	0	0	0	0
3	6379,8	6112,4	6375,8	6289,3	0	0	0	0
4	6130,8	6272,1	6046,3	6149,7	0	0	0	0
5	6425,8	6465,1	6425,8	6438,9	0	0	0	0

6	6521,1	6343,7	6319,7	6394,8	0	0	0	0
SILIBININ A					SILIBININ B			
Vzorec	A ₁	A ₂	A ₃	$\tilde{A}$	A ₁	A ₂	A ₃	$\tilde{A}$
1	5444,6	5428,8	5288,6	5387,3	8167,6	7983,1	7915,8	8022,2
2	5318,1	5449,0	5531,7	5432,9	7881,5	8194,9	8176,2	8084,2
3	5591,7	5176,9	5426,5	5398,4	8245,5	7773,0	8062,7	8027,1
4	5369,9	5303,6	5163,5	5279,0	7871,7	7979,2	7793,1	7881,3
5	5492,9	5646,6	5492,9	5544,1	8096,9	8220,9	8096,9	8138,1
6	5595,2	5527,2	5545,9	5556,1	8209,2	8082,8	8008,5	8100,2
ISOSILIBININ A					ISOSILIBININ B			
Vzorec	A ₁	A ₂	A ₃	$\tilde{A}$	A ₁	A ₂	A ₃	$\tilde{A}$
1	2199,5	2168,6	2132,2	2166,8	768,9	766,2	852,8	762,6
2	2167,7	2211,7	2212,5	2197,3	810,1	805,3	805,8	807,1
3	2208,7	2075,8	2204,3	2162,9	796,6	752,2	798,9	782,6
4	2092,2	2106,2	2063,3	2087,2	644,9	652,9	633,7	643,8
5	2204,9	2251,4	2204,9	2220,4	794,0	817,8	794,0	801,9
6	2241,7	2211,5	2197,8	2217,0	811,4	803,3	802,8	805,8

4.2.2 Specifičnost

Posneli smo kromatogram slepega vzorca. V primerjavi s kromatogramom realnega vzorca smo ugotovili, da na kromatogramu slepega vzorca ni kromatografskih vrhov, ki bi sovpadali z vrhovi realnega vzorca. Vsi kromatografski vrhovi silimarina realnega vzorca so ustrezno ločeni. Dokazali smo, da metoda nedvoumno loči posamezne učinkovine, dokazali smo specifičnost metode.

4.2.3 Linearnost in delovno območje metode

Izmerili smo prvo serijo analiz za linearnost petih koncentracijskih nivojev (preglednica 18). Meritve na določenem koncentracijskem nivoju so bile izvedene pod enakimi pogoji. Izračunali smo povprečno površino silibinina A in B, standardni odmik in relativni

standardni odmik. Relativni standardni odmik za vse izvedene meritve je nižji od 2 %, kar pomeni, da je bil sistem v času izvajanja meritev stabilen.

Preglednica 18: Primerjava standardnih odmkov ploščin na različnih koncentracijskih nivojih standardnih raztopin s silibininom A in B

KONCENTRACIJA (mg/ml)	POVPREČNA PLOŠČINA Silibinina A in B	STANDARDNI ODMIK (SD, mg /ml)	RELATIVNI STANDARDNI ODMIK (RSD%)
0,217	6422,7	± 0,0494	0,8
0,326	9704,4	± 0,0410	0,4
0,432	12886,4	± 0,0846	0,7
0,542	16450,8	± 0,2265	1,4
0,650	19681,1	± 0,2785	1,4

Parametre linearne regresije smo izračunali z računalniškim programom (61).

Enačba regresijske premice

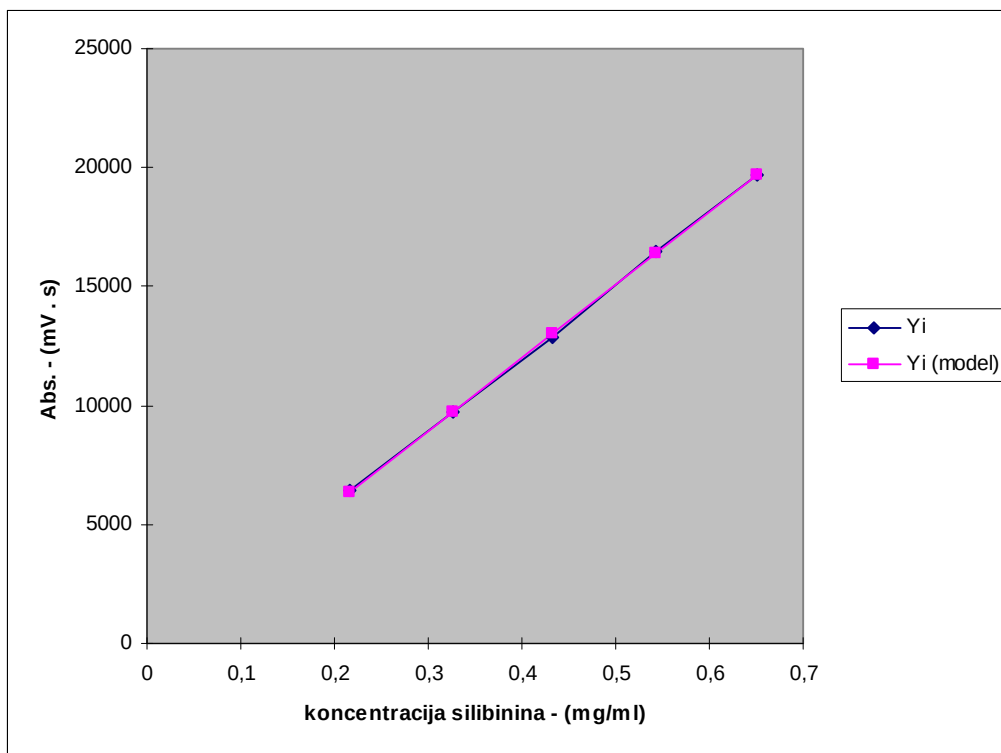
$$Y = 3,074 \cdot 10^4 X - 2,952 \cdot 10^2$$

X - konc. standarda (mg / ml)

Y – signal (mV · s)

Interval zaupanja za naklon ($\alpha = 0.05$): $(b_1) = 3,074 \cdot 10^4 \pm 5,219 \cdot 10^2$

Interval zaupanja za odsek ($\alpha = 0.05$): $(b_0) = - 2,952 \cdot 10^2 \pm 2,399 \cdot 10^2$



Slika 7: Umeritvena premica za silibinin A in silibinin B

Umeritveno premico smo predstavili na sliki 7. Korelacijski koeficient je večji od 0,999, kar izpolnjuje kriterije analiznega laboratorija. Ta podatek nam govori o linearni povezavi med obema spremenljivkama in potrjuje linearnost modela.

