

A tutti coloro che hanno creduto in me

Ringraziamenti

* * *

Si ringraziano la Dr.ssa L. Casu per l'utilizzo del rifrattometro di Abbe e dell'apparecchio per la misurazione del punto di fusione, il Prof. E. Maccioni per l'utilizzo dell'apparecchio per la misurazione del punto di fusione ed insieme con la Dr.ssa R. Meleddu per l'acquisizione degli spettri NMR, la Dr.ssa V. Onnis per l'acquisizione degli spettri IR, e le Dr.sse M. Begala e F. Mocci per commenti e suggerimenti.

Un ringraziamento particolare a tutti i Professori del Dipartimento di chimica e tecnologie farmaceutiche che mi sono stati vicini nell'ultimo periodo del mio dottorato credendo in me e mostrandomi tutta la loro umanità ed il loro appoggio

Si vuole inoltre ringraziare gli enti finanziatori senza i quali non sarebbe stato possibile condurre questo studio. Si ricorda che questa tesi è una piccola parte di un progetto finanziato dalla Regione Sardegna: LR 7/07 - Progetti di Ricerca Fondamentale o di Base, (2010-2012, progetto n. CRP3_11). Inoltre, alcuni strumenti erano stati acquisiti precedentemente grazie ai seguenti finanziamenti: Excellence in Research and Teaching Activities (2009, Università di Cagliari), ed il Finanziamento per lo start-up dei giovani ricercatori (2009-2010, Università di Cagliari).



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA



REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA

Indice

1.	Introduzione E Motivazione Della Tesi		1
2.	Kit NanoOrange di quantificazione proteica		
	2.1.	Introduzione	7
	2.2.	Materiali	7
	2.3.	Strumenti	8
	2.3.1.	Settaggio del fluorimetro	9
	2.4.	Metodi	9
	2.4.1.	Cuvette in plastica	9
	2.4.2.	Cuvette in vetro	9
	2.4.3.	Quantificazione delle proteine_ Curva di calibrazione _	10
		2.4.3.1. Curva di calibrazione _Protocollo Originale_	10
		2.4.3.2. Curva di calibrazione _Protocollo Modificato_	11
	2.4.4.	Preparazione delle soluzioni di ABSL	11
	2.4.5.	Analisi dei campioni incogniti provenienti dalla cute	13
	2.4.6.	Analisi dei dati	13
	2.5.	Presentazione e discussione dei risultati	14
	2.5.1.	Esperimenti sul protocollo originario	14
	2.5.2.	Esperimenti sul protocollo modificato	18
	2.6.	Esperimenti di validazione della retta su campioni a concentrazione nota	26
	2.7.	Utilizzo del Kit NanoOrange nella quantificazione proteica della cute	32
	2.8.	Conclusioni	32
3	Degradazione e Deproteinizzazione della cute		34
	3.1.	Introduzione	34

	3.2.	Materiali	34
	3.3.	Strumenti	36
	3.4.	Metodi	36
	3.4.1.	Lavaggio delle provette filtranti Amicon	36
	3.4.2.	Dissoluzione della cute	37
	3.4.3.	Deproteinizzazione della cute	37
		3.4.3.1. Deproteinizzazione per precipitazione in solvente organico	38
		3.4.3.2. Deproteinizzazione della cute per filtrazione Amicon	38
		3.4.3.3. Criodeproteinizzazione della cute	38
		3.4.3.4. Deproteinizzazione della cute per filtrazione in cartucce HybridSpe	38
		3.4.3.5. Deproteinizzazione della cute attraverso metodo Folch	41
	3.4.4.	Analisi dei campioni di cute deproteinizzati	42
	3.5.	Presentazione e discussione dei risultati	43
	3.5.1.	Dissoluzione della cute	43
	3.5.2.	Deproteinizzazione della cute	45
		3.5.2.1. Precipitazione in solvente organico, Amicon, Criodeproteinizzazione	45
		3.5.2.2. HybridSpe	48
		3.5.2.3. Metodica del Folch	67
4	Hplc		
	4.1.	Introduzione	75
	4.2.	Materiali	75
	4.3.	Strumenti	77
	4.4.	Preparazione e caratterizzazione delle soluzioni	77
	4.4.1.	Acqua per Hplc	77
		4.4.1.1. Spettrometria UV-Vis	77
		4.4.1.2. Indice di rifrazione	78
	4.4.2.	Soluzioni madre di KH_2PO_4 e K_2HPO_4 1M	78
	4.4.3.	Tampone fosfato 50 mM	79

	4.4.4.	Tampone fosfato 25 mM	80
	4.4.5.	Solventi utilizzati per le separazioni in HPLC	80
	4.4.6.	Fase mobile	81
	4.4.7.	Soluzioni da iniettare in HPLC	81
	4.4.8.	Soluzione salina in tampone fosfato	82
	4.5.	Molecole modello e loro caratterizzazione	82
	4.5.1.	Ibuprofene sale sodico	83
		4.5.1.1. Conservazione	83
		4.5.1.2. Punto di fusione	83
		4.5.1.3. Misurazione del pH	84
		4.5.1.4. Spettrofotometria UV-Vis	85
		4.5.1.5. Spettroscopia IR	87
		4.5.1.6. Spettroscopia NMR	88
	4.5.2.	Diclofenac sale sodico	88
	4.6.	Cromatografia liquida ad alta pressione	88
	4.6.1.	Elementi costituenti lo strumento	89
	4.6.2.	Colonna cromatografica utilizzata e suoi accessori	90
	4.6.3.	Accensione, inizializzazione ed operazioni post-analisi	91
	4.6.4.	Metodica di lavaggio dello strumento	92
	4.6.5.	Analisi – determinazione dei parametri pressori basali dello strumento	94
	4.6.6.	Analisi – metodica per la quantificazione dell'Ibuprofene sale sodico	95
		4.6.6.1. Descrizione del protocollo originale di riferimento	95
		4.6.6.2. Modifiche apportate al protocollo di riferimento	96
		4.6.6.3. Metodica finale	97
	4.6.7.	Curva di calibrazione	98
		4.6.7.1. Preparazione delle soluzioni madre di IbuNa e DicloNa	98

		4.6.7.2.	Curva di calibrazione di IbuNa	98
		4.6.7.3.	Curva di calibrazione di DicloNa	99
		4.6.7.4.	Curva di calibrazione di IbuNa in presenza di DicloNa	99
	4.7	Presentazione e discussione dei risultati		101
	4.7.1.	Caratterizzazione delle soluzioni		101
		4.7.1.1	Acqua Milli-Q	101
		4.7.1.2.	Stabilità fisica delle soluzioni	103
	4.8.	Caratterizzazione delle molecole modello		105
	4.8.1.	Ibuprofene sale sodico		106
		4.8.1.1.	Aspetto e odore	106
		4.8.1.2.	pH	106
		4.8.1.3.	Punto di fusione	107
		4.8.1.4.	Spettroscopia IR	109
		4.8.1.5.	Spettroscopia NMR	112
		4.8.1.6.	Assorbimento UV-Vis e curve di calibrazione	116
	4.8.2.	Diclofenac sale sodico		123
		4.8.2.1.	Misurazione del pH	123
		4.8.2.2.	Assorbimento UV-Vis	124
	4.9.	Separazione cromatografica in HPLC		125
		4.9.1	Determinazione dei parametri basali dello strumento	125
		4.9.2	Metodica di lavaggio dello strumento e sue porzioni	128
		4.9.3	Separazione cromatografica: messa a punto della metodica finale	140
		4.9.4	Retta di calibrazione	148
		4.9.5	Influenza dell'umidità sulla retta di calibrazione	155
		4.9.6	Influenza della temperatura sul campione	192
5	Conclusioni			196
6	Bibliografia			201

1

Introduzione e motivazione della tesi

La veicolazione transdermica ha dato un contributo importante alla medicina pratica, ma deve ancora sviluppare pienamente il suo potenziale come alternativa alla somministrazione orale ed alle iniezioni ipodermiche.

Da una prospettiva globale, i progressi raggiunti nella progettazione dei sistemi di veicolazione transdermica si potrebbero classificare in tre generazioni di sviluppo.

La prima generazione comprende sistemi caratterizzati dalla capacità di far attraversare la pelle a molecole di piccole dimensioni, di natura lipofila ed efficaci a basse dosi [1].

I sistemi utilizzati nella seconda generazione hanno contribuito all'ottenimento di ulteriori progressi per la veicolazione di piccole molecole aumentando la permeabilità della pelle e le forze di trasporto. Infatti, è stato introdotto l'utilizzo di enhancers chimici, di ultrasuoni e della ionoforesi; la capacità della ionoforesi di controllare i tassi di rilascio in tempo reale rappresenta, infatti, una funzionalità aggiunta.

Infine, la terza generazione consente la veicolazione transdermica di piccole molecole, di macromolecole (tra cui proteine e DNA) e di vaccini tramite una permeabilizzazione mirata dello strato corneo della pelle [1].

In modo particolare, tali sistemi di veicolazione di terza generazione indirizzano i propri effetti sullo strato corneo, con microaghi, attraverso l'ablazione termica, la microdermoabrasione, l'elettroporazione e l'ultrasuono cavitazionale.

Nello specifico, microaghi e termoablazione stanno attualmente progredendo attraverso studi clinici per la veicolazione di macromolecole e di vaccini, come l'insulina, l'ormone paratiroideo ed il vaccino influenzale.

Pertanto, utilizzando queste nuove strategie di valorizzazione di seconda e di terza generazione, la veicolazione transdermica è destinata ad aumentare in modo significativo il proprio impatto sulla medicina [1].

La veicolazione transdermica è la via di somministrazione che permette il passaggio di un farmaco attraverso gli strati della cute, fino al raggiungimento del derma e dei vasi sanguigni in essa presenti, permettendo al farmaco stesso di svolgere un'azione sistemica.

Questa via offre numerosi vantaggi quali un miglioramento della *compliance* del paziente, una minore perdita di farmaco, una semplice somministrazione/applicazione, ma anche una semplice rimozione ed interruzione della terapia, nonché permette anche di evitare quelli che sono i principali svantaggi della somministrazione orale come la degradazione del farmaco a livello gastro-intestinale ed il metabolismo di primo passaggio [2]. Inoltre, i sistemi transdermici non sono invasivi e possono essere addirittura auto-somministrati, possono fornire un rilascio per lunghi periodi di tempo (fino ad una settimana) e sono generalmente poco costosi. Inoltre, la veicolazione transdermica presenta anche vantaggi rispetto alle iniezioni ipodermiche, che risultano essere dolorose, generano rifiuti sanitari pericolosi e che potrebbero prevenire il rischio di trasmissione di malattie dovute al riutilizzo dell' ago, soprattutto nei paesi in via di sviluppo [1].

Per comprendere meglio come avviene l'assorbimento transcutaneo del farmaco occorre descrivere quella che è la struttura della cute.

La cute è costituita fondamentalmente da tre strati principali: l'epidermide, il derma e l'ipoderma. L'epidermide, che rappresenta lo strato più importante per la sua funzione di barriera, nonché il più esterno, è costituito principalmente da diverse cellule, tra cui le più numerose sono i cheratinociti. Essa è organizzata a sua volta in diversi strati; dall'esterno verso l'interno troviamo: lo strato corneo, lo strato lucido (presente solo nel palmo delle mani e dei piedi), lo strato granuloso, lo strato spinoso, e lo strato basale che confina con il derma [3].

Il derma si trova al di sotto dell'epidermide. Esso è costituito da una lamina di tessuto connettivo, nella quale si trovano cellule come i fibroblasti e una matrice extracellulare semigel, nella quale si trovano immerse numerose fibre di collagene e di elastina [4,5]. In esso si possono individuare due differenti strati: lo strato reticolare e lo strato papillare, che differiscono tra loro per il quantitativo di fibre presenti [6]. Nel derma, come è stato accennato sopra, si trovano anche terminazioni nervose ed una fitta rete di capillari, importanti per la nutrizione della cute, per la termoregolazione, e per l'immunoprotezione grazie alla presenza di cellule immunitarie come mastociti e macrofagi [5].

Infine, l'ultimo strato è rappresentato dall'ipoderma, detto anche tela sottocutanea. Esso è costituito da tessuto connettivo lasso situato tra il derma e la fascia muscolare ma si differenzia dal derma per la presenza di adipociti; strutturalmente, consta della sovrapposizione di tre strati: lo strato profondo, lo strato intermedio, e lo strato superficiale [7].

La Figura 1.1 permette di comprendere meglio l'organizzazione in strati della cute.

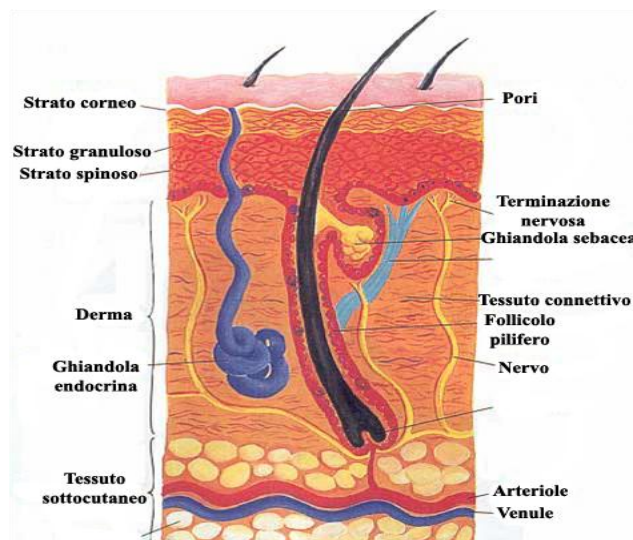


Figura 1.1. Struttura della cute. Nella figura vengono mostrati i diversi strati che costituiscono la cute. Adattato da [5].

Lo strato più importante per l'assorbimento transcutaneo, e sul quale ci soffermeremo più a lungo, è lo strato corneo, il quale per composizione chimica, biologica, enzimatica, struttura tridimensionale, ed organizzazione molecolare e sovra-molecolare risulta essere scarsamente permeabile, tanto da offrire una difesa importante verso l'ambiente esterno [3]. Esso è costituito infatti da una serie di strati di cellule morte chiamate corneociti, unite tra loro grazie ai corneo-desmosomi e contemporaneamente immerse in una matrice lipo-proteica, disposta in doppio strato e costituita da colesterolo e suoi derivati, ceramidi, acidi grassi e trigliceridi.

Lo strato corneo viene descritto come una struttura simile ad un muro dove i corneociti rappresentano i mattoni, e la matrice lipo-proteica il cemento (*brick and mortar model*) [8]. Esso può essere suddiviso in strato corneo "compatto" (più interno) e "disgiunto" (più esterno) in base alla quantità di corneodesmosomi presenti: nel primo la compattezza è data dall'alto numero di corneodesmosomi che oltretutto sono ancora intatti, mentre dirigendosi verso gli strati più superficiali i corneodesmosomi subiscono una degradazione [4].

L'osservazione tridimensionale dello strato corneo, mostra che i lipidi si assemblano originando un impaccamento ortorombico laterale molto compatto. Tuttavia, solo nelle parti più superficiali dello stesso, l'impaccamento dei lipidi risulta essere di tipo esagonale. In esso infatti, a causa del processo di degradazione dei corneo-desmosomi, gli spazi tra i corneociti sono più ampi, permettendo pertanto la penetrazione di sebo e sudore, responsabili della disorganizzazione lipidica. Inoltre, l'impaccamento di tipo esagonale si trova anche nei pazienti con patologie della pelle, ma in questo caso è presente sia nello strato corneo compatto che in quello lasso [3].

Nonostante ciò, l'attraversamento dello strato corneo non è impossibile e può avvenire attraverso due vie: la via transfollicolare e la via transepidermica. La prima via sfrutta gli

annessi cutanei, mentre la seconda si divide ulteriormente in via transcellulare, dove il passaggio avviene attraverso i corneociti e la matrice lipo-proteica, ed in via intercellulare, dove il passaggio avviene solo attraverso la matrice lipo-proteica. La via intercellulare si divide ulteriormente nella via intercellulare polare e apolare, a seconda che il passaggio avvenga tra le teste polari o le code apolari dei lipidi della matrice, come mostrato in Figura 1.2.

Sebbene la struttura chimico-fisica strutturale crea dei gravi impedimenti agli agenti che volessero penetrare e/o permeare la cute, esistono anche altri fattori che influenzano l'assorbimento transcutaneo. Questi sono riassunti brevemente qui di seguito.

Caratteristiche chimico-fisiche del farmaco. I fattori di maggiore influenza sono: il coefficiente di diffusione del farmaco nel veicolo, il pKa, il coefficiente di ripartizione olio/acqua nello strato corneo, il peso molecolare (che deve essere inferiore a 1000 Da per permettere la permeazione), nonché il metabolismo (sia quello causato dagli enzimi presenti nella cute, sia quello dovuto alla normale flora batterica presente sulla cute) ed infine le possibili interazioni con le proteine che bloccherebbero la permeazione del farmaco [9].

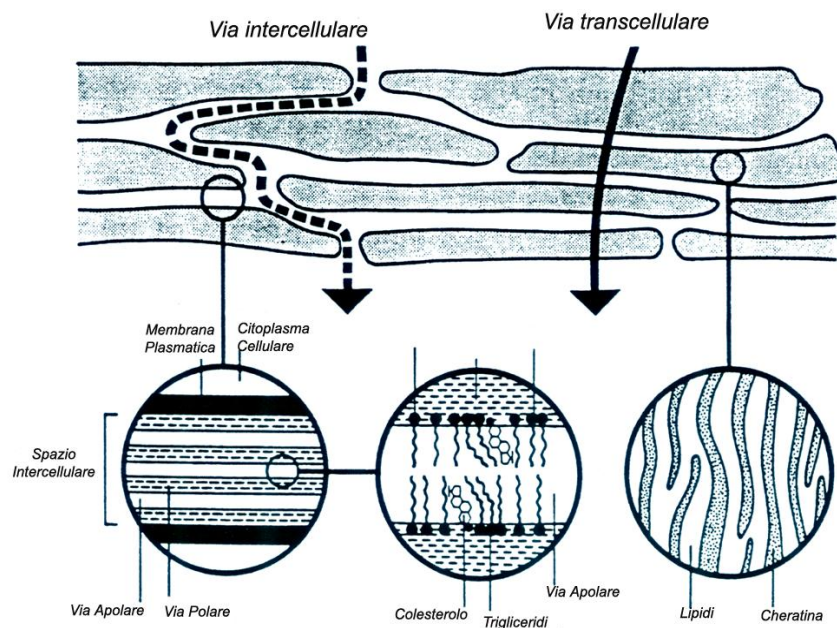


Figura 1.2. Vie di permeazione transepidermiche dello strato corneo. Nella figura sono mostrate le due vie di permeazione transepidermiche dello strato corneo, la via intercellulare a sinistra e quella transcellulare a destra. Se una molecola permea attraverso la via intercellulare, essa potrà inoltre seguire la via polare o la via apolare, come mostrato nell'ingrandimento. Adattato da [2].

Luogo e condizioni della pelle nel sito di applicazione. In questo caso si prendono in considerazione: lo spessore cutaneo del punto di applicazione, esso infatti varia a seconda delle diverse zone del corpo e laddove sarà spesso si avrà un più lento assorbimento; il grado di idratazione, che normalmente dovrebbe essere compreso tra 5-

15%; la presenza di lesioni o di patologie nel sito di applicazione ed infine il sesso, la razza e l'età del paziente, che comportano delle variazioni nello spessore e nella composizione lipidica della cute stessa [9].

Natura del veicolo e formulazione. Di notevole importanza sono la viscosità del veicolo, in quanto al suo diminuire aumenta la velocità di diffusione del farmaco, l'occlusività della formulazione, che aumentando permette una maggiore idratazione, ed infine la presenza di sostanze che ritardano o aumentano la penetrazione, come solventi, tensioattivi ed altre [9].

Dalla descrizione dello strato corneo e di quelli che sono i fattori che influenzano la veicolazione transdermica si evince pertanto che i farmaci di natura idrofila, con un basso coefficiente di ripartizione e di diffusione difficilmente riescono a penetrare nella cute e necessitano per questo di un ausilio.

Nel progetto del quale fa parte questa tesi, il farmaco preso in esame è l'ibuprofene sale sodico che chimicamente è il sale di un acido carbossilico, e che possiede una natura idrofila a causa del suo basso peso molecolare.