4.2.4 Točnost

Pri posameznih koncentracijah silibinina A in B smo po enačbi 1.22 izračunali razlike med izračunano koncentracijo in nominalno koncentracijo silibinina A in silibinina B in jih podali v preglednici 19.

$$\text{Točnost} = \left(1 + \frac{C_{IZR} - C_{NOM}}{C_{NOM}}\right) \cdot 100 \quad (1.22)$$

Točnost – izračunana v odstotkih

C_{IZR} – izračunana koncentracija v mg / ml

C_{NOM} – nominalna koncentracija v mg / ml

Preglednica 19: Točnost izračunana v odstotkih

%	C_{NOM} (mg / ml)	C_{IZR} (mg / ml)	Točnost standardnih raztopin (%)
---	---------------------	---------------------	----------------------------------

50	0,217	0,218	100,46
	0,211	0,213	100,95
	0,211	0,212	100,47
75	0,326	0,325	99,69
	0,325	0,324	99,69
	0,326	0,322	98,77
100	0,432	0,429	99,31
	0,434	0,431	99,31
	0,430	0,429	99,77
125	0,542	0,545	100,55
	0,549	0,551	100,36
	0,540	0,549	101,66
150	0,650	0,650	100,00
	0,660	0,660	100,00
	0,663	0,658	99,25

Koncentracijo smo izračunali s pomočjo umeritvene premice. Za odvisno spremenljivko smo vstavili povprečje ploščin posameznih koncentracijskih nivojev. Povprečna točnost je 100,02 %. Glede na zahteve analiznega laboratorija, ki predpisuje RSD % manjši od 2 %, je metoda točna.

4.2.5 Natančnost

▪ Ponovljivost

Pripravili smo tri serije analiz za linearnost. Za vsako serijo smo izmerili standardne raztopine petih nivojev znotraj delovnega območja. Za vsak nivo smo izvedli po tri ponovitve. Ponovljivost smo podali z relativnim standardnim odklikom (RSD %). Vse meritve smo izvedli isti dan. Prva serija analiz za linearnost je podana v preglednici 18, druga v preglednici 20 in tretja v preglednici 21.

Preglednica 20: Druga serija analiz za linearnost

KONCENTRACIJA (mg/ml)	POVPREČNA PLOŠČINA	STANDARDNI ODMIK	RELATIVNI STANDARDNI
--------------------------	-----------------------	---------------------	-------------------------

	Silibinina A in B	(SD, mg /ml)	ODMIK (RSD%)
0,211	6535,5	± 0,0846	1,3
0,325	10149,9	± 0,0310	0,3
0,434	13100,5	± 0,2286	1,7
0,549	16317,3	± 0,2417	1,5
0,660	19923,3	± 0,1658	0,8

Preglednica 21: Tretja serija analiz za linearnost

KONCENTRACIJA (mg/ml)	POVPREČNA PLOŠČINA Silibinina A in B	STANDARDNI ODMIK (SD, mg /ml)	RELATIVNI STANDARDNI ODMIK (RSD%)
0,211	6737,8	± 0,0267	0,4
0,326	9807,6	± 0,1174	1,2
0,430	13122,3	± 0,2832	2,2
0,540	16307,3	± 0,0846	1,3
0,663	19935,2	± 0,2286	1,7

Glede na zahteve analiznega laboratorija so vse vrednosti v mejah od 98 – 102 %, kar potrjuje točnost metode.

▪ Vmesna natančnost kot meddnevna ponovljivost

Meddnevno ponovljivost smo dokazovali na treh zaporednih serijah izdelka. Meritve smo izvajali tri dni. Vsak dan smo pripravili in izmerili vzorce vseh treh serij. Vsebnost silimarina na tableto smo izračunali po enačbi 1.25. Dobljeni rezultati so predstavljeni v preglednicah od 22 do 31.

Preglednica 22: Ploščine kromatografskih vrhov izmerjenih vzorcev 1. serije, 1. dne

	POVPREČJE PLOŠČIN KROMATOGRFSKIH VRHOV					
	Silikristin	Silidianin	Silibinin A	Silibinin B	Isosilibin A	Isosilibin B
1	6524,8	0	5521,6	8157,4	2250,8	799,8

2	6598,5	0	5599,3	8248,9	2266,6	841,5
3	6301,6	0	5454,8	7998,6	2172,9	793,1
4	6415,0	0	5384,1	8002,7	2200,9	819,4
5	6478,6	0	5573,0	8274,1	2271,8	838,1
6	6630,8	0	5649,4	8388,7	2313,9	827,5

Vsebnost silimarina na tableto je: 77,8 mg

Preglednica 23: Ploščine kromatografskih vrhov izmerjenih vzorcev 1. serije, 2. dne

	POVPREČJE PLOŠČIN KROMATOGRAFSKIH VRHOV					
	Silikristin	Silidianin	Silibinin A	Silibinin B	Isosilibin A	Isosilibin B
1	6266,2	0	5404,6	8173,6	2336,7	835,3
2	6150,2	0	5358,8	8033,0	2197,7	803,1
3	6275,2	0	5509,9	8204,9	2249,8	813,7
4	6246,9	0	5396,5	8186,0	2246,6	808,6
5	6401,3	0	5646,7	8518,2	2512,8	1211,5
6	6517,5	0	5644,0	8587,6	2537,4	1212,8

Vsebnost silimarina na tableto je: 78,7 mg

Preglednica 24: Ploščine kromatografskih vrhov izmerjenih vzorcev 1. serije, 3. dne

	POVPREČJE PLOŠČIN KROMATOGRAFSKIH VRHOV					
	Silikristin	Silidianin	Silibinin A	Silibinin B	Isosilibin A	Isosilibin B
1	6326,1	0	5499,2	8003,6	2187,4	796,7
2	6263,0	0	5477,3	7937,9	2154,2	795,0
3	6529,0	0	5670,6	8350,1	2273,6	832,4
4	6666,7	0	5730,8	8378,3	2288,9	849,8
5	6325,7	0	5489,4	8131,6	2199,7	819,7
6	6469,8	0	5633,9	8231,0	2248,6	845,2