Come dimostrato in letteratura la forma sale sodica è caratterizzata da un maggior assorbimento ma anche da una maggiore facilità di discioglimento in un mezzo acquoso. Infine, l'ibuprofene sodico presenta un punto di fusione molto più alto rispetto alla forma acida (220 vs 74 - 77 °C) ed un'azione molto più rapida ed efficace nel sollievo dal dolore [10].

L'ibuprofene sodico, assieme al Diclofenac sodico, risultano essere i FANS più comunemente prescritti e popolari. Nonostante, il loro eccellente risultato terapeutico tendono a provocare irritazione gastrica con conseguente ulcera, causata dalle incisioni nella mucosa per le alte dosi cliniche somministrate [11]. Per tale ragione la veicolazione transdermica sarebbe il metodo di somministrazione migliore che potrebbe avere parecchi vantaggi tra cui evitare tali effetti collaterali sopra citati [12].

I carrier prescelti per la veicolazione di questo farmaco sono delle nanoparticelle lipidiche (NP), con dimensioni nell'ordine di alcune centinaia di nanometri. In particolare, saranno utilizzate delle nanoemulsioni (NE) e delle nanocapsule (NC), che si differenziano tra loro in quanto le prime possiedono una carica negativa fornita dalle teste lipidiche, e le seconde una carica positiva conferita da un rivestimento polissacaridico che forma appunto la capsula.

In alcuni studi precedenti, nei quali le NP sono state marcate con un lipide fluorescente, è stata riscontrata la presenza di fluorescenza nello strato corneo e nell'epidermide vitale, risultati che suggeriscono un effetto promotore dell'assorbimento di questi carrier. Pertanto, lo scopo di questo studio è quello di verificare innanzitutto se queste NP saranno in grado di trasportare quelle molecole che, per loro natura, non sarebbero in grado di attraversare lo strato corneo, come nel caso dell'ibuprofene sale sodico. Inoltre, si cercherà anche di capire quanto farmaco possa rimanere nella cute,

per definire meglio anche quella che sarà la loro applicazione cutanea. Questo verrà fatto attraverso l'utilizzo di celle di diffusione verticali, dove sarà applicata la formulazione sulla cute, che si troverà disposta tra due celle, la cella donatrice superiore e quella ricevente inferiore. Ciò che si andrà a verificare successivamente, sarà la quantità di farmaco che avrà attraversato la cute, che quindi si troverà disciolta nel liquido che mima i liquidi biologici nella cella ricevente, e la quantità di farmaco che invece sarà rimasta sugli strati della cute.

Per poter effettuare una corretta quantificazione del farmaco rimasto intrappolato nel tessuto, si è pensato di procedere con la degradazione della cute a contatto con la formulazione.

In letteratura sono stati trovati pochi riferimenti bibliografici, infatti è stato seguito il protocollo di degradazione presente nell'articolo di Brown *et al.* [13] integrato dai suggerimenti dati dagli autori del testo "*Culture of Animal cells, a manual of basic technique*" [14] che procedono utilizzando un metodo simile. Infatti, entrambi utilizzano come mezzo di degradazione la Collagenase.

Successivamente, è stato anche necessario trovare un metodo adeguato per la deproteinizzazione della cute disciolta, per poter procedere con la quantificazione del farmaco attraverso l'utilizzo della cromatografia liquida ad alta prestazione.

Nel corso dello studio sono state testate diverse tecniche che prevedevano l'utilizzo di: solventi organici come il metanolo, di un criotrattamento abbinato all'utilizzo del metanolo, di microprovette filtranti (Amicon), di cartucce Spe ed infine della metodica del Folch. Inoltre, l'efficacia dei diversi trattamenti deproteinizzanti è stata testata attraverso l'utilizzo del kit NanoOrange di quantificazione proteica ed attraverso la realizzazione di spettri UV-Vis.

Infine, questa tesi si pone anche l'obiettivo di ricercare un metodo di separazione in HPLC del farmaco in esame per la quantificazione dello stesso. Lo scopo è stato quello di trovare una metodica che permettesse un trattamento minimo del campione derivante dall'esperimento di veicolazione transdermica. In letteratura sono stati trovati alcuni lavori sulla quantificazione dell'ibuprofene sodico, che hanno mostrato l'utilizzo di metodiche molto differenti tra loro per tipo di fase mobile utilizzata, pH, tipologia di tampone, tempo di eluzione [10, 11, 15, 16]. Come verrà meglio esposto nei successivi paragrafi, sono state effettuate diverse prove per riuscire ad ottenere un metodo validato di separazione ed è stata inoltre, elaborata una retta di calibrazione che ha permesso la quantificazione di campioni con concentrazione incognita. Ciò ovviamente ha anche richiesto uno studio attento di alcune caratteristiche chimico-fisiche del farmaco.

2

Kit NanoOrange

2.1. Introduzione

È stato sviluppato un nuovo metodo di quantificazione proteica basato sul legame di un colorante fluorescente alle proteine dalla semplice esecuzione, rapido e sensibile [17].

Il metodo NanoOrange è perciò attraente per il suo potenziale uso su una stazione robotizzata di pipettaggio per eseguire analisi proteiche automatizzate che potrebbe poi integrarsi con altre reazioni biochimiche automatizzate per la scoperta di farmaci [17].

In questo capitolo vengono elencati i materiali e gli strumenti utilizzati per la quantificazione delle proteine. Vengono anche descritte le metodiche e le modalità di allestimento degli esperimenti condotti. Infine vengono anche mostrati e commentati i risultati ottenuti.

2.2. Materiali

Prodotti chimici. In generale, tutti i prodotti chimici sono stati conservati come prescritto dal produttore, ed utilizzati senza nessuna ulteriore purificazione o reazione chimica. Laddove questa frase non fosse soddisfatta, sarà indicato nel testo la motivazione e l'accorgimento attuato. I prodotti chimici usati sono: Albumina bovina (ABSL, Sigma,), il Kit NanoOrange® per la quantificazione delle proteine (Invitrogen; lotto 1, n. 50468A; lotto 2, n. 50985A; lotto 3, n. 871269, in ordine di arrivo) che è costituito da tre componenti. Il kit comprende, infatti, il reagente (Componente A; 1 mL, 500×, DMSO), il diluente (Componente B; 50 mL, 10×) contenente sodio azide 2 mM, e lo standard di albumina bovina BSA (Componente C; 500 µL, 2 mg/mL) contenente sodio azide 2 mM.

Le raccomandazioni della casa madre, riguardo alla temperatura ottimale per la conservazione dei componenti, prevedevano una temperatura compresa tra $\leq 2-6^{\circ}\text{C}$ per tutti i componenti del kit. È stato notato, però, che tali indicazioni sono state modificate nel

tempo, in quanto nell'ultimo kit acquistato (lotto 3), è stata indicata la medesima temperatura per i componenti A e C, ma per quanto riguarda il componente B, la temperatura di riferimento appariva modificata a 18-25 °C.

Di conseguenza, i componenti A e C sono stati sempre mantenuti nel frigorifero ad una temperatura oscillante tra i 4-6°C, mentre per quanto concerne il componente B il lotto 1 è stato conservato in frigo, il lotto 2 per un periodo è stato in frigo e poi è stato trasferito a temperatura ambiente (20-25°C), ed il lotto 3 è rimasto esclusivamente a temperatura ambiente.

Inoltre, è stata utilizzata dell'acqua Milli-Q (WMQ) prodotta in laboratorio.

Altro. In aggiunta, sono stati utilizzati: tubi da centrifuga in polipropilene da 50 mL non sterili (Euroclone; provette da 50), puntali per micropipette da 20, 200 e 1000 μ L (Eppendorf o Gilson), pipette graduate in vetro da 10 mL (pipette graduate), bottigliette in vetro con tappo a vite da 12 mL (bottigliette), carta stagnola, parafilm, carta da pesata (Macherey-Nagel, Wägebapier MN 226), cuvette in plastica con quattro facce ottiche (Kartell; cammino ottico di 1 cm), e cuvette in vetro (Turner Designs, P/N 8000-931, volume per una buona lettura: 75-200 μ L).

Tutta la vetreria e gli oggetti in plastica riutilizzabili sono stati accuratamente lavati con detersivo (le bottigliette rimangono a contatto con dell'acqua saponata per ca. 2 ore), risciacquati con acqua di fonte, e successivamente con WMQ. Le cuvette in plastica ed in vetro sono state sempre lavate abbondantemente con WMQ e lasciate asciugare in posizione capovolta per evitare l'ingresso di polvere.

Protezione. L'operatore ha sempre utilizzato i dispositivi di protezione personale quali: camice, guanti monouso in nitrile o lattice, e calzari di protezione.

2.3. Strumenti

Gli strumenti utilizzati sono i seguenti: un sistema per la produzione di WMQ (Labo Star 7TWF-DI/UV, Siemens), alcune micropipette a volume variabile da 20, 200, e 1000 μ L (Eppendorf e Gilson), un pipettatore (Accu-Jet, Brand), un frigorifero (SA 300 L, Indesit), un fluorimetro portatile (Picofluor™ 8000-004, Turner Designs; canale blu: exc. 475 ± 15 nm, em. 515 ± 20 nm, canale rhod: exc. 525 ± 20 nm, em. > 570 nm), una stufa non ventilata (E28, Binder GmbH), un pH-metro (pH 5/6, Eutech Instruments Pte Ltd.), con sonda termometrica incorporata (EC-PH5-TEM01P/ 35613-05, Eutech Instruments Pte Ltd.) ed una centrifuga (Minispin Plus 5453, Eppendorf).

2.3.1 Settaggio del fluorimetro

Innanzitutto, è stato controllato lo stato di pulizia dello strumento, in modo particolare del vano nel quale viene inserita la cuvetta. In seguito, il fluorimetro è stato acceso, e si è atteso qualche secondo per il completamento positivo della sua inizializzazione. Successivamente, è stato settato il canale di lettura di interesse (blu) attraverso l'utilizzo del tasto dedicato <A/B>. Inoltre, è stato anche controllato il valore impostato del parametro <STD VAL> (range: 1-999), in quanto influenza la risposta del fluorimetro. È stato infatti notato che la fluorescenza di uno stesso campione aumenta all'aumentare di tale parametro.

Il parametro <STD VAL> viene utilizzato quando si vuole inserire una retta di calibrazione nella memoria dello strumento. Operando in questo modo, sebbene lo strumento restituisca, per ogni lettura, dei numeri che sono concentrazioni, non è possibile avere il completo controllo delle misurazioni. Pertanto, si è ritenuto opportuno considerare questi numeri come delle unità arbitrarie e settare il parametro <STD VAL> a 100.

2.4 Metodi

2.4.1 Cuvette in plastica

Il giorno prima dell'esperimento della quantificazione, sono stati misurati i bianchi di ciascuna cuvetta in plastica, intendendo come bianco, il valore che lo strumento forniva in risposta alla fluorescenza dell'acqua. Tale misurazione è stata effettuata utilizzando delle cuvette pulite ed esenti, internamente ed esternamente, da graffi, pelucchi, o impronte digitali. Le cuvette sono state disposte in una scarabattola numerata. In ciascuna cuvetta sono stati pipettati 2 mL di WMQ, e si è annotato il valore fornito dalle tre letture ripetute dal fluorimetro e la posizione della cuvetta nel portacuvette. Inoltre, con un pennarello si è eseguito un segno, nella parte alta delle cuvette, in modo che le stesse potessero essere successivamente inserite nello strumento con il medesimo orientamento. Si è notato, infatti, che una stessa cuvetta può fornire quattro diversi bianchi, dei quali si è scelto quello più basso. Infine, le cuvette sono state svuotate, e lasciate asciugare a temperatura ambiente ed in posizione capovolta.

2.4.2 Cuvette in vetro

Le cuvette in vetro sono state inizialmente lavate (Par. 2.2), fatte asciugare in stufa a 100°C, ed infine accuratamente lucidate con un panno in microfibra per eliminare eventuali aloni

formati durante l'asciugatura. Successivamente, sono stati misurati, in triplice lettura, i bianchi di ciascuna cuvetta, ossia i valori di fluorescenza forniti da WMQ. Per fare ciò, sono stati pipettati ca. 150 μ L di WMQ in ciascuna cuvetta con una pipetta Pasteur (fino al bordo blu della cuvetta). Le cuvette, essendo molto piccole, necessitano di uno specifico supporto che le mantenga in posizione verticale nell'alloggiamento dello strumento. Il supporto utilizzato è in plastica nera molto robusta. In ciascuna delle 4 facce si trova una piccola fenditura attraverso la quale viene permesso il passaggio del fascio luminoso senza fenomeni di scattering. Anche in questo caso, i valori dei bianchi sono stati annotati, le cuvette segnate per la direzione di inserimento, svuotate e messe capovolte ad asciugare a temperatura ambiente.

2.4.3 Quantificazione delle proteine - Curva di calibrazione

Il protocollo da noi utilizzato per l'allestimento della curva di calibrazione prende spunto dal protocollo originale, che pertanto è descritto qui sotto.

2.4.3.1 Curva di calibrazione - Protocollo originale

Circa un' ora prima di allestire una curva di calibrazione, i componenti A e C conservati a 4°C, sono stati lasciati equilibrare a temperatura ambiente su un bancone del laboratorio. Raggiunta tale temperatura, verificata per immersione attraverso una sonda termometrica presente nel pHmetro, il componente A è stato centrifugato (14.100 g, 5 minuti, temperatura ambiente), affinché il DMSO si depositasse sul fondo della microprovetta.

Successivamente, è stato necessario allestire la working solution (WS) necessaria per la preparazione dei campioni a concentrazione nota (i.e., i punti della curva). La WS funge da diluente e reagente, ed è composta da una soluzione acquosa del componente A e B (1 \times). Per prepararla, è stato usato un tubo in plastica da 50 mL, opportunamente rivestito con carta stagnola, nel quale sono stati pipettati i componenti necessari nel seguente ordine (per 30 mL ca.): 3 mL del componente B, 27 mL di WMQ, e 0,06 mL del componente A. Per il calcolo del volume totale della WS da preparare, è stata considerata sia la soluzione necessaria per l'allestimento della curva di calibrazione (17 mL) sia quella utile per la preparazione delle tre madri a diversa concentrazione (12 mL). Inoltre, in tale quantificazione, è stato tenuto conto di una percentuale aggiuntiva di volume del 4%, necessaria per poter prelevare correttamente anche le ultime aliquote.

A causa della natura schiumogena della WS, la miscela è stata delicatamente agitata per inversione manuale non completa per bagnare il tappo.

Successivamente, sono state preparate tre soluzioni madre di Albumina: ABS1, ABS2, e ABS3. La madre a concentrazione 10 $\mu\text{g/mL}$ (ABS1) è stata preparata pipettando 30 μL del componente C e 5970 μL di WS in una bottiglietta rivestita di carta stagnola, che è stata opportunamente agitata manualmente per inversione totale, utilizzando del parafilm come tappo. La madre a concentrazione 1 $\mu\text{g/mL}$ (ABS2) è stata ottenuta dalla miscelazione di 300 μL di ABS1 con 2700 μL di WS come descritto precedentemente. Infine, la madre a concentrazione 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (ABS3) è stata preparata con lo stesso procedimento delle altre due, ma utilizzando 300 μL di ABS2 e 2700 μL di WS. In seguito, tutti i campioni indicati in Tabella 2.1 sono stati allestiti con lo stesso criterio adottato per la preparazione delle madri.

Tabella 2.1. Composizione e concentrazione dei punti della retta (Originali)

Campione	Composizione (mL)				Albumina ($\mu\text{g/mL}$)
	ABS1	ABS2	ABS3	WS	
1	0,00			2,50	0,00
2	2,50			0,00	10,0
3	1,50			1,00	6,00
4	0,75			1,75	3,00
5	0,25			2,25	1,00
6		1,50		1,00	0,60
7		0,75		1,75	0,30
8		0,25		2,25	0,10
9			1,50	1,00	0,06
10			0,75	1,75	0,03
11			0,25	2,25	0,01

Infine, i campioni sono stati messi in stufa non ventilata a 96 °C per 10 minuti, ai quali sono seguiti 20 minuti di raffreddamento a temperatura ambiente, e misurazione della fluorescenza (cuvetta di plastica, 2 mL di campione, ogni campione letto tre volte) in una condizione di scarsa illuminazione del laboratorio. I dati sperimentali così ottenuti, sono stati normalizzati (rispetto al bianco della cuvetta) e successivamente elaborati rispetto al bianco del kit (Tab. 2.1, campione 1). Le fluorescenze sperimentali ricavate sono state messe in correlazione con le rispettive concentrazioni note (Origin 6.0). Infine, la modellizzazione matematica dei dati così ottenuti ha fornito l'equazione che meglio descrive il loro andamento, e che è stata utilizzata per la quantificazione proteica dei campioni incogniti (Par. 2.4.6).

2.4.3.2 Curva di calibrazione - Protocollo modificato

Il protocollo seguito per la maggior parte degli esperimenti di quantificazione proteica, può essere considerato una variante di quello originale, come è possibile notare anche dall'allestimento della curva stessa rappresentata in Tabella 2.2.

Le variazioni e gli accorgimenti che sono stati presi, riguardano in modo particolare: il volume finale dei campioni (da 2,5 a 2,1 mL); l'utilizzo di un'unica soluzione madre di albumina (ABS1; 10 $\mu\text{g/mL}$) per la preparazione di tutti i campioni (2-12 in Tab. 2.2); il tempo di raffreddamento dei campioni (da 20 a 30 minuti); ed infine la variazione dei punti a concentrazione nota che determinano la curva. In modo particolare sono stati eliminati i campioni n. 9-11 (Tab. 2.1) e sono stati aggiunti i campioni n. 3,5, 7, 9 (Tab. 2.2).

Tabella 2.2. Composizione e concentrazione dei punti della retta (modificate)

Campione	Composizione (μL)		Albumina ($\mu\text{g/mL}$)
	ABS1	WS	
1	0	2100	0,0
2	2100	0	10,0
3	1680	420	8,0
4	1260	840	6,0
5	840	1260	4,0
6	630	1470	3,0
7	420	1680	2,0
8	210	1890	1,0
9	168	1932	0,8
10	126	1974	0,6
11	63	2037	0,3
12	21	2079	0,1

2.4.4 Preparazione delle soluzioni di ABSL

Per la preparazione di alcune soluzioni e campioni contenenti la sostanza ABSL sono stati inizialmente pesati 10 mg di sostanza utilizzando la bilancia analitica precedentemente calibrata e della carta da pesata. Successivamente, la sostanza è stata trasferita per versamento in un matraccio di vetro (100 mL); i residui sono stati recuperati facendo gocciolare WMQ con una pipetta Pasteur sulla carta da pesata. La soluzione (ca. 100 mL) è stata agitata manualmente per favorire la dissoluzione della ABSL, ed infine è stata portata a volume. È stata così ottenuta una soluzione di ABSL a concentrazione 100 $\mu\text{g/mL}$ (ABSL1), che è stata utilizzata nell'arco di due settimane, dopo aver costantemente controllato il suo stato, e in modo particolare la presenza di muffe. Tale concentrazione è servita da soluzione madre per la preparazione della soluzione ABSL2 (10 $\mu\text{g/mL}$), scelta in base alla concentrazione della soluzione ABS1 (Par. 2.4.3.1).

La soluzione ABSL2 è stata preparata come di seguito descritto. In una bottiglietta (12 mL) sono stati pipettati 1 mL della soluzione ABSL1 e 9 mL di WMQ. L'aggiunta dell'acqua è sufficiente a miscelare la soluzione. La sua preparazione è sempre stata effettuata il giorno stesso dell'esecuzione dell'esperimento.

Inoltre, è stata preparata un'altra soluzione di ABSL, indicata con l'acronimo ABSL3, e che è stata preparata in una bottiglietta (12 mL) dove sono stati versati 2,5 mg di ABSL (pesati e recuperati come precedentemente descritto) e poi sono stati pipettati 9,5 mL di WMQ utilizzando una pipetta graduata in plastica (10 mL). Pertanto, la soluzione ABSL3 ha una concentrazione di 263,16 $\mu\text{g/mL}$.

Le soluzioni ABSL2 e ABSL3 sono state utilizzate per la preparazione dei campioni (in WS, vedi Tab. 2.3-2.9) allestiti per gli esperimenti di validazione della curva di calibrazione e per la messa a punto del volume di campione incognito da utilizzarsi per la sua quantificazione.

La sequenza dei vari esperimenti che hanno portato al protocollo finale per la validazione è dettagliatamente descritta nei risultati (Par. 2.5.1 e 2.5.2). Qui si riporta solo che il protocollo di validazione è stato allestito pensando ad un campione vero incognito, cioè che non si trovi disciolto in WS ma, per esempio, in WMQ. Pertanto, si sono usati 80 μL di campione "incognito" a determinate concentrazioni (10, 8, 6, 4, 2, e 1 $\mu\text{g/mL}$), ai quali si sono aggiunti 2,020 mL di WS. Una volta allestiti, questi campioni sono stati trattati ed analizzati come descritto nel Paragrafo 2.4.3.1.

2.4.5 Analisi dei campioni incogniti provenienti dalla cute

In una bottiglietta rivestita di carta stagnola, sono stati pipettati 0,1 mL di campione e 2,0 mL di WS.

In seguito, è stato seguito il protocollo descritto nel Paragrafo 2.4.3, ed è stata infine, eseguita l'analisi fluorimetrica secondo le modalità e gli accorgimenti descritti nel Paragrafo 2.4.3.

I dati sperimentali ottenuti dalla tripla lettura di ciascun campione incognito, sono stati elaborati secondo quello descritto nel Paragrafo 2.4.3 ed è stata calcolata la concentrazione proteica ($\mu\text{g/mL}$), utilizzando l'equazione della curva di calibrazione.

2.4.6 Analisi dei dati.

I dati sperimentali sono stati elaborati ed analizzati utilizzando i software Excel 2007 e Origin 6.0. Infine, l'analisi statistica è stata condotta utilizzando lo Student's *t*-test (*n.d.e.*; *per due popolazioni dispari*) dove un $p \leq 0,05$ è stato considerato significativo.

2.5 Presentazione e discussione dei risultati

Nei seguenti paragrafi saranno descritti e discussi i risultati degli esperimenti fatti per mettere a punto il protocollo definitivo per la quantificazione proteica seguendo l'ordine cronologico in cui sono stati ottenuti.

2.5.1 Esperimenti sul protocollo originario

La prima curva di calibrazione realizzata, utilizzando il kit vecchio, ha seguito ciò che è stato descritto nel Paragrafo 2.4.3.1, con la sola eccezione della misurazione dei bianchi delle cuvette in plastica (Par. 2.4.1) in singola lettura.

Per l'esperimento sono stati preparati e analizzati gli undici campioni (Par. 2.4.3), dei quali sono stati quantificati 2 dei 2,5 mL di volume totale del campione (vedi oltre Fig. 2.1.A). Successivamente, è stata analizzata anche una parte del volume rimanente (0,2 mL) per effettuare un'ulteriore analisi con le cuvette in vetro, delle quali però non erano noti i valori dei bianchi (vedi oltre Fig. 2.1.B). In seguito, sono stati elaborati i dati di entrambe le analisi (Par. 2.4.3.1).

La Tabella 2.3 mostra i valori di fluorescenza ottenuti dalle due modalità di lettura dei campioni con i due diversi tipi di cuvette e la loro elaborazione matematica.

È possibile notare al suo interno la presenza di quattro colonne di dati a loro volta suddivise per i campioni analizzati in cuvette di plastica (1) e in cuvette di vetro (2). Nella terza colonna da sinistra sono rappresentati i valori di fluorescenza della WMQ (W), nella quarta quelli del campione (C), nella quinta quelli del campione normalizzato rispetto al bianco della cuvetta (CN) ed infine quelli del campione normalizzato anche rispetto al bianco del kit (CF).

Tabella 2.3. Dati ottenuti dall'analisi in cuvette di plastica (1) e vetro (2)

Campione	Albumina µg/mL	W		C		CN		CF	
		1	2	1	2	1	2	1	2
1	0,0	191,4	-	217,1	8,6	25,7	-	0,0	0,0
2	10,0	269,0	-	735,1	31,7	466,1	-	440,4	23,1
3	6,0	250,2	-	530,3	22,7	280,1	-	254,4	14,1
4	3,0	165,7	-	294,4	12,2	128,7	-	103,0	3,6
5	1,0	268,3	-	302,4	5,6	34,1	-	8,4	-3,0
6	0,6	176,3	-	235,2	2,7	58,9	-	33,2	-5,9
7	0,3	245,3	-	281,4	1,9	36,1	-	10,4	-6,7
8	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
9	0,06	212,1	-	189,1	2,1	-23,0	-	-48,7	-6,5
10	0,03	263,2	-	297,4	3,4	34,2	-	8,5	-5,2
11	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-

Nella Tabella 2.3 si nota la mancanza dei valori relativi ai campioni n. 8 e n. 11 in quanto andati persi nel corso dell'esperimento. I dati ottenuti mostrano una fluorescenza non proporzionale alle concentrazioni e si notano anche alcuni valori negativi che si discostano parecchio dai risultati attesi. Pertanto, è stato deciso di ripetere l'esperimento, uniformando le due tecniche di lettura, e quindi misurando i bianchi delle cuvette in vetro (Tab. 2.4).

Tabella 2.4. Elaborazione dei dati ottenuti da cuvette di plastica (1) e vetro (2) con bianchi noti

Campione	Albumina µg/mL	W		C		CN		CF	
		1	2	1	2	1	2	1	2
1	0,0	136,2	2,1	147,2	4,1	11,0	2,0	0,0	0,0
2	10,0	169,1	2,5	472,8	26,2	303,7	23,6	292,7	21,6
3	6,0	136,3	2,5	380,2	20,4	243,9	17,9	232,9	15,9
4	3,0	129,9	3,2	237,2	11,1	107,2	7,9	96,2	5,9
5	1,0	143,5	3,0	164,4	3,9	20,9	0,9	9,9	-1,1
6	0,6	129,2	2,3	151,4	5,3	22,2	3,1	11,2	1,9
7	0,3	205,2	2,5	213,8	3,8	8,6	1,2	-2,4	-0,8
8	0,1	124,1	2,2	140,1	4,0	16,0	1,8	5,0	-0,2
9	0,06	133,1	1,9	147,1	5,8	14,0	4,0	3,0	1,9
10	0,03	132,2	2,2	142,3	3,8	10,1	1,6	-0,9	-0,4
11	0,01	164,1	0,7	174,8	5,4	10,7	4,7	-0,3	2,7

Da quanto mostrato in Tabella 2.4, la misurazione dei bianchi delle cuvette in vetro non sembra aver apportato dei miglioramenti, vista la mancata proporzionalità tra fluorescenza e concentrazione e la presenza di valori negativi.

Nella Figura 2.1.A è mostrato il confronto tra i due esperimenti caratterizzati dall'analisi di 2 mL di campione nelle cuvette di plastica, mentre nella Figura 2.1.B viene visualizzato l'andamento della curva ottenuta dall'analisi di 0,2 mL di campione in cuvette di vetro nei due giorni differenti, con e senza la misurazione dei rispettivi bianchi, ossia con e senza normalizzazione.

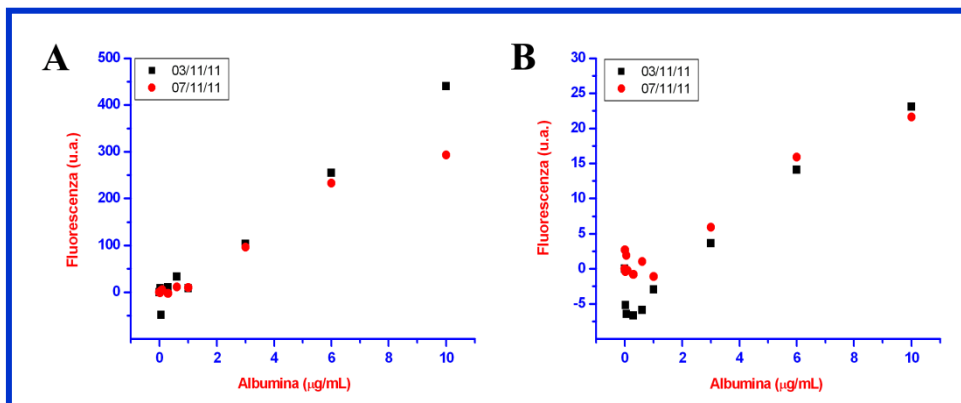


Figura 2.1. Curve di callbrazione ottenute con cuvette in plastica (A) e vetro (B)

Nella Figura 2.1.A non sono presenti evidenti differenze date dalla ripetizione dell'esperimento, se non per il punto a massima concentrazione che mostra una fluorescenza più bassa, e per il punto a concentrazione più bassa, (0,01 µg/mL) che risulta essere negativa.

La Figura 2.1.B, invece, mette a confronto la curva non normalizzata (in nero) con quella normalizzata (in rosso), evidenziando la presenza di fluorescenze negative nella porzione bassa (0,1-1 µg/mL) in entrambi i casi. Nonostante questo, nella curva non normalizzata si conserva un andamento dei punti quasi polinomiale, che viene a mancare nella normalizzata, nella quale si presenta un maggior disordine. Inoltre, non è stato possibile verificare la similarità dei punti alti della curva (10-3 µg/mL) attraverso un'analisi statistica in quanto $n = 1$.

In seguito ai risultati ottenuti, è stata programmata la ripetizione dell'esperimento per testare la manualità dell'operatore e la riproducibilità del kit.

Sono così stati preparati gli undici campioni costituenti la curva di calibrazione (Par. 2.4.3), utilizzando la WS preparata al momento. Sono poi stati analizzati ed elaborati come descritto nel Paragrafo 2.4.3.1 utilizzando le cuvette in plastica ed in vetro delle quali erano noti i bianchi.

Lo stesso esperimento è stato ripetuto nel pomeriggio, partendo dalla preparazione della necessaria WS utilizzando i componenti che stavano a temperatura ambiente dalla mattina. In seguito è stata eseguita l'analisi e la successiva elaborazione dei dati come fatto la mattina.

Le Tabelle 2.5 e 2.6 mostrano il dettaglio dei valori ottenuti dagli esperimenti rispettivamente delle cuvette in plastica e delle cuvette in vetro. In entrambe è possibile individuare i dati ottenuti la mattina (1) e la sera (2), le fluorescenze dei bianchi delle cuvette (W), la fluorescenza dei campioni (C), la fluorescenza dei campioni dopo normalizzazione (CN) e quella ottenuta in seguito alla normalizzazione rispetto al bianco del kit (CF).

Tabella 2.5. Risultati delle curve di calibrazione di 2 mL di campione

Campione	Albumina μg/mL	W		C		CN		CF	
		1	2	1	2	1	2	1	2
1	0,0	125,4	261,4	126,4	251,6	1,0	-9,8	0,0	0,0
2	10,0	124,4	238,5	382,1	616,7	257,7	378,2	256,7	388,0
3	6,0	198,0	220,6	417,8	502,2	219,8	281,6	218,8	291,4
4	3,0	184,9	247,8	301,8	371,6	116,9	123,8	115,9	133,6
5	1,0	187,3	163,8	212,0	203,0	24,7	39,2	23,7	49,0
6	0,6	137,0	183,4	161,9	201,1	24,9	17,7	23,9	27,5
7	0,3	170,1	183,3	179,6	221,1	9,5	37,8	8,5	47,6
8	0,1	142,4	184,6	153,0	192,8	10,6	8,2	9,6	18,0
9	0,06	161,3	167,1	162,1	362,3	0,8	195,2	-0,2	205,0
10	0,03	177,9	141,9	185,7	163,8	7,8	21,9	6,8	31,7
11	0,01	228,6	142,4	231,5	148,8	2,9	6,4	1,9	16,2

Dai risultati riportati in Tabella 2.5 (CF), si notano delle fluorescenze più alte la sera e una non proporzionalità tra le fluorescenze e le concentrazioni in entrambi gli esperimenti.

Tabella 2.6. Risultati delle curve di calibrazione di 0,2 mL di campione

Campione	Albumina μg/mL	W		C		CN		CF	
		1	2	1	2	1	2	1	2
1	0,0	1,6	4,3	3,15	4,2	1,6	-0,1	0,0	0,0
2	10,0	3,7	3,0	22,1	30,7	18,4	27,7	16,8	27,8
3	6,0	4,9	3,7	19,4	21,7	14,5	18,0	12,9	18,1
4	3,0	1,2	2,4	10,7	10,4	9,6	7,9	8,0	8,0
5	1,0	2,0	3,6	4,7	3,9	2,6	0,3	1,1	0,3
6	0,6	4,6	3,2	2,6	3,6	-2,0	0,4	-3,6	0,5
7	0,3	4,1	3,1	5,4	3,7	1,3	0,6	-0,3	0,6
8	0,1	3,5	5,7	3,6	4,5	0,1	-1,1	-1,5	-1,1
9	0,06	2,7	3,0	3,5	3,4	0,8	0,4	-0,8	0,5
10	0,03	1,2	3,0	2,1	5,1	0,9	2,1	-0,7	2,2
11	0,01	3,9	3,5	3,4	3,5	-0,5	-0,9	-2,1	-0,8

Mentre nella Tabella 2.6 (CF), relativa alle cuvette in vetro, si evince una scarsa ripetibilità tra le due repliche, la presenza di fluorescenze negative soprattutto la mattina, e una mancata proporzionalità tra le concentrazioni e le fluorescenze. I dati normalizzati (CF), sono stati poi utilizzati per una rappresentazione grafica mostrata nella Figura 2.2

La Figura 2.2.A mostra il grafico dei dati relativi alla ripetizione delle analisi effettuate con le cuvette di plastica, mentre la Figura 2.2.B, illustra i grafici relativi all'esperimento eseguito di mattina e di sera con le cuvette di vetro.

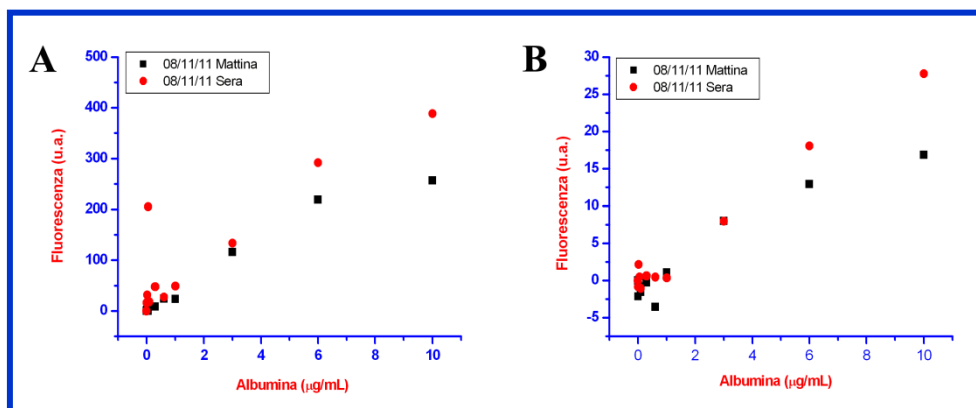


Figura 2.2. Curve di calibrazione analizzate in cuvette in plastica (A) e in vetro (B)_Ripetute_

In entrambe le rappresentazioni (Fig. 2.2.A e 2.2.B) è possibile notare un leggero aumento della fluorescenza nell'esperimento realizzato il pomeriggio, maggiormente evidente nei punti a concentrazione 10 e 6 µg/mL. I punti a concentrazione 1 e 3 µg/mL coincidono in ciascuno dei due esperimenti mostrando una forte ripetibilità, la quale viene nuovamente a mancare nel range compreso tra 0,6-0,01 µg/mL.

Conseguentemente ai risultati poco soddisfacenti sono state apportate delle modifiche al protocollo di riferimento.

2.5.2. Esperimenti col protocollo modificato

Le variazioni apportate hanno riguardato, in primo luogo, l'eliminazione delle tre madri con le quali preparare gli undici punti della curva, che sono state sostituite con un'unica madre a concentrazione 10 µg/mL, ed inoltre sono state modificate le concentrazioni determinanti i punti della curva, eliminando quelle molto basse, che hanno mostrato un'elevata instabilità nel corso delle prove effettuate (0,1-0,01 µg/mL) ed aggiungendo delle concentrazioni intermedie (8, 4, 2, e 0,8 µg/mL) che meglio caratterizzassero l'intero range preso in considerazione.

Per verificare l'effetto di tali cambiamenti è stato eseguito un primo esperimento, utilizzando sempre il kit vecchio, nel quale sono stati allestiti i dodici campioni della curva con la WS appena preparata. Successivamente sono stati analizzati sia con le cuvette in plastica che in vetro, e si sono elaborati i dati. La realizzazione della curva di calibrazione con le caratteristiche appena descritte è stata ripetuta anche nel pomeriggio, preparando tutto al momento, compresa la WS per la quale sono stati utilizzati i componenti lasciati fuori dal frigo dalla mattina. Sono poi stati trattati ed analizzati come fatto nella curva realizzata la mattina dello stesso giorno. Durante l'analisi fluorimetrica del campione n. 3 è stato notato che se si ripeteva la lettura una seconda volta, senza rimuovere la cuvetta dal proprio alloggiamento, lo strumento forniva un valore di fluorescenza che non era identico al precedente, ma allo stesso tempo non totalmente diverso dal primo. In seguito a questo fatto, dal campione in questione in poi, sono state registrate tre letture della fluorescenza, per poter poi essere in grado di calcolarne una media nel corso della successiva elaborazione dei dati (Tab. 2.7).

La Tabella 2.7 mostra i valori di fluorescenza dei campioni registrati con tre letture successive a partire dal campione n. 3, dei quali sono state calcolate le medie per poter poi proseguire con l'elaborazione matematica dei dati sperimentali.

Nel calcolo della media si è prestato attenzione a prendere in considerazione dei valori simili tra loro, escludendo, dove necessario, quelli che si discostavano significativamente.

Tabella 2.7. Risultati delle triple letture di 2 mL e 0,2 mL di campione

Campione	Albumina $\mu\text{g/mL}$	Fluorescenza 2 mL				Fluorescenza 0,2 mL			
		1	2	3	media	1	2	3	media
1	0,0	246,3	-	-	246,3	1,9	-	-	1,9
2	10,0	492,7	-	-	492,7	20,6	-	-	20,6
3	8,0	482,8	-	-	482,8	22,6	-	-	22,6
4	6,0	437,7	435,9	355,2	409,6	19,0	18,4	15,8	17,8
5	4,0	350,8	359,7	351,5	351,0	10,6	13,8	11,8	12,1
6	3,0	295,7	294,0	287,1	292,3	8,6	10,0	11,2	9,9
7	2,0	231,4	228,9	230,5	230,3	5,7	6,1	4,2	5,3
8	1,0	210,0	207,9	210,5	209,5	4,6	3,0	5,2	4,3
9	0,8	178,2	176,8	180,1	178,4	5,2	3,3	2,9	3,8
10	0,6	252,4	251,5	248,9	250,9	5,8	4,1	3,9	4,6
11	0,3	312,8	309,2	309,0	310,3	4,1	2,8	2,7	3,2
12	0,1	200,5	201,6	204,4	202,2	3,8	3,9	5,6	4,4

Dai valori mostrati in Tabella 2.7 si nota che la variazione dei valori delle tre letture non ha mai un andamento costante, infatti in alcuni casi le fluorescenze tendono a decrescere, facendo pensare che col passare dei secondi venga persa la capacità di riemissione

delle radiazioni elettromagnetiche ricevute, ma in altri casi tende a scendere nella seconda lettura per poi risalire nell'ultima.

I dati sperimentali ed i valori finali ottenuti dopo la normalizzazione, sono stati rappresentati nelle Tabelle 2.8 e 2.9, nelle quali è possibile analizzare l'esperimento realizzato la mattina (1) e la sera (2), con le cuvette in plastica e con quelle di vetro rispettivamente.

Nelle Tabelle 2.8 e 2.9 sono riportate le fluorescenze di: WMQ della cuvetta (W), del campione (C), del campione normalizzato (CN) e del campione normalizzato rispetto al kit (CF).

Nella Tabella 2.8 è possibile notare una maggiore somiglianza tra le fluorescenze della mattina e della sera nella porzione alta della curva, mentre dal campione n. 8 (1 $\mu\text{g/mL}$) la proporzionalità non viene più rispettata, ottenendo dei valori negativi la mattina (campioni n. 8, 9, 10, 11) e dei punti non più proporzionali la sera (campioni n. 8, 10, 11).