Vsebnost silimarina na tableto je: 78,5 mg

Preglednica 25: Ploščine kromatografskih vrhov izmerjenih vzorcev 2. serije, 1. dne

	POVPREČJE PLOŠČIN KROMATOGRFSKIH VRHOV					
	Silikristin	Silidianin	Silibinin A	Silibinin B	Isosilibin A	Isosilibin B
1	6657,2	0	5622,4	8353,7	857,6	853,9
2	6729,7	0	5684,4	8386,4	851,1	835,1
3	6407,8	0	5375,6	8012,4	814,9	829,5
4	6562,5	0	5487,4	8174,6	855,7	843,0
5	6368,5	0	5445,0	8039,0	774,9	821,0
6	7282,9	0	6231,9	9202,9	932,1	939,1

Vsebnost silimarina na tableto je: 79,6 mg

Preglednica 26: Ploščine kromatografskih vrhov izmerjenih vzorcev 2. serije, 2. dne

	POVPREČJE PLOŠČIN KROMATOGRFSKIH VRHOV					
	Silikristin	Silidianin	Silibinin A	Silibinin B	Isosilibin A	Isosilibin B
1	6200,5	0	5361,8	8063,1	2225,4	763,0
2	6329,8	0	5497,3	8276,1	2261,3	820,1
3	6382,7	0	5466,7	8250,5	2298,5	773,5
4	6590,6	0	5707,9	8722,7	2633,0	1215,7
5	6274,0	0	5501,6	8326,2	2472,6	1047,4
6	6120,5	0	5397,6	8187,4	2472,6	1047,4

Vsebnost silimarina na tableto je: 79,0 mg

Preglednica 27: Ploščine kromatografskih vrhov izmerjenih vzorcev 2. serije, 3. dne

	POVPREČJE PLOŠČIN KROMATOGRFSKIH VRHOV					
	Silikristin	Silidianin	Silibinin A	Silibinin B	Isosilibin A	Isosilibin B
1	6289,5	0	5474,2	8156,7	2209,6	846,7
2	6407,2	0	5491,7	8132,5	2193,0	827,1
3	6111,2	0	5235,1	7743,7	2113,9	795,1
4	6407,4	0	5438,1	8205,3	2211,7	838,7
5	6542,5	0	5524,3	8194,7	2221,2	832,9
6	6699,3	0	5767,4	8515,8	2290,5	858,0

Vsebnost silimarina na tableto je: 78,1 mg

Preglednica 28: Ploščine kromatografskih vrhov izmerjenih vzorcev 3. serije, 1. dne

	POVPREČJE PLOŠČIN KROMATOGRFSKIH VRHOV					
	Silikristin	Silidianin	Silibinin A	Silibinin B	Isosilibin A	Isosilibin B
1	6389,0	0	5448,9	8089,8	2216,5	823,9
2	6479,7	0	5517,5	8211,5	2251,3	842,6
3	6683,9	0	5629,3	8331,8	2276,7	853,0
4	6401,2	0	5408,5	8019,0	2210,6	818,7
5	6735,2	0	5576,2	8329,5	2355,3	963,3
6	6504,3	0	5500,9	8198,0	2268,8	834,7

Vsebnost silimarina na tableto je: 78,1 mg

Preglednica 29: Ploščine kromatografskih vrhov izmerjenih vzorcev 3. serije, 2. dne

	POVPREČJE PLOŠČIN KROMATOGRFSKIH VRHOV					
	Silikristin	Silidianin	Silibinin A	Silibinin B	Isosilibin A	Isosilibin B
1	6275,4	0	5387,3	8022,2	2166,8	762,6
2	6276,9	0	5432,9	8084,2	2197,3	807,1
3	6289,3	0	5398,4	8027,1	2162,9	782,6
4	6149,7	0	5279,0	7881,3	2087,2	643,8
5	6438,9	0	5544,1	8138,1	2220,4	801,9
6	6394,8	0	5556,1	8100,2	2217,0	805,8

Vsebnost silimarina na tableto je: 76,5 mg

Preglednica 30: Ploščine kromatografskih vrhov izmerjenih vzorcev 3. serije, 3. dne

	POVPREČJE PLOŠČIN KROMATOGRFSKIH VRHOV					
	Silikristin	Silidianin	Silibinin A	Silibinin B	Isosilibin A	Isosilibin B
1	6563,0	0	5531,9	8606,9	2249,4	852,9
2	6699,6	0	5585,5	8386,5	2291,6	865,4
3	6570,6	0	5522,5	8279,2	2266,9	856,5
4	6756,1	0	5593,7	8286,0	2273,7	855,2
5	6602,5	0	5648,0	8311,0	2286,3	857,8
6	6554,1	0	5511,6	8245,8	2252,9	840,8

Vsebnost silimarina na tableto je: 80 mg

Preglednica 31: Vsebnost silimarina na tableto

Vsebnost silimarina (mg / tableto)			
	<u>1. serija</u>	<u>2. serija</u>	<u>3. serija</u>
<u>1. dan</u>	77,8 mg	79,6 mg	78,1 mg
<u>2. dan</u>	78,7 mg	79,0 mg	76,5 mg
<u>3. dan</u>	78,5 mg	78,1 mg	80,0 mg

Ponovljivost metode smo preizkusili v treh zaporednih dneh. Rezultati kažejo na dolgoročno natančnost izmerjenih rezultatov. S tem potrjujemo, da bo metoda zagotavljala enake in ponovljive rezultate znotraj istega laboratorija tudi po končanem razvoju metode.

4.2.6 Statistična obdelava podatkov

Podatke smo statistično obdelali z računalniškim programom ANKEM (61).

▪ Test za ugotavljanje ubežnikov po Grubbs in Becku

Statistični testi izračunani z računalniškim programom so pokazali da ni meritev, ki bi se pomembno razlikovale od ostalih meritev (61). To pomeni, da ni ubežnikov.