Tabella 2.8. Risultati delle curve di calibrazione di 2 mL di campione

Campione	Albumina $\mu\text{g/mL}$	W		C		CN		CF	
		1	2	1	2	1	2	1	2
1	0,0	147,8	240,0	166,8	246,3	19,0	6,3	0,0	0,0
2	10,0	216,8	211,9	511,0	492,7	294,2	280,8	275,2	274,5
3	8,0	186,1	224,2	490,9	482,8	304,8	258,6	285,8	252,3
4	6,0	226,3	228,4	448,1	409,6	221,8	181,2	202,8	174,9
5	4,0	183,4	200,3	342,0	351,0	158,6	150,7	139,8	144,4
6	3,0	131,2	188,5	251,2	292,3	120,0	103,8	101,0	97,5
7	2,0	239,2	180,0	298,2	230,3	58,9	50,3	39,9	44,0
8	1,0	199,7	191,0	217,2	209,5	17,5	18,5	-1,5	12,2
9	0,8	195,0	161,8	205,7	178,4	10,7	16,6	-8,3	10,3
10	0,6	156,3	237,4	173,0	250,9	16,7	13,5	-2,3	7,2
11	0,3	264,7	260,2	268,5	310,3	3,8	50,1	-15,2	43,8
12	0,1	157,7	195,6	346,9	202,2	189,2	6,6	170,2	0,3

Tabella 2.9. Risultati delle curve di calibrazione di 0,2 mL di campione

Campione	Albumina $\mu\text{g/mL}$	W		C		C-W		(C-W)-WS	
		1	2	1	2	1	2	1	2
1	0,0	2,5	3,7	4,1	1,9	1,6	-1,7	0,0	0,0
2	10,0	2,5	4,0	24,9	20,6	22,5	16,6	20,8	18,3
3	8,0	3,6	0,6	26,2	22,6	22,5	22,1	20,9	23,8
4	6,0	4,8	2,3	20,8	17,8	16,0	15,5	14,4	17,2
5	4,0	1,9	4,8	16,1	12,1	14,2	7,2	12,6	9,0
6	3,0	2,6	1,5	11,6	9,9	9,0	8,4	7,4	10,2
7	2,0	1,9	2,8	10,8	5,3	8,9	2,6	7,3	4,3
8	1,0	1,4	2,9	7,4	4,3	5,9	1,4	4,3	3,1
9	0,8	3,2	1,5	6,1	3,8	2,8	2,3	1,2	4,0
10	0,6	2,3	3,0	2,1	4,6	-0,3	1,6	-1,9	3,4
11	0,3	5,2	0,5	3,6	3,2	-1,6	2,7	-3,2	4,5
12	0,1	0,2	1,8	3,7	4,4	3,5	2,6	1,9	4,3

Una situazione simile è stata ottenuta anche con l'utilizzo delle cuvette in vetro (Tab. 2.9).

I dati relativi alle tabelle sopra descritte, sono stati rappresentati nella Figura 2.3, nella quale è possibile analizzare i campioni letti con le cuvette in plastica nel grafico A, e con le cuvette in vetro nel grafico B.

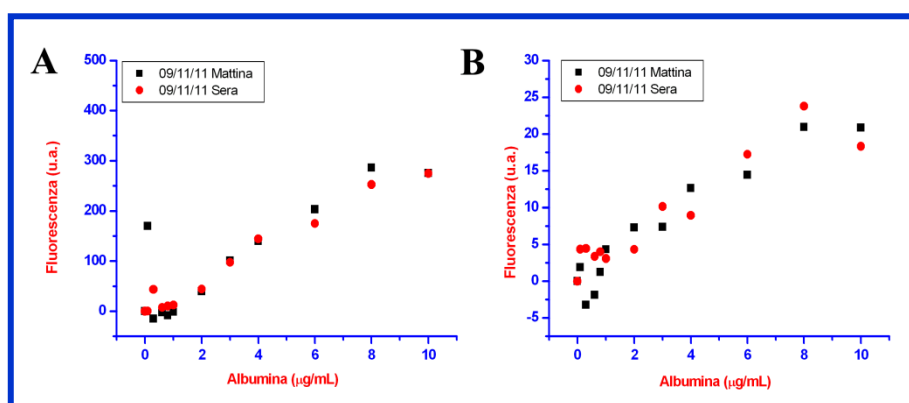


Figura 2.3. Curve di calibrazione "modificate" analizzate con cuvette in plastica (A) e in vetro (B)

Dal grafico rappresentato in Figura 2.3.A si può osservare un andamento delle due curve molto simile, fatta eccezione per il campione n. 12 della mattina e n. 11 della sera che presentano una fluorescenza più alta rispetto alla propria concentrazione.

Una situazione totalmente differente compare nella rappresentazione grafica delle cuvette in vetro (Fig. 2.3.B), nella quale non è presente alcun andamento regolare, costante e ripetibile.

In conseguenza di questo risultato, è stata abbandonata tale tecnica di lettura.

Nel corso delle modifiche al protocollo originario è stato variato anche il volume finale del campione riducendolo a 2,1 mL, con l'intento di risparmiare del materiale in vista di tutti i test che si stavano prospettando necessari.

È stata quindi allestita una curva di calibrazione applicando le modifiche descritte e seguendo il protocollo descritto nel Paragrafo 2.4.3.2. L'esperimento è stato ripetuto in due giorni diversi, variando esclusivamente il kit utilizzato: quello vecchio il primo giorno, e quello seminuovo il giorno successivo.

La Tabella 2.10 mostra i dati ottenuti dal kit vecchio (1) e dal seminuovo (2) che comprendono le fluorescenze: del bianco cuvetta (W), del campione (C), del campione normalizzato (CN) e del campione normalizzato anche rispetto alla WS (CF).

Dai dati mostrati in Tabella 2.10 (CF), è stata notata una fluorescenza più alta per il kit seminuovo e una maggior proporzionalità con le relative concentrazioni, e soprattutto è stata finalmente ottenuta una maggior precisione nella porzione bassa della curva, che tende ad avere un andamento sempre più simile ad una regressione lineare e con nessun punto al di sotto dello zero (Fig. 2.4 A).

In seguito al risultato positivo della curva di calibrazione così ottenuta, gli esperimenti sono proseguiti allestendo un triplicato di una curva di calibrazione utilizzando esclusivamente il kit seminuovo, e tre diverse soluzioni madri, una per ciascuna replica, preparata al momento dell'allestimento, così come anche la WS.

Tabella 2.10. Risultati delle curve di calibrazione di 2 mL di campione

Campione	Albumina µg/mL	W		C		CN		CF	
		1	2	1	2	1	2	1	2
1	0,0	147,4	127,8	126,7	148,3	-20,7	20,4	0	0
2	10,0	182,9	165,8	461,2	663,2	278,3	497,3	299,0	476,9
3	8,0	147,3	175,3	386,7	567,7	239,4	392,5	260,1	372,0
4	6,0	128,5	166,7	330,8	469,4	202,3	302,7	223,0	282,3
5	4,0	134,7	127,9	282,3	339,2	147,6	211,3	168,3	190,8
6	3,0	138,8	174,5	244,9	336,9	106,1	162,5	126,8	142,0
7	2,0	206,7	133,0	243,0	251,5	36,3	118,6	57,0	98,1
8	1,0	125,7	158,2	140,3	220,4	14,6	62,1	35,3	41,7
9	0,8	145,1	201,3	149,0	238,7	3,9	37,4	24,6	17,0
10	0,6	137,2	231,4	140,5	278,1	3,3	46,7	24,0	26,2
11	0,3	155,0	238,3	145,5	272,1	-9,5	33,8	11,2	13,4
12	0,1	121,1	184,0	116,1	222,7	-4,9	38,7	15,8	18,3

La Tabella 2.11 mostra i dati delle tre curve analizzate (1, 2, 3), comprendendo i valori di fluorescenza dei bianchi (W), dei campioni (C), dei campioni normalizzati rispetto alla WMQ (CN) ed infine dei campioni normalizzati rispetto al kit (CF).

L'elaborazione finale dei dati (CF), mette in evidenza una crescente ripetibilità, analizzata nel particolare attraverso la rappresentazione grafica, nella quale è stata effettuata una sovrapposizione per rendere immediate le eventuali differenze.

Tabella 2.11. Risultati delle curve di calibrazione di 2 mL di campione-

Albumina	W			C			CN			CF		
$\mu\text{g/mL}$	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0,0	215,1	237,2	157,3	246,1	215,8	190,5	30,9	-21,4	33,23	0,0	0,0	0,0
10,0	251,5	168,7	136,7	705,6	622,2	559,9	453,8	453,4	423,2	422,9	474,9	390,0
8,0	170,9	229,2	244,4	533,7	556,8	575,7	362,8	327,7	331,4	331,9	349,1	298,1
6,0	185,6	203,9	175,2	429,8	446,4	418,8	244,1	242,6	243,5	213,2	264,0	210,3
4,0	174,9	269,9	184,3	362,2	420,5	366,0	187,3	150,6	181,7	156,4	172,0	148,5
3,0	183,6	169,2	230,1	287,3	313,3	360,6	103,7	144,1	130,6	72,7	165,6	97,3
2,0	164,9	217,4	203,7	250,0	298,9	318,9	85,1	81,6	115,2	54,2	103,0	82,0
1,0	155,6	199,7	116,3	189,0	250,0	201,8	33,4	50,3	85,4	2,4	71,7	52,2
0,8	152,8	160,5	144,1	177,9	234,1	234,5	25,1	73,6	90,4	-5,8	95,0	57,1
0,6	277,9	208,1	244,1	274,5	227,2	247,5	-3,4	19,1	3,4	-34,3	40,5	-29,8
0,3	262,3	106,3	184,1	249,3	178,4	215,9	-13,1	72,1	31,8	-44,0	93,5	-1,5
0,1	173,6	197,7	191,3	162,9	211,8	235,2	-10,7	14,1	43,9	-41,6	35,5	10,6

La Figura 2.4 permette di paragonare l'esperimento precedente nel quale si andavano a ricercare eventuali differenze tra il kit vecchio e quello seminuovo (Fig. 2.4.A), e la curva di calibrazione eseguita in triplicato col kit seminuovo per testare la sua ripetibilità (Fig. 2.4.B), della quale è possibile osservare anche la relativa media correlata di deviazione standard (Fig. 2.4.C).

Nella Figura 2.4.A infatti, dal confronto dei due kit con diverso numero di lotto, è emersa una leggera differenza tra i due, che diventa sempre più marcata dai punti a concentrazione 6-10 $\mu\text{g/mL}$, delineando un andamento decisamente più lineare.

Nella Figura 2.4.B invece, nella quale è rappresentata la ripetizione in triplo della curva effettuata con l'utilizzo del kit seminuovo, è stata ottenuta un'incostante ripetibilità, soprattutto per i punti vicini allo zero che sono risultati un po' meno precisi. Per rendere ancora più evidente la variazione presente è stata calcolata la media delle tre repliche, con la rispettiva deviazione standard, ed è stato mostrato il grafico (Fig. 2.4.C).

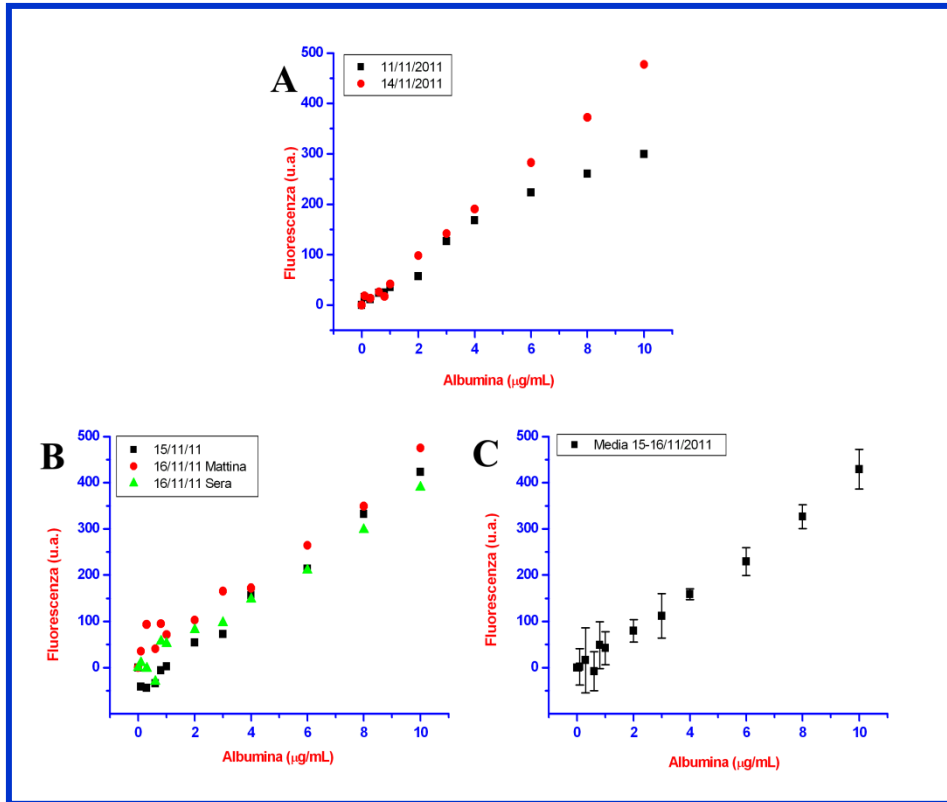


Figura 2.4. Confronto tra 2 lotti, triplicato della curva con kit seminuovo, e relativa media

Dalla curva ottenuta dalla media delle repliche, è stato confermato quanto detto precedentemente sulla instabilità della ripetibilità per le basse concentrazioni comprese nel range 1-0,1 $\mu\text{g/mL}$.

In seguito ai risultati ottenuti, è stata inserita come ulteriore variazione al protocollo, la scelta di dodici cuvette con dei valori di fluorescenza del bianco molto vicini tra loro.

È stata così allestita la curva di calibrazione in triplicato come descritto nel Paragrafo 2.4.3.2, procedendo poi con l'analisi e con la successiva elaborazione dei dati (Par. 2.4.3.1)

L'esperimento è stato eseguito in due giorni successivi, utilizzando il lotto seminuovo. Le soluzioni madri e la WS sono state preparate al momento dell'esecuzione dell'esperimento e il secondo giorno, nel quale è stata allestita la curva anche la sera, il kit è rimasto a temperatura ambiente dalla mattina dello stesso giorno.

In Tabella 2.12 sono mostrati i valori ottenuti dall'analisi delle tre repliche (C1, C2, C3), la loro elaborazione e normalizzazione rispetto ai bianchi della cuvetta (CN1, CN2, CN3) e del kit (CF1, CF2, CF3).

Tabella 2.12. Risultati delle curve di calibrazione di 2 mL di campione-

Albumina	W			C			CN			CF		
$\mu\text{g/mL}$	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0,0	162,6	133,6	153,6	189,7	140,4	158,4	27,1	6,87	4,8	0,0	0,0	0,0
10,0	187,2	153,3	159,9	711,8	643,4	668,1	524,6	490,2	508,2	497,5	483,3	503,4
8,0	187,6	151,2	158,2	607,3	556,6	575,2	419,7	405,4	417,0	392,6	398,6	412,2
6,0	182,0	150,7	158,1	501,6	438,4	469,0	319,5	287,7	310,9	292,4	280,9	306,1
4,0	179,5	150,5	157,7	388,0	334,9	441,3	208,5	184,4	283,6	181,4	177,5	278,8
3,0	175,2	148,8	157,5	328,8	281,6	293,6	153,7	132,9	136,1	126,6	126,0	131,3
2,0	174,1	148,5	156,7	276,5	225,6	253,1	102,4	77,1	96,3	75,3	70,2	91,5
1,0	174,2	146,0	156,7	234,0	183,0	197,0	59,8	37,1	40,3	32,7	30,2	35,5
0,8	174,3	145,7	156,7	238,0	183,0	200,9	63,8	37,3	44,2	36,7	30,4	39,4
0,6	170,5	143,9	156,4	213,0	168,6	177,6	42,5	24,7	21,2	15,4	17,8	16,4
0,3	169,2	143,0	155,0	179,2	151,3	170,1	9,9	8,2	15,1	-17,2	1,4	10,3
0,1	163	141,7	154,1	177,5	150,1	166,2	14,5	8,4	12,1	-12,6	1,5	7,3

Dall'osservazione dei dati finali ottenuti (CF), sembra emergere un miglioramento della ripetibilità ed una conseguente similarità dei valori nelle tre repliche, fatta eccezione per il campione n. 5, nel quale la terza triplicato ha una fluorescenza molto più alta rispetto alle altre due.

I valori ottenuti delle tre curve sono stati rappresentati graficamente sia mettendo assieme il replicato (Fig. 2.5.A) e sia rappresentando la media dei valori con la propria regressione lineare (Fig. 2.5.B) che meglio rappresenta il proprio andamento, nella quale sono stati mascherati i punti relativi ai campioni n. 5 e n. 2.

Il grafico rappresentato in Figura 2.5.A mostra una quasi totale sovrapposizione dei punti, fatta eccezione per il campione n. 5 della sera che mostra una fluorescenza più alta.

La regressione lineare ottenuta dalla media del triplicato (Fig. 2.5.B) mostra un valore di $R=0,999$, da considerarsi quindi ottima in quanto molto vicina a 1.

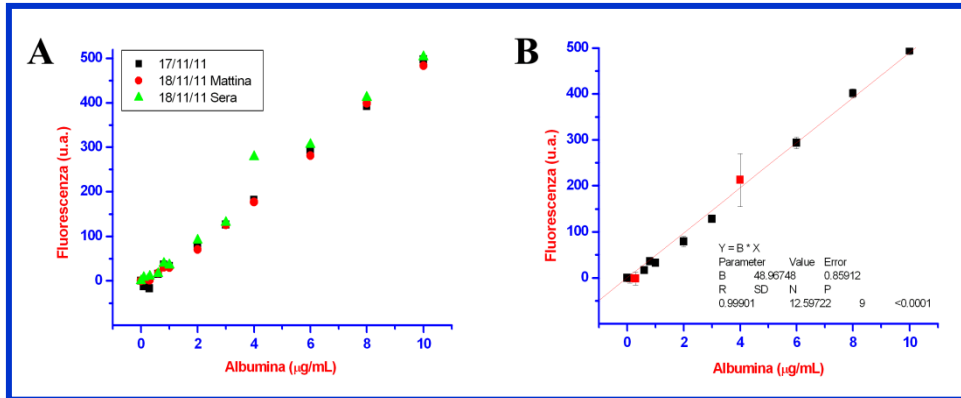


Figura 2.5. Triplicato della curva di calibrazione (A) e regressione lineare della rispettiva media (B)

Gli esperimenti che riguardavano l'utilizzo del kit sono stati interrotti per qualche tempo, per poi riprendere a distanza di sei ed undici mesi. In entrambi i periodi gli esperimenti sono stati preceduti dall'allestimento della curva di calibrazione, in singola copia, per verificare se l'andamento fosse simile a quella messa a punto in passato.

Nella Figura 2.6 è rappresentato il confronto tra le due curve di calibrazione effettuate a distanza di 6 (Fig. 2.6.A) e 11 mesi (Fig.2.6.B) dalla messa a punto della prima curva. Dai grafici si evince che la Figura 2.6.A, rappresenta una regressione lineare, mentre la Figura 2.6.B mostra un andamento diverso, infatti è stata interpolata attraverso un'equazione polinomiale.

Dal risultato di tale confronto è stato deciso di effettuare una curva di calibrazione ogni qualvolta si dovesse realizzare un esperimento in cui fosse previsto l'utilizzo del kit.

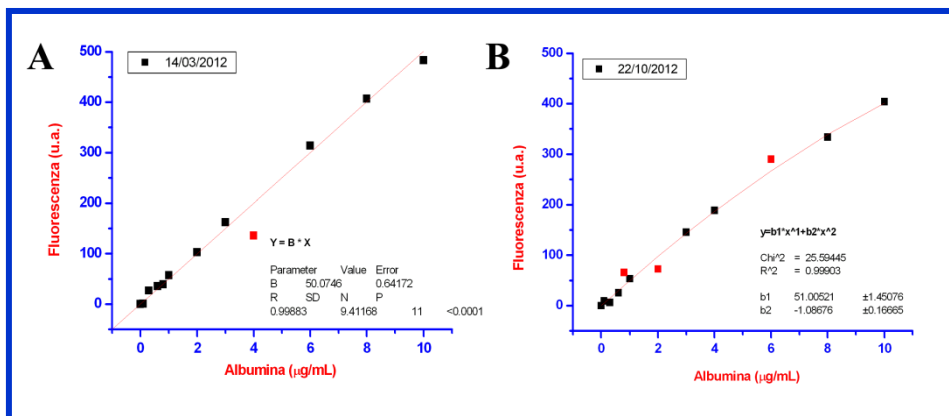


Figura 2.6. Confronto tra le due rette eseguite a distanza di 6 e 11 mesi

2.6 Esperimenti di validazione della retta su campioni a concentrazione nota

Sono state fatte delle prove per testare il corretto funzionamento del kit nella quantificazione proteica su campioni a concentrazione nota di ABSL1.