▪ Preverjanje homoskedastičnosti oz. primerjava varianc

Testiramo obnašanje variance skozi celotno koncentracijsko območje. Preverimo, če varianca na nivoju kjer so več kot štiri meritve, ne presega maksimalno dovoljene vrednosti. Preverimo ali je metoda enako natančna pri nizkih in visokih koncentracijah. Variance na najnižjem in na najvišjem koncentracijskem nivoju primerjamo z dvostranskim F – testom (preglednica 7):

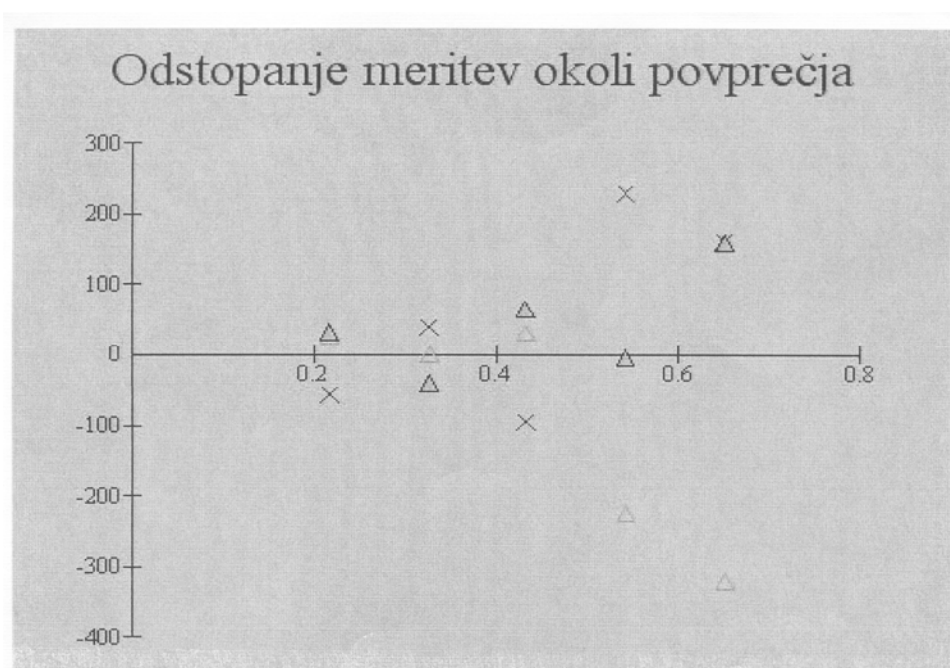
Standardni odmik na najnižjem koncentracijskem nivoju: $\pm 49,4$ mg/L

Standardni odmik na najvišjem koncentracijskem nivoju: $\pm 278,5$ mg/L

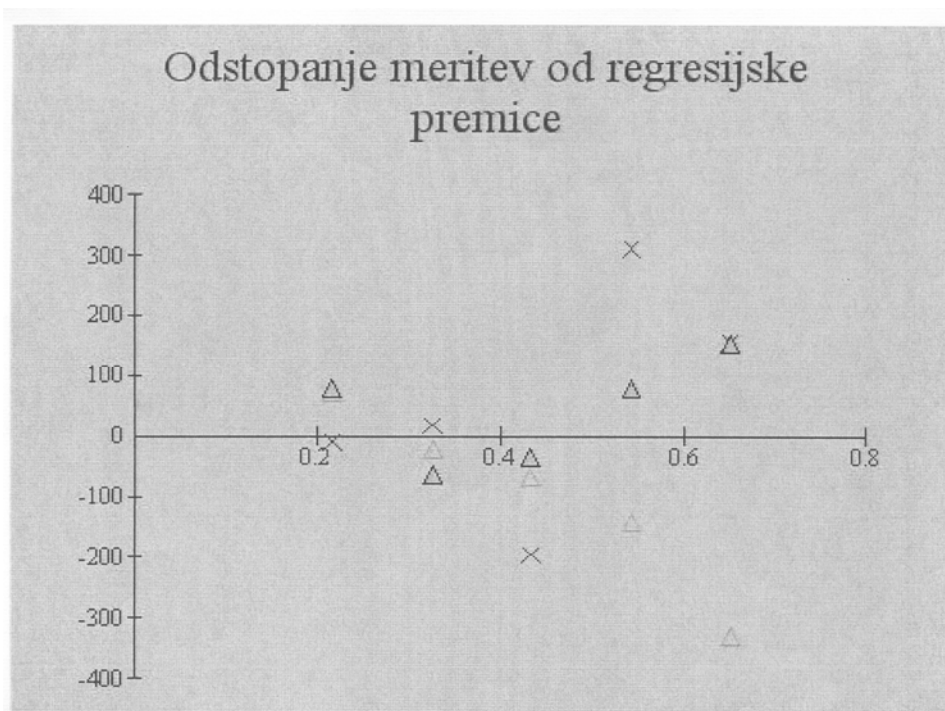
$$F_{izr} = \frac{2,785^2}{0,494^2} = 31,7$$

$$F_{0,05; 2; 2} = 39,0$$

Variance se na spodnjem in zgornjem koncentracijskem nivoju, na izbranem nivoju zaupanja, ne razlikujejo pomembno. Metodi se ne razlikujeta po natančnosti pri $\alpha = 0,05$, nivoju signifikantnosti. Pogoj variance je po vsej kalibracijski krivulji izpolnjen. $F_{0,05; 2; 2} > F_{izr}$. Meritve zadostujejo homoskedastičnosti. Ugotovitve lahko tudi grafično potrdimo s sliko 8 in sliko 9. Na sliki 8 imamo grafični prikaz odstopanja meritev okoli povprečja, na sliki 9 pa grafični prikaz odstopanja meritev od regresijske premice.



Slika 8: Odstopanje meritev okoli povprečja



Slika 9: Odstopanje meritev od regresijske premice

▪ **ANOVA test za linearni model prvega reda**

Preglednica 32: Test ujemanja modela z meritvami. Izvorni podatki so navedeni v preglednici 7.

IZVOR VARIANCE	SS	STOPNJA PROSTOSTI	MS	F
REGRESIJA	$3,320 \cdot 10^8$	1	$3,320 \cdot 10^8$	12742,172
OSTANEK	$3,3867 \cdot 10^5$	13	$7,847 \cdot 10^3$	
SKUPNO	$3,323 \cdot 10^8$	14		
NEUJEMANJE Z MODELOM	$5,847 \cdot 10^4$	3	$1,949 \cdot 10^4$	0,696
PRAVA EKSP. NAPAKA	$2,802 \cdot 10^5$	10	$2,802 \cdot 10^4$	

Izračunano vrednost F iz preglednice 32 primerjamo s kritično vrednostjo.

$$F_{0,05; 3; 10} = 3,71$$

Napaka zaradi pomanjkanja ujemanja (LOF) ni statistično pomembna v primerjavi s čisto eksperimentalno napako na 5 % nivoju tveganja. Podatki in model se dobro ujemajo. Linearnost lahko potrdimo.