Si è operato preparando una soluzione madre di Albumina come descritto nel Paragrafo 2.4.4, la quale è stata utilizzata per testare quale fosse il volume di campione più adatto da utilizzare nell'analisi di quantificazione.

Contemporaneamente alla validazione della curva di calibrazione è stato necessario mettere a punto il volume esatto di campione incognito da analizzare con il kit.

Per questo motivo nella prima prova sono stati utilizzati due diversi volumi di campione, selezionati secondo l'indicazione della casa madre sull'utilizzo di un 4% di campione incognito: 84 e 100 μL .

I campioni sono stati successivamente analizzati col kit (Par. 2.4.3), ed i dati ottenuti sono stati elaborati come descritto nel Paragrafo 2.4.3.1.

La Tabella 2.13 mostra la composizione del campione in ABSL2 e WS e la fluorescenza ottenuta dalle prove dei due diversi volumi di campione.

Nella colonna occupata dai valori di fluorescenza sono indicati i dati ottenuti dal fluorimetro di: WMQ delle cuvette (W), campione (C), campione normalizzato rispetto al suo bianco (CN) ed infine il campione normalizzato rispetto al bianco del kit (CF). Invece, nella colonna adibita alle concentrazioni, sono descritte quelle aspettate (Teorica) che tengono conto della diluizione dei microlitri di campione nella WS, e quelle realmente quantificate (Trovata), ottenute elaborando la fluorescenza rilevata con i dati della curva di calibrazione.

Tabella 2.13. Analisi di campioni a concentrazioni note con madre 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Campione	Composizione (μL)		Fluorescenza				Albumina ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	ASBL2	WS	W	C	CN	CF	Trovata	Teorica
bianco	0	2100	193,17	176,60	-16,57	0,00	0,00	0,00
1	84	2016	165,70	183,90	18,20	34,77	0,87	0,40
2	100	2000	165,77	189,30	23,53	40,10	0,97	0,47

I dati ottenuti mostrati nella Tabella 2.13 evidenziano l'ottenimento di concentrazioni che si discostano parecchio da quelle attese, mostrando addirittura delle fluorescenze vicine al doppio del valore.

Il giorno seguente è stato ripetuto l'esperimento, lasciando l'ABSL1 preparata a temperatura ambiente per tutta la notte, per verificare se i risultati ottenuti il giorno precedente, potessero essere stati influenzati dalla temperatura della soluzione.

Inizialmente, è stata ripetuta l'analisi in singola copia, dei volumi 84 e 100 μL corredati del loro bianco, e nel corso della giornata sono stati ripetuti i medesimi campioni in

duplice copia, compreso il bianco, per far in modo di poter verificare la ripetibilità confrontando un triplo.

I campioni sono stati preparati come descritto nel Tabella 2.14 ed analizzati come illustrato nel Paragrafo 2.4.3. In seguito sono stati elaborati i dati ottenuti sperimentalmente (Tab. 2.14).

La Tabella 2.14 mostra, infatti, il volume del campione utilizzato per l'analisi e la rispettiva quantità di WS necessaria, le fluorescenze del bianco della cuvetta (W), del campione (C), del campione normalizzato (CN) ed infine del campione privato del bianco del kit (CF). Inoltre, nell'ultima colonna di destra vengono mostrate le concentrazioni attese (Teorica) e quelle che sono state quantificate attraverso la curva di calibrazione (Trovata).

Tabella 2.14. Analisi di 84 e 100 μL di campione a concentrazione nota

Campione	Composizione(μL)		Fluorescenza				Albumina ($\mu\text{g/mL}$)	
	ASB1	WS	W	C	CN	CF	Trovata	Teorica
bianco	0	2100	193,17	176,60	-16,57	0,00		
1	84	2016	165,70	183,90	18,20	34,77	0,87	0,40
2	100	2000	165,77	189,30	23,53	40,10	0,97	0,47
Giorno Successivo								
bianco	0	2100	157,57	156,80	-0,77	0,00	-	
1	84	2016	168,70	186,77	15,07	15,83	0,49	0,40
2	100	2000	169,13	187,23	18,10	18,87	0,55	0,47
bianco	0	2100	163,10	180,20	17,10	0,00		
3	84	2016	165,50	192,97	27,47	10,37	0,39	0,40
4	84	2016	165,50	190,30	24,80	7,70	0,33	0,40
5	100	2000	165,50	195,53	30,03	12,93	0,44	0,47
6	100	2000	167,10	206,97	39,87	22,77	0,63	0,47

Dalla Tabella 2.14, è stato notato che il primo giorno sono state ottenute delle concentrazioni più alte, addirittura vicine al doppio del valore di riferimento.

Il giorno seguente, invece, le concentrazioni quantificate sono state più simili tra loro e vicine al valore atteso.

Gli esperimenti sono proseguiti testando anche altri volumi di campione: 70 e 80 μL , i quali sono stati testati in due serie, ciascuna delle quali costituita da una 3 campioni dello stesso volume, per verificare anche la ripetibilità delle analisi. Nella prima serie è stata utilizzata la ABSL2, mentre nella seconda la ABS1.

I campioni sono stati sempre preparati nello stesso identico modo dell'esperimento precedente, anche per quanto riguarda l'analisi e l'elaborazione dei dati, è stato variato semplicemente il volume del campione incognito.

Nella Tabella 2.16 sono presenti i dati relativi alla composizione del campione in volume di ABS2 e WS ed inoltre vengono elencati anche i dati sperimentali ottenuti

dall'analisi fluorimetrica della WMQ (W), del campione (C), del campione privato del suo bianco (CN) ed infine del campione normalizzato rispetto alla WS del kit (CF). É anche possibile vedere le concentrazioni di ABS2 teoriche e quelle quantificate col kit.

Le concentrazioni quantificate sono risultate molto diverse tra loro. La perplessità nasce dal fatto che i campioni sono apparsi differenti sia all'interno del triplicato, per entrambi i volumi, e sia nelle due serie messe a confronto.

Tabella 2.16. Quantificazione proteica di 70 e 80 μL 10 $\mu\text{g/mL}$

Campione	Composizione (μL)		Fluorescenza				Albumina ($\mu\text{g/mL}$)	
	ABSL2/ABS1	WS	W	C	CN	CF	Trovata	Teorica
bianco	0	2100	168,37	196,57	28,20	0,00	0,00	0,00
1	70	2030	171,27	209,53	38,27	10,07	0,38	0,33
2	70	2030	171,17	203,63	32,47	4,27	0,27	0,33
3	70	2030	171,57	196,87	25,30	-2,90	0,12	0,33
4	80	2020	172,20	190,00	17,80	-10,40	-0,02	0,38
5	80	2020	172,20	199,23	27,03	-1,17	0,16	0,38
6	80	2020	173,30	188,73	15,43	-12,77	-0,07	0,38
7	70	2030	173,97	181,77	7,80	-20,40	-0,22	0,33
8	70	2030	174,60	187,23	12,63	-15,57	-0,13	0,33
9	70	2030	174,20	197,97	23,77	-4,43	0,09	0,33
10	80	2020	175,33	201,20	25,87	-2,33	0,14	0,38
11	80	2020	175,87	215,07	39,20	11,00	0,40	0,38
12	80	2002	176,20	210,63	34,43	6,23	0,30	0,38

Per i 70 μL della prima serie sono state ottenute delle concentrazioni che tendono a diminuire, infatti da 0,38 si passa a 0,27 e infine a 0,12 $\mu\text{g/mL}$. Nella serie ripetuta con l'utilizzo di ABS1 la quantificazione proteica ottenuta è stata addirittura negativa per due dei tre campioni. Per gli 80 μL invece, sono state quantificate concentrazioni negative per la ABSL2, mentre sono state ottenute concentrazioni positive per lo standard del kit: i valori ottenuti hanno avuto un'oscillazione tra i 0,14 e 0,40 $\mu\text{g/mL}$.

A questo punto delle prove volumetriche è stato deciso di concentrare gli esperimenti successivi su un volume di campione pari a 80 μL .

Sono stati così analizzati col kit NanoOrange 80 μL di ABSL2 in tre repliche, seguendo la medesima modalità di preparazione, analisi ed elaborazione dati, utilizzate negli esperimenti precedenti.

Nella Tabella 2.17 vengono mostrati i dati relativi all'esperimento eseguito, elencando quanto volume è stato utilizzato di ABSL2 e quanto di WS, e le fluorescenze relative al: bianco della cuvetta (W), campione (C), al campione normalizzato rispetto al suo bianco (CN) e rispetto al kit (CF). Infine nella prima e nella seconda colonna da destra è possibile

fare un confronto tra la concentrazione di ABSL2 attesa (Teorica) e quella realmente quantificata col kit (Trovata).

Tabella 2.17. Quantificazione proteica di 80 μL 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Campione	Composizione (μL)		Fluorescenza				Albumina ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	ABSL	WS	W	C	CN	CF	Trovata	Teorica
bianco	0	2100	136,97	151,50	7,13	0,00		
1	80	2020	140,13	159,93	11,37	4,23	0,26	0,38
2	80	2020	140,90	155,20	19,03	11,90	0,42	0,38
3	80	2020	141,03	144,10	14,17	7,03	0,32	0,38

Le concentrazioni trovate mostrano un'oscillazione che va dai 0,26 ai 0,42 ed infine ai 0,32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e se si calcola la media dei tre campioni si ottiene una concentrazione pari a 0,33 $\mu\text{g}/\text{mL}$, che risulta essere una quantificazione inferiore a quella attesa, ma che nonostante questo è da considerarsi un risultato positivo rispetto agli esperimenti eseguiti precedentemente.

Le prove fatte, non hanno preso in considerazione solamente i diversi volumi possibili di campione, ma hanno spaziato anche sulla concentrazione dello standard, infatti oltre a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, è stata usata anche la soluzione madre di ABSL.

Pertanto è stata effettuata un'analisi in triplo di 80 μL di campione di ABSL1 e ABSL2, per vedere la differenza tra le due concentrazioni.

Nelle Tabelle 2.18 e 2.19 vengono riportati sia i dati relativi alla composizione del campione in termini di utilizzo di ABSL1-2 e di WS, e sia i valori ottenuti dall'analisi effettuata col fluorimetro di: bianco della cuvetta (W), campione (C), campione normalizzato rispetto alla cuvetta (CN) e campione normalizzato rispetto alla WS (CF).

Tabella 2.18. Quantificazione proteica di 80 μL 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ripetuti

Campione	Composizione (μL)		Fluorescenza				Albumina ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	ABSL	WS	W	C	CN	CF	Trovata	Teorica
bianco	0	2100	146,23	148,17	1,93	0,00		
1	80	2020	149,00	164,23	15,23	13,30	0,44	0,38
2	80	2020	149,03	158,83	9,80	7,87	0,34	0,38
3	80	2020	149,17	185,07	35,90	33,97	0,85	0,38

I dati ottenuti non sono risultati totalmente identici alla concentrazione attesa, infatti per quanto riguarda la concentrazione più bassa (Tab. 2.18), è stata ottenuta una media di 0,54 $\mu\text{g}/\text{mL}$, questo significa che è stata quantificata una concentrazione superiore a quella nota di 0,38 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Tabella 2.19. Quantificazione proteica di 80 μL 100 $\mu\text{g/mL}$ ripetuti_

Campione	Composizione (μL)		Fluorescenza				Albumina ($\mu\text{g/mL}$)	
	ABS	WS	W	C	CN	CF	Trovata	Teorica
bianco	0	2100	146,23	148,17	1,93	0,00		
1	80	2020	151,00	304,63	153,63	151,70	3,18	3,81
2	80	2020	151,13	312,63	161,50	159,57	3,33	3,81
3	80	2020	151,03	310,87	159,83	157,90	3,30	3,81

Mentre per la concentrazione di 100 $\mu\text{g/mL}$ (Tab. 2.19) è stata rilevata una maggior precisione, ottenendo una media di 3,27 $\mu\text{g/mL}$, ed inoltre i tre valori risultano essere molto vicini tra loro.

Gli esperimenti sono proseguiti verificando l'attendibilità del kit alle diverse concentrazioni, per vedere se ci fossero delle differenze notevoli, o delle concentrazioni oltre, o al di sotto delle quali, non fosse possibile il suo utilizzo.

Quindi, sono state preparate delle soluzioni diluite di ABSL3 (1,5 mL) ad una concentrazione tale che, gli 80 μL di campione diluiti in WS (2,1 mL) avessero le concentrazioni da noi prescelte (10, 8, 6, 4, 2, 1 $\mu\text{g/mL}$).

Nella colonna adibita alla composizione viene descritto quanto volume di ABSL3 è stato usato e quanto volume di WMQ è stato aggiunto per poter ottenere i campioni n. 2-6 alla concentrazione indicata nella seconda colonna da destra.

Tabella 2.20. Preparazione delle soluzioni a partire da ABSL3

Campione	Composizione (μL)		Albumina ($\mu\text{g/mL}$)
	ABSL3	WMQ	
1	0	0	263,2
2	1197	303	210,0
3	898	602	157,5
4	560	940	105,0
5	300	1200	52,5
6	150	1350	26,25

Le soluzioni preparate a partire da ABSL3 come descritto nella Tabella 2.20, sono state utilizzate per la quantificazione proteica.

In Tabella 2.21 viene indicata la composizione del campione analizzato per quanto riguarda i microlitri utilizzati di soluzione ottenuta da ABSL3 e la necessaria WS; la fluorescenza relativa alla WMQ della cuvetta (W), al campione (C), alla normalizzazione rispetto al bianco (CN), e al campione normalizzato rispetto al kit (CF).

Tabella 2.21. Quantificazione proteica di 80 μL a diverse concentrazioni di ABSL3

Campione	Composizione (μL)		Fluorescenza				Albumina ($\mu\text{g/mL}$)	
	ABSL	WS	W	C	CN	CF	Trovata	Teorica
bianco	0	2100	150,50	212,73	62,23	0,00		
1	80	2020	152,37	748,33	595,97	533,73	10,71	10,00
2	80	2020	152,20	641,73	489,53	427,30	8,61	8,00
3	80	2020	151,83	556,77	404,93	342,70	6,94	6,00
4	80	2020	151,47	416,23	264,77	202,53	4,18	4,00
5	80	2020	151,47	309,73	158,27	96,03	2,08	2,00
6	80	2020	152,17	260,33	108,17	45,93	1,09	1,00

I risultati ottenuti in questo esperimento sono abbastanza vicini ai valori attesi, infatti si discostano di poco dalla perfezione, mostrando in media una concentrazione superiore di 0,7 $\mu\text{g/mL}$.

Questo risultato fa ipotizzare che la funzionalità del kit sia maggiormente marcata per concentrazioni comprese nell'intervallo 1-10 $\mu\text{g/mL}$ e meno stabile per quelle al di sotto. Il range da noi messo a punto non concorda con quello trovato anche in letteratura compreso tra 10 ng/mL- 10 $\mu\text{g/mL}$ [18], in quanto significherebbe avere un limite minimo di 0,01 $\mu\text{g/mL}$ per il quale nei nostri esperimenti non è stata ottenuta ripetibilità e precisione.

2.7 Utilizzo del Kit NanoOrange nella quantificazione proteica della cute

Nel corso degli esperimenti che sono stati effettuati in laboratorio, il kit è stato utilizzato come metodo di verifica, per quantificare la concentrazione di proteine restante in campioni di cute, trattati con diverse metodiche per la loro eliminazione.

Essendo trascorso parecchio tempo dall'ultimo utilizzo del kit, all'inizio degli esperimenti che interessavano la cute, è stato deciso di allestire una nuova curva di calibrazione, sia per vedere se questa fosse identica all'ultima eseguita, e sia per essere sicuri della quantificazione che si andava a misurare.

2.8 Conclusioni

In letteratura sono stati trovati dei lavori che hanno approfondito lo studio sull'utilizzo del kit NanoOrange per rafforzare le potenzialità mostrate sin dall'inizio. È stato infatti, approfondito l'aspetto della presenza della fase di riscaldamento che risultava difficile inserire in una stazione robotizzata. Pertanto, i ricercatori si sono mossi verso una

caratterizzazione ulteriore della reazione specifica del kit per studiarne la sua dipendenza dalla temperatura ed i tempi necessari, nonché esaminare l'uso di mezzi alternativi di riscaldamento (ad esempio un forno a microonde) per accelerare il completamento della reazione [17].

Inoltre, recenti pubblicazioni dimostrano che anche l'incubazione del reagente NanoOrange con campione proteico a temperatura ambiente genera un segnale fluorescente efficace. In aggiunta, Liu et al., hanno dimostrato che la reazione a temperatura ambiente tra NanoOrange e BSA aveva un tempo di ~ 110 msec, in questo modo la reazione si completa per $> 99,5$ % un secondo dopo la miscelazione .

Quindi, tempi di incubazione così prorogati a temperature elevate potrebbero non essere necessari, anche se ulteriori studi sarebbero utili per determinare il tempo ottimale necessario. Chiaramente, tempi più brevi di incubazione sarebbero vantaggiosi per l'automazione del NanoOrange [17].

Concludendo, anche Jones *et al.* apprezzano l'utilizzo del kit in questione, paragonando la sua efficacia ai saggi standard come quello di Lowry e Bradford ma soprattutto considerandolo molto utile per rilevare proteine relativamente piccole o grandi peptidi , come aprotinina e insulina. Infine offre come vantaggio il possibile utilizzo di lettori di micropiastre a fluorescenza, fluorimetri, ed alcuni scanner laser [18].

Pertanto, in futuro potrebbe essere interessante approfondire il funzionamento del kit NanoOrange da noi testato, apportando un'ulteriore modifica riguardo al non riscaldamento del campione suggerita in letteratura

3

Degradazione e Deproteinizzazione della cute

3.1 Introduzione

Nella messa a punto dell'esperimento di veicolazione transdermica ci è sembrato opportuno andare a quantificare anche l'eventuale quantità di farmaco rimasto intrappolato nella cute, anche per verificare la reale distribuzione della sostanza in esame avvenuta durante il trattamento nei diversi compartimenti delle celle di diffusione verticale.

Pertanto è risultato necessario trattare la cute per favorirne la sua degradazione. Successivamente si è indagato sul quale potesse essere in metodo più consono all'eliminazione delle proteine presenti nel campione, in modo tale da renderlo immediatamente disponibile per un'analisi cromatografica.

Infatti, in questo capitolo vengono elencati i materiali e gli strumenti utilizzati in questo lavoro per il trattamento della cute, derivante dall'esperimento di veicolazione transdermica, dalla sua dissoluzione all'eliminazione della maggior quantità possibile di proteine e lipidi. Vengono anche descritte le metodiche e le modalità di allestimento degli esperimenti condotti.

3.2 Materiali

Prodotti chimici. Tutti i prodotti chimici utilizzati sono stati conservati come prescritto dal produttore, ed utilizzati senza nessuna ulteriore purificazione o reazione chimica. Laddove questa frase non fosse soddisfatta, sarà indicato nel testo la motivazione e l'accorgimento attuato. I prodotti chimici usati sono: ibuprofene sale sodico (IbuNa), che è stato aperto il 31/05/2012 (100%, Sigma-Aldrich), il fosfato di potassio monobasico (KH_2PO_4 , 99,9%, Fluka),

il fosfato di potassio dibasico (K_2HPO_4 , 99%, Riedel-de Haën), l'acido cloridrico (HCl, 37,9% w/w, Sigma-Aldrich), l'idrossido di sodio (NaOH, 98% w/w, Sigma-Aldrich), l'acido formico (AcFor, 98-100%, Sigma-Aldrich), il pentaossido di fosforo (min 98,5%, Sigma-Aldrich), il gel di silice (perle arancioni, Kraemer & Martin GmbH), la soluzione tampone a pH 4 (J.T. Baker), e la soluzione tampone a pH 7 (Radiometer Copenhagen).

Inoltre, sono stati utilizzati la soluzione salina Dulbecco tamponata col fosfato senza calcio e magnesio (D-PBS; 500 mL; Euroclone), il Kit NanoOrange® per la quantificazione delle proteine (Kit, lotto 1, n. 50468A; lotto 2, n. 50985A; lotto 3, n. 871269, in ordine di arrivo, Invitrogen) e la collagenase da *Clostridium histolyticum* di tipo II (collagenase; 100 mg, 634 unità/mg di Collagene, Sigma-Aldrich). Tale sostanza è stata mantenuta alla temperatura di -30°C all'interno di un barattolo in vetro contenente del gel di silice per assorbire l'eventuale umidità. Inoltre la confezione della collagenase ed il barattolo sono sempre stati sigillati con del parafilm.

In aggiunta, sono stati utilizzati anche l'acqua Milli-Q prodotta nel nostro laboratorio (WMQ), il metanolo (MeOH, grado gradiente, J.T. Baker), l'acetonitrile (ACN, grado gradiente, J.T. Baker), ed il cloroformio ($CHCl_3$, grado gradiente, J.T. Baker).

Per gli esperimenti di veicolazione transdermica è stata utilizzata cute umana proveniente da interventi di addominoplastica e mastoplastica riduttiva.

Come verrà indicato più avanti, in alcuni casi è stato necessario conservare le soluzioni e/o le sostanze a $4-6^\circ\text{C}$ (Kit, soluzione tampone a pH 4 e pH 7) o a -30°C (Cute umana, collagenase). Laddove venga indicato "a temperatura ambiente", se non altrimenti specificato, deve intendersi "ad una temperatura compresa tra i 22° e i 25°C ".

Altro. Inoltre, sono stati utilizzati: matracci di varie misure, beaker, spatole, microtubi da centrifuga in plastica (microprovette), tubi da centrifuga in polipropilene da 50 mL non sterile (provette da 50, Euroclone), bottiglie in plastica di volumi variabili sino a 500 mL, tubi da centrifuga in polipropilene da 15 mL non sterile (tubi da 15, Corning), provette coniche in vetro graduate con tappo a vite (tubi in vetro), tubi in plastica con tappo a pressione (tubi in plastica), bottigliette in vetro da 12 mL con tappo nero a vite (bottigliette da 12), bottigliette in vetro da 20 mL con tappo bianco a vite (bottigliette da 20), provette filtranti (Amicon, cut-off: 3000 Da, Amicon Ultra-0,5, Millipore), puntali per micropipette da 20, 200 e 1000 μL (Eppendorf o Gilson), pipette graduate in vetro da 10 mL, pipette Pasteur, vials per HPLC, bottiglie di vetro da 1 L (Duran), carta da pesata (Wägebapier MN 226, Macherey-Nagel), bisturi, pinzette, parafilm, e carta stagnola.

Tutta la vetreria e gli oggetti in plastica riutilizzabili sono stati accuratamente lavati con acqua saponata, risciacquata con acqua di fonte, e successivamente con acqua distillata o con WMQ.

Protezione. Le soluzioni contenenti HCl e NaOH, usate per aggiustare il pH dei tamponi ed in generale tutti i solventi organici, sono stati maneggiati sotto cappa chimica. L'operatore ha sempre utilizzato i dispositivi di protezione personale quali: camice, guanti in nitrile o lattice.

3.3 Strumenti

Gli strumenti utilizzati per la realizzazione di questa tesi sono i seguenti: un sistema per la produzione di WMQ (Labo Star 7TWF-DI/UV, Siemens); una bilancia analitica sensibile alla quarta cifra decimale (ABS 120-4, Kern); un pH-metro con sonda termometrica incorporata (pH 5/6, Eutech Instruments Pte Ltd.) ed equipaggiata con due elettrodi combinati (InLab[®] 423 o InLab[®] 412, Mettler Toledo); un agitatore magnetico (F60, Falc); una stufa termoventilata (FD53, Binder GmbH); una stufa non ventilata (E28, Binder GmbH); una centrifuga (C1, Heraeus Megafuge 11 R, Thermo Scientific, Waltham); una centrifuga (C2, Minispin Plus 5453, Eppendorf). alcune micropipette a volume variabile da 20, 200, e 1000 μ L (Eppendorf e Gilson); un pipettatore (Accu-Jet, Brand); un vortex (GVIab, Gilson); uno spettrofotometro UV-Vis a singolo raggio (Cary UV-Vis, Varian); una cuvetta in quarzo con due pareti ottiche, il cui cammino ottico è pari a 1 cm (QS 1000 μ L, Hellma); cartucce HybridSpe in polypropylene (Spe, 30 mg, 1 mL, Supelco); sistema da vuoto con regolatore di pressione da 12 campioni (Supelco); un fluorimetro portatile (Picofluor[™] 8000-004, Turner Designs; canale blu: exc. 475 ± 15 nm, em. 515 ± 20 nm), un frigorifero (4°C, Indesit), un frigorifero-freezer combinato (4°C/-21°C, Indesit) ed un freezer a pozzetto (-30°C, Ignis).

3.4 Metodi

3.4.1 Lavaggio delle provette filtranti Amicon

Le provette Amicon constano di due parti: un filtro della capacità massima di 0,5 mL ed una provetta in plastica che lo accoglie al suo interno, facendo in modo che esso rimanga sospeso e che il filtrato non resti a contatto col filtro.

Prima del loro utilizzo è stato necessario effettuare il lavaggio del filtro secondo le modalità indicate dalla casa madre per eliminare la possibile interferenza del glicerolo col campione e per effettuare una saturazione del filtro.

Infatti, qualche istante prima della separazione del campione è stato eseguito un primo ciclo di centrifuga (0,5 mL di WMQ, 13 minuti, 14100 g, in minispin), seguito da un secondo (2 minuti, 1000 g, con filtro capovolto, minispin) atto all'eliminazione dell'eventuale WMQ rimasta nel supporto filtrante.

3.4.2 Dissoluzione della cute

La cute utilizzata durante l'esperimento di veicolazione transdermica è stata recuperata ed è stata disciolta mediante una soluzione di Collagenase.

Soluzione di Collagenase: la Collagenase, conservata in freezer a -20 °C, è stata fatta equilibrare per 30 minuti a temperatura ambiente sopra il bancone del laboratorio.

Successivamente, utilizzando della carta da pesata e una spatola in acciaio, sono stati pesati nella bilancia analitica, precedentemente calibrata, 10 mg di Collagenase. La sostanza è stata poi trasferita in una bottiglietta da 20, nella quale sono stati aggiunti 3,17 mL di WMQ. Per favorire la totale dissoluzione è stata effettuata un'agitazione manuale di qualche minuto senza capovolgere la bottiglietta.

La soluzione così ottenuta sarà caratterizzata da 2000 unità/mL [14].

Preparazione della cute: la cute utilizzata nell'esperimento di veicolazione transdermica, è stata ritagliata per poter procedere con la dissoluzione esclusivamente della parte centrale rimasta a contatto con la formulazione.

La porzione centrale così ottenuta, è stata sminuzzata in piccoli pezzi (6 mm²) aiutandosi con dei bisturi e delle pinzette. I tagli sono stati eseguiti nel modo più regolare e simmetrico possibile, nel tentativo di ottenere dei pezzi di identica dimensione.

Soluzione di cute in Collagenase: la cute sminuzzata è stata adagiata sul fondo di una bottiglietta da 10 utilizzando delle pinzette.

Sono stati poi aggiunti 0,5 mL di soluzione di Collagenase (2000 unità/mL) e 4,5 mL di D-PBS utilizzando una pipetta in plastica.

È stata favorita la completa miscelazione della soluzione attraverso un'agitazione manuale, facendo attenzione a non capovolgere mai la bottiglietta.

La cute a contatto con la Collagenase è stata così incubata a 37 °C per circa 48 ore.

Successivamente la cute disciolta è stata mantenuta in un bancone del laboratorio col tappo perfettamente chiuso e senza parafilm.

3.4.3 Deproteinizzazione della cute

Una volta ottenuta la cute disciolta, è stato necessario procedere con la sua deproteinizzazione per poterla così analizzare anche attraverso l'utilizzo della cromatografia

liquida ad alta pressione. Sono stati testati diversi metodi per eliminare le proteine dal campione di cute in Collagenase e per verificare quale fosse quello più efficace.

3.4.3.1 Deproteinizzazione per precipitazione in solvente organico

In una microprovetta sono stati pipettati 0,7 mL di cute disciolta (Par. 3.4.2) e 0,3 mL di MeOH. Successivamente, è stata favorita la miscelazione della soluzione col solvente attraverso qualche minuto di spipettamento (2-3 min).

In seguito, il campione è stato centrifugato (C2, 10 minuti, 13500 g) ottenendo un pellet molto evidente.

Il surnatante è stato poi trasferito in una nuova microprovetta ed è stato fatto essiccare a 37 °C. Il residuo secco è stato poi ripreso con 0,5 mL di WMQ, e la sua dissoluzione è stata favorita mediante qualche minuto di vortexamento. La soluzione così ottenuta è stata utilizzata per la quantificazione proteica attraverso il Kit.

3.4.3.2 Deproteinizzazione della cute per filtrazione con Amicon

Tutto il campione di cute sciolta, è stato trasferito in un tubo da 15 ed è stato centrifugato (C1, 13 minuti, 14000 g).

Nelle Amicon, precedentemente lavate (Par. 3.4.1), sono stati pipettati 0,5 mL di campione, il quale è stato immediatamente sottoposto ad una centrifuga (C2, 13 minuti, 14100 g). Il filtrato è stato poi analizzato attraverso il Kit per la quantificazione proteica.

3.4.3.3 Criodeproteinizzazione della cute

La cute degradata (0,5 mL) è stata dispensata in una microprovetta assieme a 0,21 mL di MeOH. Dopo qualche minuto di spipettamento il campione così costituito è stato messo in freezer a -80°C per 60 minuti.

In seguito alla permanenza in freezer, il campione è stato fatto scongelare ed è stato centrifugato (C2, 10 minuti, 13500 g).

Il surnatante è stato trasferito in una nuova microprovetta ed è stato essiccato a 37°C.

Il campione seccato è stato ripreso con 0,5 mL di WMQ, vortexato per qualche minuto ed analizzato per testare la quantificazione proteica.

3.4.3.4 Deproteinizzazione della cute per filtrazione in cartucce HybridSpe

La deproteinizzazione per filtrazione in Spe, è composta da due fasi: una precipitazione off-line e una precipitazione all'interno della cartuccia Spe (precipitazione on-line).

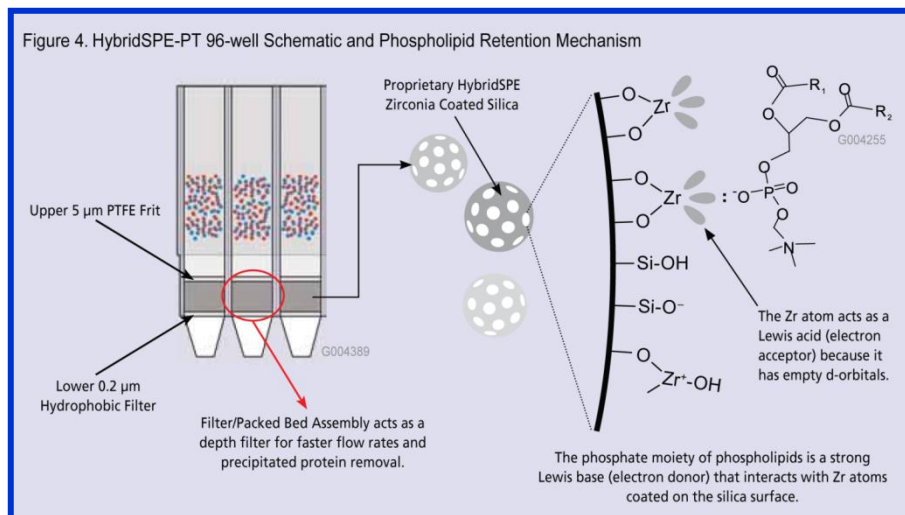


Figura 3.1. Schema del meccanismo di ritenzione dei fosfolipidi da parte degli ioni Zirconia

La peculiarità di tali cartucce risiede nella particolare composizione del filtro, costituito da ioni Zirconia, che interagendo con i fosfolipidi e le proteine, li trattengono al loro interno grazie ad una reazione acido-base di Lewis.

La filtrazione è stata eseguita attraverso due metodiche, che sono state consigliate dalla ditta produttrice Supelco, caratterizzate dall'utilizzo di due differenti agenti precipitanti: AcForm all'1% in ACN e AcForm all'1% in MeOH.

Si procederà con la descrizione dettagliata delle due filtrazioni in base all'agente precipitante utilizzato.

Metodo I: Filtrazione attraverso le HybridSpe con ACN

Preparazione del solvente condizionante: in una bottiglietta da 20 sono stati pipettati 0,3 mL di AcForm e 9,7 mL di ACN utilizzando esclusivamente pipette in vetro. È stata così ottenuta una soluzione di AcForm al 3% in ACN (AcForm ACN 3%).

Preparazione dell'agente precipitante: in una bottiglietta da 20 sono stati pipettati 0,1 mL di AcForm e 9,9 mL di ACN utilizzando esclusivamente pipette in vetro. È stata così ottenuta una soluzione di AcForm al 1% in ACN (AcForm ACN 1%).

Entrambe le soluzioni di AcForm sono state preparate sotto cappa chimica, mantenendo il vetro protettivo il più abbassato possibile e conservate a temperatura ambiente col tappo ben chiuso e parafilmate.

Precipitazione off-line: in una microprovetta è stata pipettata la cute disciolta (0,3 mL) ed AcForm ACN 1% (0,9 mL) in rapporto 1:3 v/v. Il campione così costituito, è stato spipettato per 2-3 minuti e successivamente è stato centrifugato (C1, 5 minuti, 988 g, rotore ad angolo fisso con raggio di 84 cm).

Il surnatante ottenuto è stato successivamente filtrato attraverso le Spe.

Condizionamento della cartuccia: al suo interno sono stati pipettati 0,6 mL di AcForm ACN 3%, i quali, spinti dalla forza della pompa da vuoto, hanno attraversato l'intera cartuccia. L'azione del sottovuoto è stata interrotta qualche istante prima che il solvente fosse completamente fuoriuscito. Tale accorgimento ha evitato l'essiccamento del filtro. In seguito al recupero del solvente in un beaker, è stato possibile procedere con l'inserimento dei tubi di raccolta dello strumento.

Filtrazione in Spe: nella cartuccia condizionata, sono stati pipettati 0,5 mL di campione di cute disciolta precipitata in modalità off-line. È stato favorito il passaggio in cartuccia attraverso la regolazione delle valvole, attraverso le quali è possibile decidere il flusso di filtrazione. Successivamente al campione, sono stati filtrati 2 mL di ACN puro, in modo da rimuovere l'eventuale campione rimasto intrappolato nel filtro.

Il filtrato (ca. 2,5 mL) è stato essiccato a 100 °C, ed è stato poi ripreso con 0,5 mL di WMQ. In seguito alla completa risospensione, favorita dal vortexamento, si è proceduto con la quantificazione proteica attraverso il Kit.

Metodo II: Filtrazione attraverso le HybridSpe con MeOH

Preparazione dell'agente precipitante: in una bottiglietta da 20 sono stati pipettati 0,1 mL di AcForm e 9,9 mL di MeOH utilizzando esclusivamente pipette in vetro. È stata così ottenuta una soluzione di AcForm al 1% in MeOH (AcForm MeOH 1%). La soluzione di AcForm è stata preparata sotto cappa chimica, mantenendo il vetro protettivo il più abbassato possibile e conservata a temperatura ambiente col tappo ben chiuso e parafilmata.

Precipitazione off-line: in una microprovetta è stata pipettata la cute disciolta (0,2 mL) ed AcForm MeOH 1% (1 mL) in rapporto 1:5 v/v. Il campione così costituito, è stato spipettato

per 2-3 minuti e successivamente è stato centrifugato (C1, 5 minuti, 988 g, rotore ad angolo fisso con raggio di 84 cm).

Il surnatante ottenuto è stato successivamente filtrato attraverso le Spe.

Filtrazione in Spe: nella cartuccia condizionata, sono stati pipettati 0,5 mL di campione di cute precipitata in modalità off-line. È stato favorito il passaggio in cartuccia attraverso la regolazione delle valvole, attraverso le quali è possibile decidere il flusso di filtrazione. Successivamente al campione, sono stati filtrati 2 mL di MeOH puro, in modo da rimuovere l'eventuale campione rimasto intrappolato nel filtro.

Il filtrato (ca. 2,5 mL) è stato essiccato a 100 °C, ed è stato poi ripreso con 0,5 mL di WMQ. In seguito alla completa risospensione, favorita dal vortexamento, si è proceduto con la quantificazione proteica attraverso il Kit.

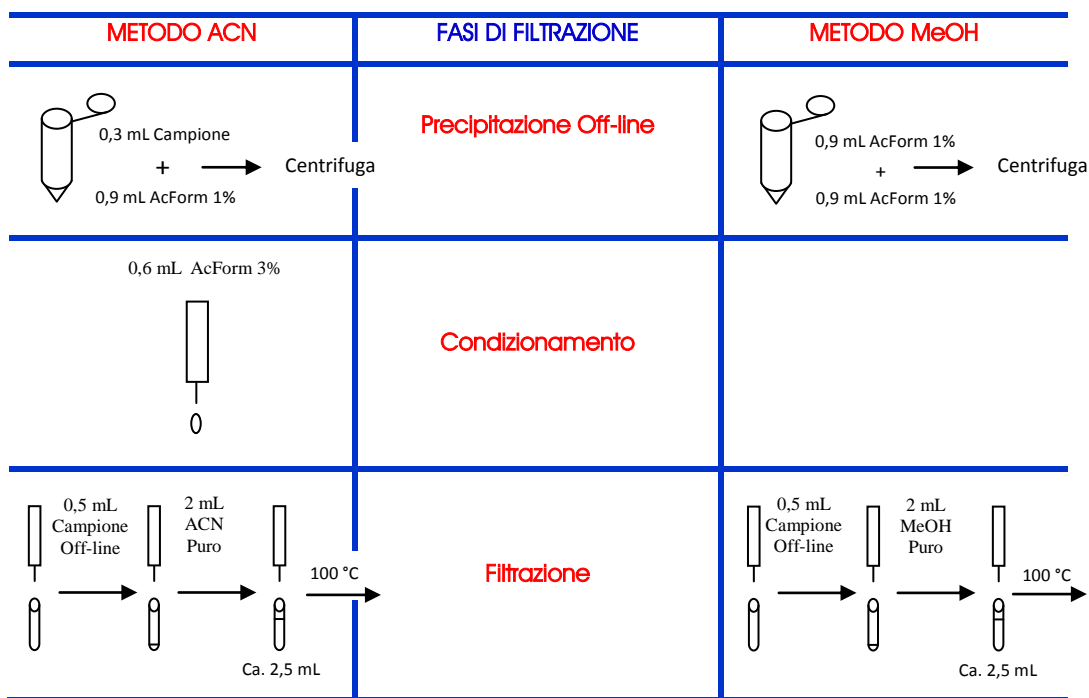


Figura 3.2. Rappresentazione schematica del due metodi di analisi

3.4.3.5 Deproteinizzazione della cute attraverso il metodo Folch

Inizialmente, l'esperimento di estrazione lipidica è stato condotto utilizzando dei tubi in plastica, i quali sono stati sostituiti da tubi in vetro nel corso degli esperimenti. In seguito a questo cambiamento è stato opportuno modificare i volumi utilizzati vista la diversa capacità dei due tipi di tubi, mantenendo i rapporti sempre costanti.

Nei tubi di plastica sono stati pipettati 8 mL di CHCl_3 e 4 mL MeOH in modo da avere un rapporto di 2:1 v/v. A tale soluzione sono stati aggiunti 0,5 mL di campione.

In caso di utilizzo, invece, di tubi di vetro sono stati pipettati 4 mL di CHCl_3 e 2 mL MeOH in modo da mantenere costante il rapporto di 2:1 v/v. Successivamente, sono stati aggiunti 0,25 mL di campione.

Per entrambe le condizioni le soluzioni ottenute sono state lasciate a riposo per 60 minuti.

In seguito, nel tubo è stata aggiunta una quantità di WMQ pari al volume del MeOH (4 mL per tubi in plastica e 2 mL per i tubi in vetro) ed è stata eseguita un'agitazione manuale molto lenta, utilizzando del parafilm come tappo. Dopo aver ripristinato la chiusura con i rispettivi tappi a vite, i campioni sono stati lasciati a riposo per 60 minuti per favorire l'interazione dei solventi col campione.

La separazione tra le due fasi (CHCl_3 /WMQ-MeOH), è stata ottenuta attraverso una centrifugazione (C1, 60 minuti, 1000 g, rotore ad angolo mobile S41), che ha permesso di trasferire la fase superiore (WMQ-MeOH) in un altro tubo attraverso l'utilizzo di una micro pipetta Pasteur.

Le due fasi sono state analizzate allo spettrofotometro UV-Vis per notare eventuali differenze tra i due spettri e per comprendere in quale delle due si ripartisse il farmaco d'interesse.