4.2.7 Izračun koncentracije silibinina v tabletah

Enačba 4.1 ponazarja izračun vsebnosti silimarina izračunanega na silibinin v miligramih na tableto.

$$\text{Vsebnost silibinina (mg / tableto)} = \frac{(A1 + A2 + A3 + A4 + A5 + A6) \cdot m_1 \cdot p \cdot 1000}{(A7 + A8) \cdot m_2 \cdot (100 - d)} \quad (4.1)$$

$A1$ = ploščina kromatografskega vrha silikristina v vzorcu

$A2$ = ploščina kromatografskega vrha silidianina v vzorcu

$A3$ = ploščina kromatografskega vrha silibinina A v vzorcu

$A4$ = ploščina kromatografskega vrha silibinina B v vzorcu

$A5$ = ploščina kromatografskega vrha isosilibinina A v vzorcu

$A6$ = ploščina kromatografskega vrha isosilibinina B v vzorcu

$A7$ = ploščina kromatografskega vrha silibinina A v standardni raztopini

$A8$ = ploščina kromatografskega vrha silibinina B v standardni raztopini

$m1$ = masa standarda (mg)

$m2$ = masa vzorca (mg)

p = povprečna masa tablete

d = vlaga ekstrakta

V preglednici 31 so podani končni rezultati vsebnosti silibinina na tableto za tri zaporedne serije merjene v treh zaporednih dneh.

Na tržišču se je pojavil ekstrakt pegastega badlja, ki je bolj koncentriran kot ekstrakt uporabljen v tabletah Hepabion Forte. V bodoče bi bilo smiselno uporabiti in izdelati tablete z novim in bolj koncentriranim ekstraktom. S tem bi lahko zmanjšali število priporočenih tablet na odmerjanje, kar bi bilo bolj priročno za pacienta.

4.3 Stabilnost

Priprava vzorcev je bila opravljena kot je opisano v poglavju 3.1.4. Pogoji za izvedbo stabilnostne študije so opisani v poglavju 3.3., postopki izvedbe so opisani v poglavju 3.3.1. Specifikacije izdelka in meje sprejemljivosti, ki smo jih preverjali, so povzete po standardno operacijskem postopku (SOP-u). Rezultati dolgoročne študije stabilnosti so podani v preglednici 33, rezultati pospešene študije stabilnosti so podani v preglednici 34.

4.3.1 Rezultati dolgoročne študije stabilnosti

Preglednica 33: Rezultati dolgoročne študije stabilnosti

	serije	0. mesec	3. mesec	6. mesec
Lastnosti izdelka	1. serija	Ustreza	Ustreza	Ustreza
	2. serija	Ustreza	Ustreza	Ustreza
	3. serija	Ustreza	Ustreza	Ustreza
Enakomernost mase	1. serija	- 2,4 % , +2,1 %	- 2,2 % , +2,1 %	- 2,0 % , +2,3 %
	2. serija	- 2,0 % , +2,0 %	- 2,1 % , +2,3 %	- 2,2 % , +2,1 %
	3. serija	- 2,2 % , +2,3 %	- 2,5 % , +2,1 %	- 2,5 % , +2,0 %
Razpadnost	1. serija	45 s	54 s	60 s
	2. serija	56 s	59 s	59 s
	3. serija	43 s	53 s	55 s
Trdnost	1. serija	90,2 N	89,4 N	88,5 N
	2. serija	99,2 N	97,75 N	97,25 N
	3. serija	87,6 N	85 N	83 N
Krušljivost	1. serija	0,28 %	0,29 %	0,30 %
	2. serija	0,23 %	0,25 %	0,26 %
	3. serija	0,36 %	0,39%	0,43 %
Vsebnost silimarina izraženega kot silibinin	1. serija	77,8 mg / tab.	77,0 mg / tab.	75,0 mg / tab.
	2. serija	79,6 mg / tab.	78, 7 mg / tab.	77, 7 mg / tab.
	3. serija	78,1 mg / tab.	77,9 mg / tab.	76,8 mg / tab.

Lastnosti izdelka se skozi šestmesečno preizkušanje ne spremenijo. Vlaga in temperatura ne vplivata na lastnosti izdelka. Razpadnost tablet nepomembno narašča, trdnost zanemarljivo pada. Tablete s časom postajajo tudi nekoliko bolj krušljive. Vsebnost silimarina se signifikantno ne spremeni v obdobju preizkušanja.

Vsi preizkusi ustreznosti tekom šestmesečnega preizkušanja podajajo rezultate ki ustrezajo specifikacijam.

4.3.2 Rezultati pospešene študije stabilnosti

Preglednica 34: Rezultati pospešene študije stabilnosti

	serije	0. mesec	3. mesec	6. mesec
Lastnosti izdelka	1. serija	Ustreza	Ustreza	Ustreza
	2. serija	Ustreza	Ustreza	Ustreza
	3. serija	Ustreza	Ustreza	Ustreza
Enakomernost mase	1. serija	- 2,4 % , +2,1 %	- 2,0 % , +2,3 %	- 2,1 % , +2,2 %
	2. serija	- 2,0 % , +2,0 %	- 2,2 % , +2,1 %	- 2,0 % , +2,0 %
	3. serija	- 2,2 % , +2,3 %	- 2,5 % , +2,0 %	- 2,2 % , +2,3 %
Razpadnost	1. serija	45 s	60 s	59 s
	2. serija	56 s	58 s	60 s
	3. serija	43 s	55 s	58 s
Trdnost	1. serija	90,2 N	86,75 N	80,43 N
	2. serija	99,2 N	95,25 N	91,35 N
	3. serija	87,6 N	82 N	80,1 N
Krušljivost	1. serija	0,28 %	0,33 %	0,34 %
	2. serija	0,23 %	0,26 %	0,29 %
	3. serija	0,36 %	0,40 %	0,43 %
Vsebnost silimarina izraženega kot silibinin	1. serija	77,8 mg / tab.	77,0 mg / tab.	78,2 mg / tab.
	2. serija	79,6 mg / tab.	78, 7 mg / tab.	79,1 mg / tab.
	3. serija	78,1 mg / tab.	77,9 mg / tab.	78,3 mg / tab.

Lastnosti izdelka se pri pogojih pospešene študije stabilnosti ne spremenijo. Razpadnost tablet se malo poveča, trdnost tablet malo upade, krušljivost se nekoliko poveča. Vsebnost se v času študije ne spremeni.