3.4.4. Analisi dei campioni di cute deproteinizzati

In seguito ai trattamenti di deproteinizzazione, i campioni sono stati analizzati allo spettrofotometro UV-Vis e/o verificata l'efficacia del trattamento attraverso l'utilizzo del kit NanoOrange (Cap.2).

Analisi spettrofotometrica UV-Vis: il campione deproteinizzato (1 mL) è stato trasferito all'interno della cuvetta ed è stato analizzato allo spettrofotometro.

L'analisi è stata effettuata in seguito al completamento dell'inizializzazione dello strumento ed alla verifica della sua calibrazione. Nell'impostazione dei parametri è stata presa in considerazione la capacità di assorbimento nella regione spettrale compresa tra 1100 e 190 nm.

Gli spettri sono stati ottenuti grazie al software Cary UV-Vis; i dati relativi sono stati successivamente esportati ed elaborati con i programmi Excel 2007, ed Origin 6.0.

Inoltre, prima di ciascuna analisi la cuvetta è stata lavata ripetutamente con WMQ e asciugata opportunamente, prestando attenzione all'assenza di impronte digitali, pelucchi e goccioline di WMQ. Infine, prima di ciascun campione è stato effettuato lo spettro del relativo bianco.

3.5 Presentazione e discussione dei risultati

Nel seguente capitolo saranno descritti e discussi i risultati degli esperimenti fatti per mettere a punto il protocollo definitivo per la deproteinizzazione della cute seguendo l'ordine cronologico in cui sono stati ottenuti.

3.5.1 Dissoluzione della cute

Gli esperimenti sono iniziati sulla base di ciò che veniva detto da B.Brown [13], secondo il quale la cute doveva essere sminuzzata con dei bisturi e messa a contatto con una soluzione di Collagenase IV (3650 IU/g di cute) alla quale era necessario aggiungere una soluzione salina di Hank a pH 7.4. Successivamente, era prevista un' incubazione in un bagnetto a 37°C per 15 h. In seguito, era necessario allestire una soluzione costituita da 0,7 mL di campione e 0,3 mL di MeOH per poi procedere con una centrifugazione a 13500 rpm per 10 minuti. Infine si analizzava il surnatante.

Nel nostro laboratorio, tale protocollo è stato adattato rispetto al materiale di cui eravamo già in possesso.

Infatti, è stata utilizzata la Collagenase II e la soluzione salina Dulbecco, in sostituzione alla Collagenase IV e alla soluzione salina di Hank.

La cute umana utilizzata nel corso dell'esperimento di veicolazione transdermica è stata sminuzzata (Par. 3.4.2) e messa a contatto con la soluzione di Collagenase II (Par. 3.4.2).

La dissoluzione effettuata da Brown *et al.*, è favorita da una temperatura di incubazione di 37°C, ma nel corso dei nostri esperimenti sono state testate anche la temperatura ambiente e la temperatura di 4-6°C del frigo. Infatti, la cute sminuzzata è stata divisa in tre bottigliette identiche delle quali una è stata messa in stufa, una in frigo, e l'ultima è stata mantenuta a temperatura ambiente sopra un bancone del laboratorio.

Il risultato ottenuto è stato un aumento proporzionale dello scioglimento della cute al crescere della temperatura di incubazione, confermando che la condizione ottimale e più rapida fosse quella consigliata da Brown *et al.* Per poter affermare ciò, l'avanzamento

della dissoluzione è stato monitorato a 7, 24, e 30 ore di esposizione alle diverse temperature.

La Figura 3.3 mostra la cute a contatto con la Collagenase da 7 ore nelle tre diverse condizioni.

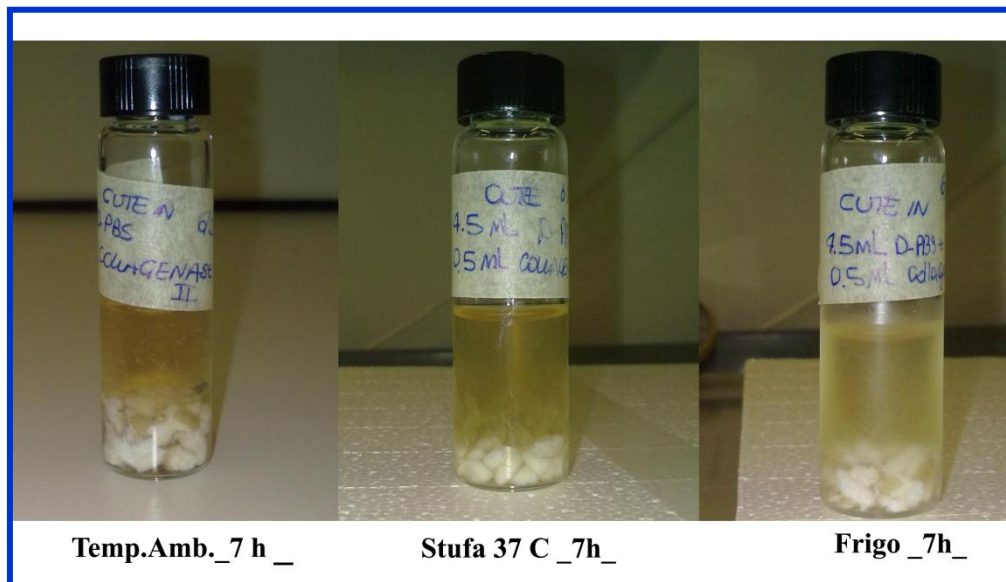


Fig. 3.3 Cute umana a contatto con la collagenase per 7 ore

In seguito a 7 ore di contatto (Fig.3.3) non è ancora possibile prevedere quale delle tre condizioni sia quella ottimale, anche se nel campione in stufa si intravede già il distaccamento dello strato corneo.

La Figura 3.4 rappresenta la situazione creatasi dopo 24 ore di contatto della cute con la Collagenase.

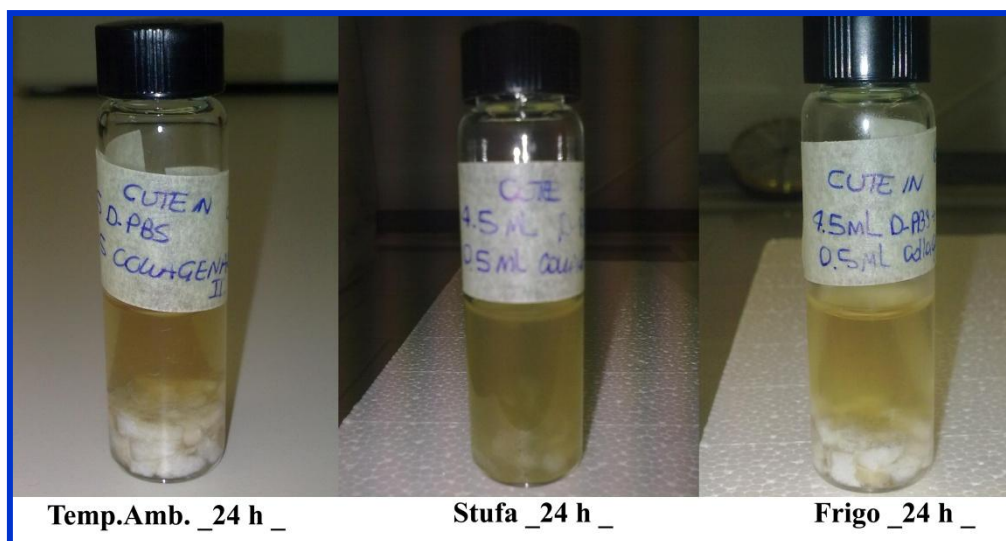


Fig. 3.4 Cute umana a contatto con la collagenase per 24 ore

Trascorse le 24 ore di trattamento è evidente una netta differenza tra le tre diverse condizioni testate, infatti, solamente nel campione lasciato in stufa è possibile notare un inizio del discioglimento della cute.

La Figura 3.5 rappresenta la condizione dei campioni in seguito a 30 ore di esposizione.

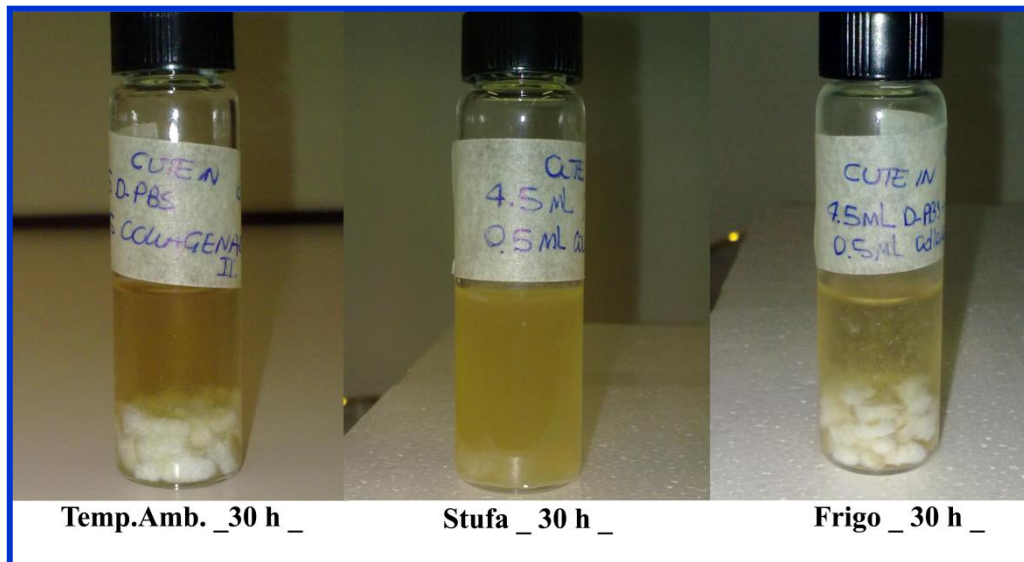


Fig. 3.5 Cute umana a contatto con la collagenase per 30 ore

La cute messa a contatto con la Collagenase per un tempo di contatto di 30 ore ad una temperatura di 37°C all'interno di una stufa ventilata appare completamente sciolta, al contrario degli altri due campioni, nei quali sono ancora ben visibili i pezzetti di tessuto.

3.5.2 Deproteinizzazione della cute

Per l'eliminazione del contenuto proteico dalla cute, sono stati testati diversi metodi per capire quale fosse quello più efficace e conveniente (Par. 3.4.3).

3.5.2.1 Precipitazione in solvente organico, Amicon, Criodeproteinizzazione

La prima parte degli esperimenti effettuati hanno sfruttato i tre diversi metodi descritti nel Paragrafo 3.4.3.1- 3.4.3.3: precipitazione con solvente organico (metodo Brown), Amicon, e la criodepreoteinizzazione (congelamento).

Si è iniziato con la preparazione di un campione per ciascuno dei tre metodi, utilizzando per tutti la cute precedentemente disciolta in Collagenase.

La Tabella 3.1 mostra nella prima colonna il metodo utilizzato, nella seconda il volume del campione di cute disciolta, nella terza la quantità di MeOH necessaria ed infine nell'ultima, il successivo trattamento seguito da ciascun campione.

Tabella 3.1 Trattamenti di deproteinizzazione del campione

Metodo	Campione (μL)	MeOH (μL)	Trattamento
Brown	700	300	Centrifuga
Amicon	500	-	Centrifuga
Congelamento	500	210	-80°C

A seguire, i campioni trattati (Tab. 3.1), sono stati analizzati attraverso il kit NanoOrange per la quantificazione proteica (Cap. 2), utilizzando 80 μL (2020 μL di WS) del loro volume.

La Tabella 3.2 mostra i risultati ottenuti dall'esperimento, e la Tabella 3.3 mostra la ripetizione della quantificazione dei campioni trattati col metodo Brown e col metodo del congelamento, ai quali però è stata considerata una filtrazione aggiuntiva effettuata con filtri a siringa Acrodisc. Entrambi gli esperimenti sono stati realizzati col kit seminuovo, e le rispettive tabelle comprendono le fluorescenze: del bianco cuvetta (W), del campione (C), del campione normalizzato (CN) e del campione normalizzato anche rispetto alla WS (CF).

Tabella 3.2 Risultati della quantificazione proteica dei tre diversi metodi

Campione	Metodo	Fluorescenza (u.a.)				Proteine $\mu\text{g/mL}$
		W	C	CN	CF	
1	Bianco	148,2	181,2	33,0	0,0	0,0
2	Brown	149,1	826,4	677,2	644,2	12,9
3	Amicon	149,5	625,2	475,8	442,7	8,9
4	Congelamento	150,3	845,3	695,0	662,0	13,3

I dati ottenuti (Tab. 3.2) mettono in evidenza la maggior efficacia del metodo con filtrazione in Amicon e l'equivalenza degli altri due.

In Tabella 3.3, invece, è possibile notare che l'ulteriore filtrazione comporta una eliminazione di proteine di 1,6 e 1,7 $\mu\text{g/mL}$ per il metodo Brown e per il metodo del congelamento rispettivamente.

Tabella 3.3 Risultati della quantificazione proteica con filtrazione Acrodisc aggiuntiva

Campione	Metodo	Fluorescenza (u.a.)				Proteine $\mu\text{g/mL}$
		W	C	CN	CF	
1	Bianco	152,5	181,9	29,4	0,0	0,0
2	Brown	152,3	746,8	594,5	565,0	11,3
4	Congelamento	152,3	761,6	609,3	579,8	11,6

Gli esperimenti si sono interrotti per qualche mese, per poi riprendere con la quantificazione proteica del medesimo pezzo di cute umana degradato in Collagenase.

L'allestimento dell'esperimento ha previsto il trattamento della cute con il metodo Amicon. Infatti, sono stati centrifugati tre campioni secondo il protocollo descritto nel Paragrafo 3.4.3.2. Sono stati, inoltre, preparati anche tre ulteriori campioni, identici ai precedenti, i quali però sono stati filtrati con Acrodisc prima di essere testati col kit (Cap. 2). Per ciascun triplicato è stato realizzato il rispettivo bianco.

La Tabella 3.4 raccoglie i dati dell'esperimento effettuato, mostrando il metodo utilizzato e le fluorescenze: del bianco cuvetta (W), del campione (C), del campione normalizzato (CN) e del campione normalizzato anche rispetto alla WS (CF).

Mentre nell'ultima colonna a destra è riportata la concentrazione ottenuta per conversione della fluorescenza in $\mu\text{g/mL}$ tramite l'equazione della retta di calibrazione (Par. 2.4.3).

Tabella 3.4 Risultati della quantificazione proteica con e senza filtrazione Acrodisc aggiuntiva

Campione	Metodo	Fluorescenza (u.a.)				Proteine $\mu\text{g/mL}$
		W	C	CN	CF	
1	Bianco	155,5	169,5	14,0	0,0	0,0
2	Amicon	155,6	740,1	584,5	576,1	11,6
3	Amicon	155,4	770,8	615,4	607,0	12,1
4	Amicon	155,8	755,2	599,4	591,0	11,9
1	Bianco	155,5	163,9	8,4	0,0	0,0
2	Amicon+Acrodisc	155,6	846,7	691,1	682,7	13,7
3	Amicon+Acrodisc	155,6	821,6	666,0	657,6	13,2
4	Amicon+Acrodisc	155,6	837,9	682,3	673,9	13,6

La Tabella 3.4 mette in evidenza una concentrazione proteica più alta nei campioni caratterizzati dall'ulteriore filtrazione aggiuntiva. Tale risultato non rispecchia le aspettative di partenza, in quanto l'ulteriore filtrazione era stata considerata come un passaggio coadiuvante per una massiva deproteinizzazione.

L'esperimento è stato ripetuto nello stesso identico modo, aggiungendo come unico accorgimento il lavaggio del filtro Acrodisc con WMQ e la sua asciugatura all'aria per qualche ora. È stato ipotizzato che il campione interagendo col filtro potesse promuovere il rilascio di glicerolo da parte di quest'ultimo, che comportasse l'alterazione della quantificazione proteica. La Tabella 3.5 è stata allestita nello stesso identico modo della Tabella 3.4 riportando gli stessi dati nel medesimo ordine.

I dati ottenuti mostrano un'identica efficacia dei metodi che presentano dei risultati molto simili tra loro. Si nota che la somiglianza non è presente solo tra i due metodi ma anche all'interno del triplicato stesso. Tale risultato dimostra quindi la ripetibilità del metodo, ma per quanto riguarda la comparazione tra i due metodi, la filtrazione in Acrodisc non sembra apportare un'ulteriore apporto all'eliminazione proteica.

Tabella 3.5 Risultati della quantificazione proteica con e senza filtrazione Acrodisc aggiuntiva (con lavaggio)

Campione	Metodo	Fluorescenza (u.a.)				Proteine µg/mL
		W	C	CN	CF	
1	Bianco	151,8	162,0	10,1	0,0	
2	Amicon	155,3	748,1	592,8	582,7	11,7
3	Amicon	156,0	744,3	588,4	578,2	11,6
4	Amicon	155,4	736,1	580,1	570,6	11,5
1	Bianco	149,2	159,7	10,5	0,0	
2	Amicon+Acrodisc	155,6	741,6	586,0	575,5	11,6
3	Amicon+Acrodisc	156,8	737,2	580,4	569,8	11,5
4	Amicon+Acrodisc	156,6	708,0	551,4	540,8	10,9

Concludendo, è quindi possibile affermare che il metodo che ha mostrato una maggior efficacia e ripetibilità è stato quello riguardante l'utilizzo delle Amicon. Oltretutto risulta essere anche il metodo più veloce e pratico. È possibile apprezzare la loro efficacia anche in letteratura, dove è riscontrabile il loro successo d'utilizzo anche in campioni di sangue umano [19] e di saliva [20].

3.5.2.2 Hybrid-Spe

Gli esperimenti di deproteinizzazione della cute sono proseguiti utilizzando un metodo alternativo a quelli descritti precedentemente, nel quale viene sfruttata la particolare attitudine degli ioni zirconia, presenti nel filtro delle cartucce, di legare e quindi di intrappolare, lipidi e proteine.

La precipitazione attraverso le HybridSPE è una semplice tecnica di separazione progettata per rimuovere dal campione elevati livelli di proteine endogene ed interferenze di fosfolipidi prima dell'analisi cromatografica.

La fase stazionaria della cartuccia è come un filtro chimico che interagisce specificamente con i fosfolipidi. Il meccanismo di ritenzione altamente selettivo è basato su interazioni tra gli acido-base di Lewis e gli ioni zirconia legati alla fase stazionaria e la porzione fosfato contenuta in tutti i fosfolipidi.

Queste cartucce consentono una riduzione significativa della preparazione del campione. Al termine di una fase di precipitazione delle proteine, il campione viene filtrato direttamente nella cartuccia, raccolto e (nella maggior parte dei casi) analizzato direttamente [21].

Il manuale della casa madre ha fornito parecchi metodi di utilizzo a seconda della natura dei componenti presenti nei campioni. È stato necessario contattare la ditta produttrice per indirizzarci sul metodo di analisi da scegliere, vista la particolarità della sostanza presente nei nostri esperimenti.

La ditta produttrice ha consigliato le due metodiche descritte nel Paragrafo 3.4.3.4, che sono state testate entrambe per verificare quale delle due permettesse un maggior recupero del farmaco presente nel campione d'interesse.

Inizialmente, è stata filtrata nelle cartucce semplicemente la cute in Collagenase, con entrambi i metodi (Par. 3.4.3.4), ed è stata verificata l'entità della deproteinizzazione attraverso un'analisi spettrofotometrica.

La Figura 3.6 rappresenta il confronto tra il metodo I (Fig. 3.6.A) ed il metodo II (Fig. 3.6.B), ed inoltre, ciascun metodo è stato messo a confronto con la cute precipitata off-line ma non filtrata con le Spe. Tale confronto è stato voluto per mettere in evidenza l'effetto dell'interazione tra la matrice delle cartucce e la soluzione precipitante.

Dagli spettri rappresentati nella Figura 3.6.A è osservabile l'apparente efficacia della filtrazione Spe che sfrutta il metodo I, notando un andamento spettrale molto più pulito e minori interferenze rispetto al grafico della cute non filtrata.