Pri pogojih dolgoročne in pospešene študije stabilnosti se niso pojavile signifikantne spremembe. Vsi preizkusi izvedeni v času šestmesečnega preizkušanja podajajo rezultate ki ustrezajo specifikacijam. Z opravljeno študijo stabilnosti izdelka smo zagotovili dokaze, da se kakovost zdravilne učinkovine in izdelka pod vplivom tudi povišane temperature in vlažnosti s časom ne spreminja. Na podlagi študije lahko zagotovimo, da je izdelek obstojen najmanj šest mesecev pri temperaturi $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ in vlagi $60\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$. Glede na dobre rezultate v šestmesečni študiji lahko v nadaljnji študiji pričakujemo podobno dobre rezultate in ne pričakujemo kakršnihkoli odmikov od specifikacij v obdobju osemnajst mesecev.

Po opravljeni osemnajstmesečni stabilnostni študiji bomo lahko potrdili obstojnost izdelka za omenjeno obdobje, na podlagi katerega bomo predpisali rok uporabnosti rastlinskega pripravka. Prav tako pa bomo na podlagi rezultatov napisali pogoje shranjevanja izdelka.

Priloga 1: Standardno operacijski postopek (SOP).

5. SKLEP

Končni rezultat magistrske naloge je nova HPLC gradientna metoda za določevanje silimarina v rastlinskem pripravku Hepabion Forte.

Nova metoda dosega postavljene validacijske kriterije. Izračunani so ustrezni parametri, ki jih kot predlagatelj moramo predložiti k registracijski dokumentaciji. Z validacijo metode smo potrdili, da je razvita metoda zanesljiva in učinkovita ter ustreza svojemu namenu.

Nova razvita analizna metoda je ustrezna za vrednotenje našega izdelka, prav tako pa smo z njo lahko dokazali primerno stabilnost. S študijo stabilnosti smo dokazali, da se farmacevtski izdelek pod vplivom različnih okoljskih dejavnikov s časom ne spreminja in s tem smo potrdili šestmesečni rok uporabnosti pod navedenimi pogoji shranjevanja. Predvidevamo, da bo rok uporabnosti lahko do osemnajst mesecev.

Z novo metodo smo rešili problem dolgih časov analiz posameznih vzorcev. Čas analize s prvotno metodo je trajal 56 min, z novo optimizirano metodo smo pridobili rezultate v 40 minutah. Čas posamezne analize smo torej skrajšali za 16 minut. Na ta način smo rešili celosten problem analize velikega števila vzorcev. Z razvojem nove metode smo znižali stroške analitike, ki je cenovno ugodna v smislu manjše porabe organskih topil, kar pa je ugodno tudi s stališča varstva okolja.

Glede na to, da se je na tržišču pojavil bolj koncentriran ekstrakt pegastega badlja od uporabljenega, obstaja možnost, da se bodo Mariborske lekarne odločile za uporabo omenjenega ekstrakta. Na osnovi vseh ugovitev magistrskega dela lahko zaključimo, da bo razvita metoda uporabna tudi za to vrsto izdelkov.

6. Literatura

1. Saller R, Brignoli R, Melzer J, Meier R.: An updated systematic review with meta-analysis for the clinical evidence of silymarin. *Forsch Komplementmed* 2008 Feb;15(1):9-20
2. Saller R, Meier R, Brignoli R.: The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs*. 2001;61(14):2035-63.
3. Pradhan SC, Girish C.: Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *Indian J Med Res*. 2006 Nov;124(5):491-504.
4. Saller R, Melzer J, Reichling J, Brignoli R, Meier R.: An updated systematic review of the pharmacology of silymarin. *Forsch Komplementmed* 2007 Apr;14(2):70-80. Epub 2007 Apr 23.
5. Marilyn Barrett: *The Handbook of Clinically Tested Herbal Remedies*, Vol 2, 2004
6. Auterhoff: *Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie*
7. Ph.Eur.6th, *Evropska farmakopeja*
8. Green, M. J. *A Practical Guide to Analytical Method Validation*. Analytical Chemistry.1996, Vol. 68, pp. 305A-9A.
9. ICH Q2(R1): *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. November 2005
10. CDER. *Validation of Chromatographic Methods, Reviewer Guidance*. Rockville, US FDA, Center for Drug Evaluation and Research, 1994.
11. US FDA. *Guideline for submitting samples and analytical data for methods validation*. Rockville, Center for Drugs and Biologics, 1987.
12. *Draft Guidance Analytical Procedures and Methods Validation*. US FDA, Center for Drug Evaluation and Research, August 2000.
13. General Chapter <1225>, *Validation of compendial methods*. United States Pharmacopeia USP29. Rockville, The United States Pharmacopeia Convention, Inc, 2005.
14. Huber, L. *Validation of Analytical Methods: Review and Strategy*. Lab Compliance, 2001.
15. Huber, L. *Tutorial: Validation of HPLC Methods*. *BioPharm*. 1999, Vol. 12, pp. 64-6.

16. Chandran, S. and Singh, R. S. P. Comparison of various international guidelines for analytical method validation. *Pharmazie*. 2007, Vol. 62, pp. 4-14.Ž
17. Vessman, J. Selectivity or specificity, Validation of analytical methods from the prospective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1996, Vol. 14, pp. 867-869.
18. Swartz, M. and Krull, I. Analytical Method Validation: Accuracy in Quantification. *LCGC North America*. 2005, Vol. 23, pp. 46-52.
19. Vander Heyen, Y. et. al. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *Journal of Pharmaceutical an Biomedical Analysis*. 2001, Vol. 24, pp. 723-753.
20. Ghulam, A. S. HPLC Method Development and Validation for Pharmaceutical Analysis. *Pharmaceutical Technology Europe*. 2004, pp. 37-49.
21. Epshtein, N. A. Validation of HPLC Techniques for Pharmaceutical Analysis. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2004, Vol. 38, pp. 212-228.
22. Winslow, P. A. and Meyer, R. F. Defining a Master Plan for Validation of Analytical Methods. *Journal of Validation Technology*. pp. 361-366.
23. Zakon o zdravilih (Uradni list RS, št. 31/2006, 1266, stran 3217)
24. Pravilnik o tradicionalnih zdravilih rastlinskega izvora (Uradni list RS, št. 55/2006, 2342, stran 5955)
25. Direktiva 2001/83/ES
26. Direktiva 2001/82/ES
27. Uredba 726/2004/ES
28. Pravilnik o razvrstitvi zdravilnih rastlin (Uradni list RS, št. 103/2008, 4369, stran 13637)
29. Pravilnik o spremembah Pravilnika o postopkih glede dovoljenja za promet z zdravilom (Uradni list RS, št. 103/2005, 4490, stran 10875)
30. Pravilnik o prehranskih dopolnilih (Uradni list RS, št. 82/2003, 3942, stran 12227)
31. Pravilnik o spremembah in dopolnitvah Pravilnika o prehranskih dopolnilih (Uradni list RS, št. 22/2007, 1087, stran 2731)
32. Pravilnik o postopkih glede dovoljenja za promet z zdravilom (Uradni list RS, št. 60/2004, 2761, stran 7745)
33. Pravilnik o razvrščanju, predpisovanju in izdajanju zdravil za uporabo v humani medicini (Uradni list RS, št. 59/2003, 2955, stran 7058 in 114/03)

34. Zakon o zdravilih (Uradni list RS, št. 45/2008, 1989, stran 5026)
35. Pravilnik o oglaševanju zdravil in medicinskih pripomočkov (Uradni list RS, št. 76/2001, 3985, stran 7889)
36. Zakon o lekarniški dejavnosti (Uradni list RS, št. 36/2004, 1568, stran 4230)
37. Pravilnik o označevanju magistralnih pripravkov in o označevanju ter navodilu za uporabo galenskih izdelkov (Uradni list RS, št. 15/2007)
38. Vojko Kmetec, Robert Roškar: Vaje iz stabilnosti zdravil, Ljubljana 2002
39. ICH Q1A(R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products, February 2003
40. ICH Q1C: Stability Testing for New Dosage Forms, November 1996
41. ICH Q1D: Bracketing and Matrixing Designs for Stability Testing of New Drug Substances and Products
42. ICH Q1E: Evaluation for Stability Data
43. ICH Q1B: Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products
44. J.T. Carstensen, C.T. Rhodes: Drug Stability, 1990, Marcel Dekker New York
45. K.A. Connors, G.L. Amidon, V.J. Stella, Chemical stability of pharmaceuticals, A handbook for pharmacists, 1986
46. Sinko Patrick: Martin's physical pharmacy & pharmaceutical sciences, 5th Ed., 2005
47. Martindale: The complete drug reference, 36 izdaja, 2009
48. USP 29, The United States Pharmacopeia
49. GMP, Annex 15 (kvalifikacije in validacije)
50. D.C.Montgomery (2005): Introduction to Statistical Quality Control, 5. izd., John Wiley & Sons, Inc., New York, ISBN 0-471-65631-3.
51. D.C.Montgomery (2005): Design and Analysis of Experiments, 6. izd. John Wiley & Sons, Inc., New York, ISBN 0-471-48735-X.
52. D.C.Montgomery, G. C. Runger (2003): Applied Statistics and Probability for Engineers, 3. izd., John Wiley & Sons, Inc., New York, ISBN 0-471-20454-4.
53. E. Dietrich, A. Schulze (2005): Statistische Verfahren zur Maschinen- und Prozessqualifikation, 5. izd., Carl Hanser Verlag, München, ISBN 3-446-22894-2.
54. Eurachem, The Fitness for Purpose of Analytical Methods; A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, EDITION 1, Middlesex, 1998

55. F. Kvasnička, B. Biba, R. Ševčík, M. Voldrich, J. Kratka: Analysis of the active components of Silymarin, *Journal of Chromatography A*, 990 (2003) 239-245.
56. M. G. Quaglia, E. Bossu, E. Donati, G. Mazzanti, A. Brandt: Determination of Silymarine in the extract from the dried silybum marianum fruits by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 19 (1999) 435-442.
57. A. campodonico, E. Collado, R. Ricci, H. Pappa, A. Segall, M. T. Pizzorno: Dissolution Test for Silymarin Tablets and Capsules, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 27(3), 261-265 (2001).
58. E.M Martinelli, P. Morazzoni, S. Livio, E. Uberti: Liquid Chromatographic assay of Silybin in Human Plasma and Urin, *Journal of Liquid Chromatography*, 14 (7), 1285-1296 (1991).
59. H. Mascher, C. Kikuta, R. Weyhenmeyer, Diastereomeric separation of free and conjugated silibinin in plasma by reversed phase HPLC after specific extraction, *Journal of Liquid Chromatography*, 16(13), 2777-2789 (1993).
60. Jure Zupan: Kemometrija in obdelava eksperimentalnih podatkov: Kemijski inštitut, Ljubljana: Inštitut Nove revije, Zavod za humanistiko, 2009
61. mag. Aleš Brglez: Računalniški program ANKEM

MARIBORSKE LEKARNE MARIBOR
KONTROLNO ANALIZNI LABORATORIJ
MARIBOR, MINAŘIKOVA ul.6

STANDARDNI OPERACIJSKI POSTOPEK

ANALIZNI POSTOPEK

HEPABION FORTE
tablete s suhim ekstraktom plodu pegastega badlja

ZAUPNO!!

04 02 160 05 01

Pripravila:
Mojca Perko univ.dipl.ing.kem.teh.

Pregledal in odobril:
Vodja kontrolno analiznega
laboratorija:

Strani: 5
Revizija: 1
Datum: 8.5.2008

ANALIZNI POSTOPEK ŠT.:

IME IZDELKA: HEPABION FORTE

tablete s suhim ekstraktom plodu pegastega badlja

Poreklo: interni predpis

Proizvodni list št.:

1. NAMEN:

- 1.1 Določiti specifikacije za izdelek
- 1.2 Opisati preizkušanje izdelka
- 1.3 Določiti rutinsko in nerutinsko preizkušanje

2. PODROČJE:

- 2.1 Preizkušanje izdelka **HEPABION FORTE - tablete s suhim ekstraktom plodu pegastega badlja** z namenom sproščanja serij.

3. ODGOVORNOSTI:

- 3.1 Odgovoren je vodja Kontrolno analiznega laboratorija ter izvajalec analize.

4. POGOSTOST:

- 4.1 Pri vsaki seriji izdelka opravimo celotno kemijsko farmacevtsko preizkušanje.

5. SPLOŠNI PODATKI:

5.1 SESTAVA:

Sestava ene tablete (masa: 600 mg)

Učinkovine in pomožne snovi	Masa v mg
<i>Silybum marianum</i> L.; fructus; extractum siccum	
Laktoza monohidrat	
Mikrokristalna celuloza	
Kopovidon	
Povidon	
Smukec	
Magnezijev stearat	

Ena tableta vsebuje 188 do 208 mg suhega ekstrakta plodu pegastega badlja z izboljšanimi lastnostmi (*Silybum marianum* L.; fructus; extractum siccum), kar ustreza 75 mg silimarina (določenega s HPLC metodo in izraženega kot silibinin).

5.2 UKREPI PREVIDNOSTI:

Pred pričetkom dela temeljito preučimo reakcije in postopke, uskladimo potek dela ter upoštevamo navodila za varno delo. Pri delu uporabljamo zaščitno haljo, rokavice, zaščitno kapo, obrazno masko in zaščitno obušalo.

5.3 ROK UPRAVNOSTI:

18 mesecev

6. POSTOPEK (interni predpis)

6.1 SPECIFIKACIJE IZDELKA:

	<i>Meje sprejemljivosti:</i>
6.2 LASTNOSTI	
▪ vonj: brez vonja	mora ustrezati
▪ barva: svetlo rumena barva	mora ustrezati
▪ videz: gladke, enakomerne okrogle oblike in velikosti z zarezo. Na prelomu enakomerne zrnate strukture.	mora ustrezati
6.3 ISTOVETNOST z določanjem vsebnosti učinkovin	mora ustrezati
6.4 PREIZKUSI	
a) Enakomernost mase (Ph.Eur. 6 th , 2.9.5)	mora ustrezati
b) Razpadnost (Ph.Eur. 6 th , 2.9.1)	mora ustrezati
c) Krušljivost (Ph.Eur. 6 th , 2.9.7)	mora ustrezati
d) Trdnost (Ph.Eur. 6 th , 2.9.8)	mora ustrezati
6.5 VSEBNOST	
- silimarín izražen kot silibinin	70.0 – 80.0 mg / tab

6.2 LASTNOSTI:

6.2.1 Barva: določamo organoleptično.

6.2.2 Vonj: določamo organoleptično.

6.2.3 Videz: določamo organoleptično.

6.3 ISTOVETNOST:

6.3.2 Določamo v postopku 6.5.

6.4 PREIZKUSI:

6.4.1 A) Enakomernost mase (Ph. Eur. 6th, 2.9.5)

Posamezno natehtamo 20 naključno izbranih tablet in določimo povprečno maso. Največ dve posamezni tableti smeta odstopati od povprečne mase za 5 %, ter nobena tableta za več kot 10%.

6.4.2 B) Razpadnost (Ph. Eur. 6th 2.9.1)

Razpadnost določamo v posebni napravi za določanje razpadnosti. Za tekoči medij uporabimo prečiščeno vodo R. V vsako cevko dodamo najprej po eno tableto ter nato po en disk. Napravo pustimo delovati 60 sek., nato pregledamo stanje tablet. Če tablete ne ustrezajo, ker so se prilepile na diske, preizkus ponovimo s šestimi novimi tabletami, brez uporabe diskov. Tablete ustrezajo predpisom, če je vseh šest tablet razpadlo.

6.5 VSEBNOST:

6.5.1 Silimarin izražen kot silibinin določen s HPLC metodo.

6.5.2 Reagenti in topila:

- metanol R (za HPLC),
- visoko prečiščena voda R,
- H₃PO₄

6.5.3 Standardi: SILIBININ A in B .

6.5.4 Mobilna faza A:

Visoko prečiščena voda R: metanol R : H₃PO₄=65 : 35 : 0,5

Mobilna faza B:

Visoko prečiščena voda R: metanol R : H₃PO₄=50 : 50 : 0,5

6.5.5 Kromatografski gradientni sistem:

- kolona: C18, 120 mm x 4 mm, 5 µm,
- pretok: 0,8 ml / min
- volumen injiciranja: 10 µl
- valovna dolžina: 288 nm
- temperatura kolone: 25 °C.
- gradientni pogoji:

Čas (min)	Mobilna faza A	Mobilna faza B
0 – 31	100 → 0	0 → 100
31 – 35	0	100
35 – 39	0 → 100	100 → 0
39 - 55	100	0

6.5.6 Primerjalna raztopina: natehtamo 40.0 mg standarda silibinina (A in B) - v 100.0 ml bučko. Raztopimo v 90 ml metanola R in stresamo na ultrazvočni kopeli 20 min. Ohladimo na 20°C in dopolnimo do 100.0 ml z metanolom. Filtriramo skozi 0.45 µm membranski filter.

6.5.7 Preiskovana raztopina: 20 naključno izbranih tablet zdrobimo v tarilnici in dobro premešamo. Natehtamo 600.0 mg v 100.0 ml bučko. Raztopimo v 90 ml metanola in stresamo na ultrazvočni kopeli 20 min. Ohladimo na 20°C in dopolnimo do 100.0 ml z metanolom. Filtriramo skozi naguban filter papir in nato še skozi 0.45 µm membranski filter.

6.5.8 Postopek: Primerjalno in preiskovano raztopino injiciramo ločeno v kromatograf. Ploščine kromatografskih vrhov silikristina, silidianina, silibinina A, silibinina B, isosilibinina A in isosilibinina B na kromatogramih preiskovane raztopine primerjamo s ploščinami vrhov silibinina A in B primerjalne raztopine. Vsebnost silimarina preračunanega na silibinin izračunamo na povprečno maso tablete.

Približni retenzijski časi učinkovin so:

- silikristin = 16,8 min
- silidianin = /
- silibinin A = 31,4 min
- silibinin B = 32,8 min
- isosilibinin A = 34,2 min
- isosilibinin B = 35,2 min

$$Izracun = \frac{A_{vz} \cdot m_{st} \cdot \%st \cdot m_T}{A_{st} \cdot m_{vz} \cdot (100 - \%vlage \cdot ekstrakta)} \left[\frac{mg}{tableto} \right]$$

A_{vz}vsota ploščin kromatografskih vrhov silikristina, silidianina, silibinina A, silibinina B, isosilibinina A in isosilibinina B na kromatogramu preiskovane raztopine

A_{st} ploščini kromatografskih vrhov silibinina A in silibinina B na kromatogramu primerjalne raztopine

m_{st}natehta standarda [mg]

m_{vz} ...natehta vzorca [mg]

m_Tpovprečna masa tablete [mg].

7 LITERATURA:

7.1 Ph. Eur. 6th

7.2 DAB 2003

**POTRJUJEM, DA SEM PODROBNO SEZNANJEN-A S TEM POSTOPKOM, DA
GA DOBRO POZNAM IN SE OBVEZUJEM, DA GA BOM DOSLEDNO
IZVRŠEVAL-A !**

DATUM	PODPIS
1.	
2.	
3.	
4.	