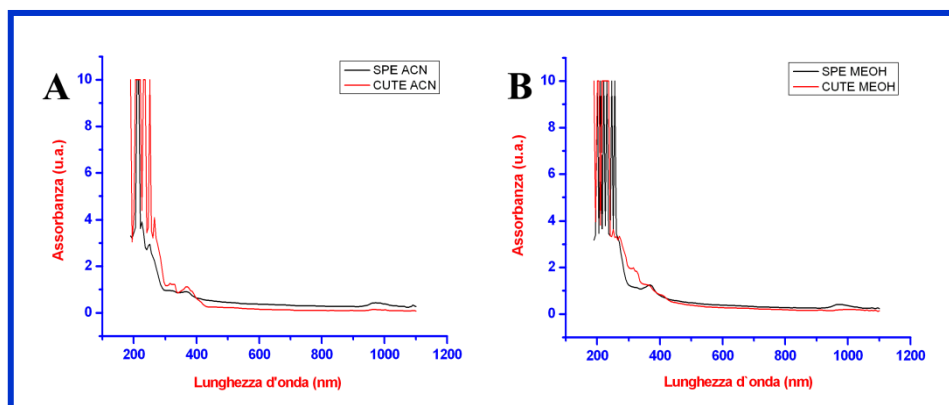


Fig. 3.6 Cute umana non filtrata messa a confronto con filtrata con metodo I (A) e metodo II (B)

I risultati ottenuti, invece, con il metodo II, mostrano una non spiccata pulizia dello spettro del campione filtrato rispetto a quello non filtrato, in quanto è visibile un picco consistente a ca. 400 nm ed anche la parte alta dello spettro appare molto più sporca.

L'esperimento è stato ripetuto il giorno successivo eseguendo una centrifuga aggiuntiva per verificare se venisse ottenuta una maggiore pulizia dello spettro.

La prova è stata effettuata per entrambi i metodi eseguendo, in doppio, una prima centrifuga come descritto nel Paragrafo 3.4.3.4, successivamente, è stato prelevato il surnatante ed è stato trasferito in una seconda eppendorf. Un campione di ciascun metodo è stato sottoposto ad una nuova centrifuga della stessa durata e condizioni della prima. In seguito, i surnatanti ottenuti dalle centrifughe sono stati filtrati in cartuccia Spe. Dopo l'essiccazione e la risospensione sono stati realizzati gli spettri all'UV (Fig. 3.7), analizzando anche la cute trattata con la precipitazione off-line con una e con due centrifughe (Fig. 3.8).

La Figura 3.7 rappresenta il confronto tra la filtrazione in Spe del metodo I (Fig. 3.7.A) e del metodo II (Fig. 3.7.B).

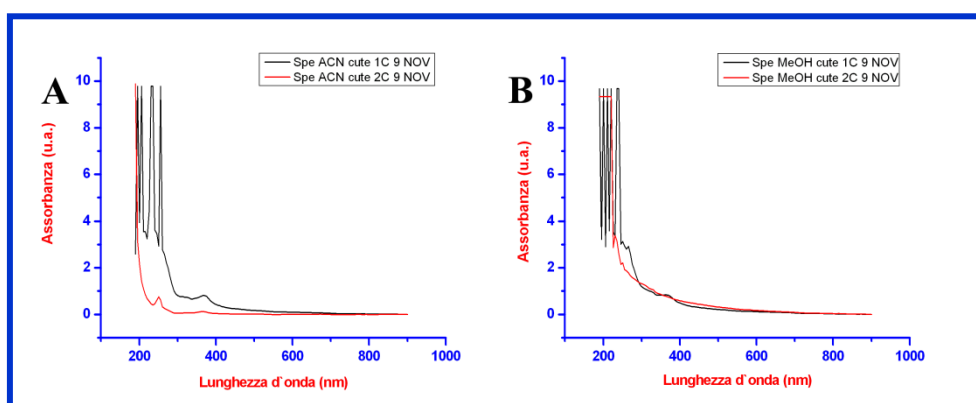


Figura. 3.7 Cute umana filtrata con metodo I (A) e metodo II (B) con 1 o 2 centrifughe

Nella Figura 3.7.A è evidente la differenza ottenuta tra lo spettro in nero (una centrifuga) e quello in rosso (due centrifughe). La doppia centrifuga ha apportato, infatti, un'evidente pulizia dello spettro. Lo stesso risultato è stato ottenuto per il metodo II, infatti nella Figura 3.7.B è palese una maggior linearità dello spettro ottenuto dalla doppia centrifuga, nonostante però sia presente un po' di deriva.

Nella Figura 3.8, invece, è mostrata la comparazione degli spettri della cute non filtrata in cartuccia ma precipitata offline con le due differenti metodiche. Nella Figura 3.8.A è rappresentato il metodo I, mentre nella Figura 3.8.B è mostrato il metodo II, entrambi con una e due centrifughe.

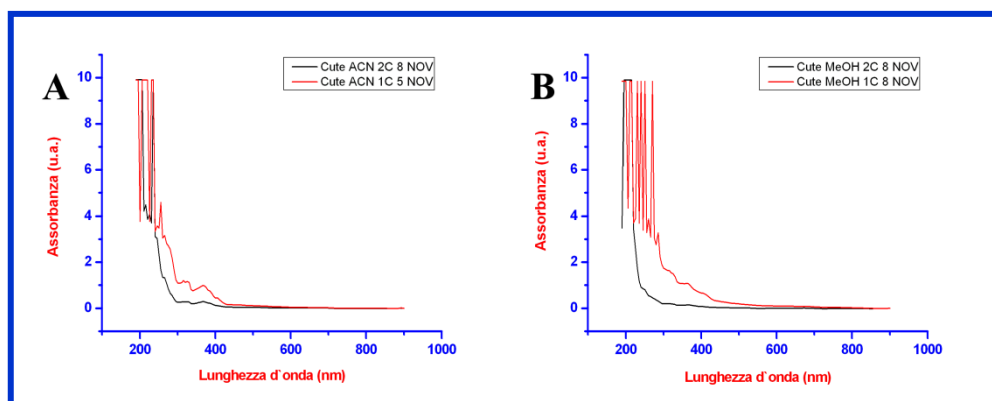


Fig. 3.8 Cute umana precipitata off-line, ma non filtrata, con 1 e 2 centrifughe

Gli spettri della cute non filtrata mostrano una maggior pulizia con la seconda centrifuga in entrambi i metodi. Questo risultato è maggiormente marcato con il metodo I (Fig. 3.7.A).

Nella Figura 3.9 sono stati raggruppati i risultati ottenuti per metodo. Nella Figura 3.9.A è possibile osservare il confronto tra le filtrazioni e la cute non filtrata che ha subito le diverse centrifughe del metodo I, mentre lo stesso confronto è stato fatto per il metodo II (Fig. 3.8.B).

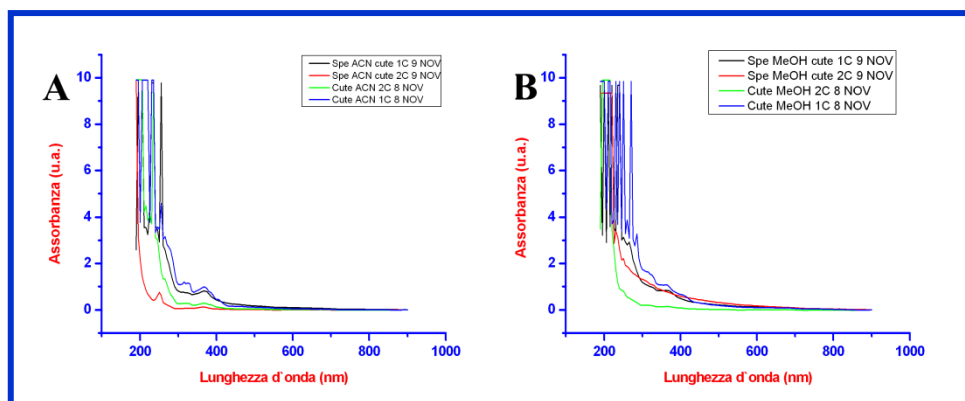


Fig. 3.9 Cute umana precipitata off-line e filtrata in spe secondo il metodo I (A) e il metodo II (B)

I campioni così trattati sono stati analizzati col kit NanoOrange di quantificazione proteica, per valutare quale dei due metodi eliminasse più proteine e per verificare l'effettiva diminuzione proteica con l'esecuzione della seconda centrifuga.

Sono stati utilizzati 0,1 mL di campione i quali sono stati analizzati come descritto nel Capitolo 2.

La Tabella 3.6 mostra la quantificazione proteica calcolata nei 100 μ L utilizzati per l'analisi (Kit) e nel volume totale di campione avente a disposizione (Campione). Nell'ultima colonna a destra, invece, è stata calcolata la percentuale proteica eliminata

rispetto al 100% che in questo caso è rappresentato dalla cute non filtrata in cartuccia (cute I, cute II, 1C e 2C).

Dai risultati illustrati nella Tabella 3.6 è possibile, innanzitutto, affermare che il metodo I mostra una maggior capacità deproteinizzante dimostrando una diminuzione proteica dell'82% rispetto al 78 % del metodo II.

Se si considera l'efficacia della centrifuga aggiuntiva è apprezzabile che il risultato evidenzia un'ulteriore deproteinizzazione solo del 4% nel metodo I. In questo risultato apparentemente positivo però non sono da sottovalutare gli eventuali aspetti negativi che potrebbero insorgere riguardo al recupero del campione ed alla perdita di farmaco in seguito alle due filtrazioni. Per quanto riguarda invece, il metodo II è visibile che la prima centrifuga ha messo in evidenza un'eliminazione proteica maggiore ma che seconda centrifuga non ha fornito il risultato sperato mostrando un risultato addirittura negativo.

Pertanto, visti i dati ottenuti è possibile indirizzare la scelta sull'esecuzione di un'unica centrifuga per entrambi i metodi in questione.

Per poter scegliere una delle due metodiche sinora testate, è stato pensato di effettuare uno studio sull'interazione del farmaco d'interesse, l'IbuNa, con la soluzione precipitante e con le cartucce Spe.

L'esperimento è stato realizzato attraverso l'esecuzione della precipitazione off-line del farmaco per ciascuno dei due metodi ed effettuando la filtrazione in cartuccia Spe per poterne successivamente calcolare la sua percentuale di recupero.

Tabella 3.6 Risultati di quantificazione proteica della cute filtrata in spe con singola e doppia centrifuga offline

Campione	Metodo	Proteine (μg)		Proteine eliminate (%)
		kit	Campione	
1	Cute I 1C	74,0	588,7	
2	Spe I 1C	13,4	107,5	82
3	Cute II 1C	71,0	850,9	
4	Spe II 1C	15,8	189,1	78
5	Cute I 2C	49,1	392,8	54
6	Spe I 1C	26,9	215,2	45
7	Spe I 2C	25,3	202,2	49
8	Cute II 2C	32,9	395,0	33
9	Spe II 1C	9,2	110,5	72
10	Spe II 2C	40,0	467,8	-18

La Figura 3.10 mostra lo spettro ottenuto dall'analisi allo spettrofotometro.

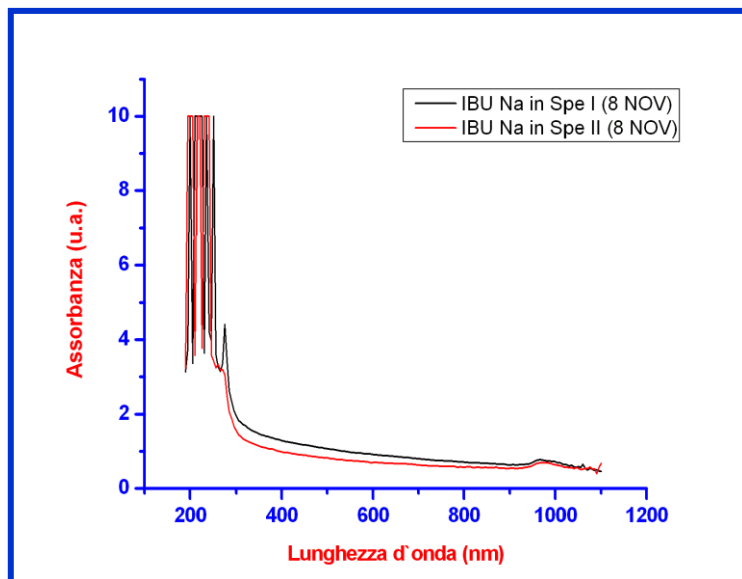


Figura 3.10. IbuNa filtrato in spe col metodo I (nero) e metodo II (rosso)

Gli spettri ottenuti (Fig.3.10) dall'utilizzo del metodo I (in nero) e del metodo II (in rosso), mostrano dei picchi inconsueti per entrambe le metodiche senza nessun picco evidente a 265 nm. In seguito ai risultati ottenuti sono stati effettuati gli spettri dei solventi utilizzati nel corso della filtrazione in Spe per esaminare l'andamento dello spettro: Acform all'1 % in ACN, Acform all'1 % in MeOH, ACN puro, MeOH puro.

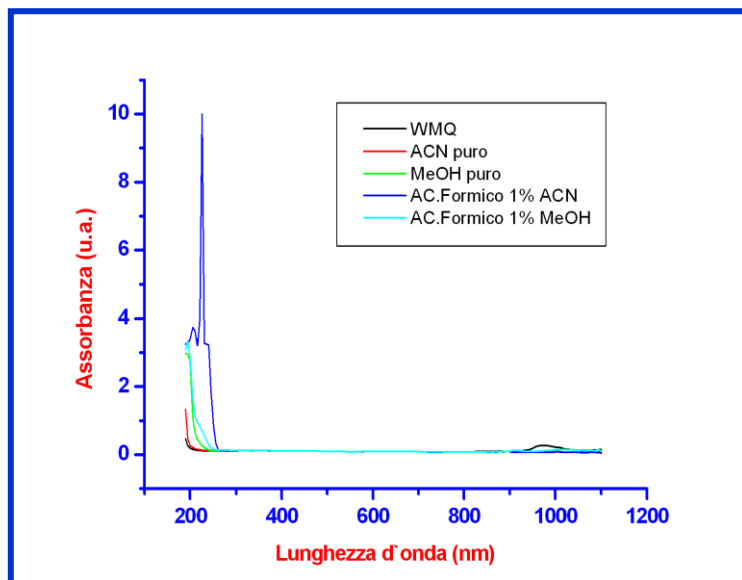


Figura 3.11. Analisi spettrofotometrica dei solventi puri e di precipitazione off-line

La Figura 3.11 mostra un'elevata pulizia degli spettri, e tale risultato fa dedurre che ciò che si riscontra nella porzione sinistra dello spettro del primo esperimento potrebbe essere dovuto al passaggio in cartuccia.

In seguito a questa ipotesi è stato allestito un esperimento nel quale la filtrazione in cartuccia è stata simulata, per approfondire lo studio sull'interazione del farmaco con la soluzione precipitante.

È stata quindi effettuata la precipitazione offline dell' IbuNa in TF25 e successivamente sono stati prelevati i 500 μL di campione ai quali sono stati aggiunti i 2 mL di solvente puro di lavaggio. A questa fase ha seguito l'essiccamento in stufa e la risospensione in 0,5 mL di WMQ. Nella Figura 3.12 è possibile infatti vedere il risultato ottenuto dallo spettrofotometro UV-Vis.

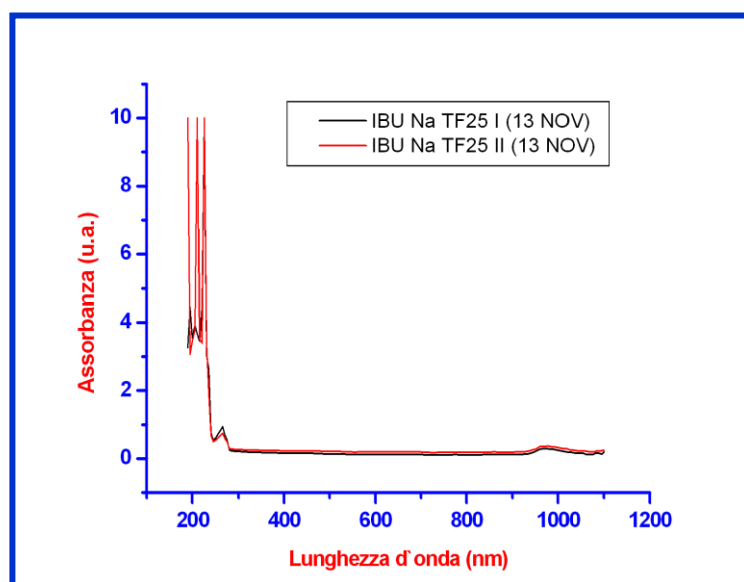


Figura 3.12. Analisi UV dell'Ibu Na in TF25 precipitato offline e con simulazione di filtrazione

Lo spettro (Fig. 3.12) mostra una leggera differenza tra i due metodi nella parte sinistra del grafico, nel quale il metodo I appare molto più pulito ed inoltre, sempre lo stesso metodo evidenzia un picco del farmaco più regolare. La differente altezza del picco è un risultato atteso in quanto le due soluzioni di precipitazione offline hanno concentrazioni differenti di farmaco, 4,25 mg/mL per il metodo I e 2,83 mg/mL per il metodo II. Quantificando la concentrazione di farmaco ottenuta attraverso la conversione del valore di assorbanza (a 265 nm) in concentrazione attraverso l'utilizzo della retta di calibrazione, sono stati ottenuti come risultati 0,6 mg/mL per il metodo I e 0,5 mg/mL per il metodo II. Ciò significa che il recupero del farmaco è stato molto basso.

Per vedere se il problema del recupero fosse dovuto al TF25 sono state ricercate le eventuali differenze tra le due soluzioni di IbuNa preparato in WMQ piuttosto che in TF25, ed è stato così realizzato lo spettro di 250 μL di campione diluiti con 1 mL di WMQ.

La Figura 3.13 mostra il risultato dell'analisi spettrofotometrica dell'IbuNa.

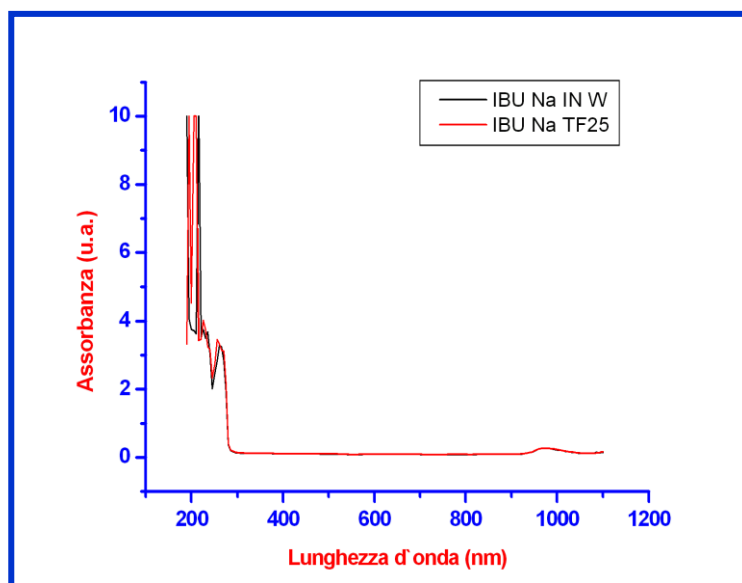


Figura 3.13. Analisi UV-Vis di 0,25 mL di IbuNa in WMQ (nero) ed in TF25 (rosso)

La Figura 3.13 mette in risalto una maggior regolarità dello spettro del farmaco sciolto in WMQ, ma in linea di massima sono quasi perfettamente sovrapposti.

Per capire l'effettiva quantità di farmaco recuperata, è stata quantificata la concentrazione attraverso il valore dell'assorbanza della sostanza a 265nm ed è stata convertita in concentrazione utilizzando la retta di calibrazione.

La concentrazione teorica per l'IbuNa in entrambe le situazioni era del 3,4 mg/mL, ma sono stati recuperati 2,51 mg/mL per la soluzione in WMQ (spettro in nero), e 2,44 mg/mL per il farmaco in TF25 (spettro in rosso). Tale risultato significherebbe un recupero del 73,8 % per l'IbuNa in WMQ e del 71,8 % per l'IbuNa in TF25.

L'aspetto sorprendente sta nel fatto che non è stata recuperata la totalità del farmaco nonostante sia stata effettuata una semplice diluizione evitando i particolari passaggi caratteristici del metodo Spe con la soluzione precipitante e l'essiccazione a 100 °C.

È stato ipotizzato che i problemi di recupero potessero essere dovuti magari all'interazione del TF25. Per questo l'esperimento eseguito per il farmaco con le due metodiche di precipitazione è stato ripetuto, nello stesso modo del precedente, anche per il tampone fosfato 25 mM trattandolo con le due soluzioni precipitanti.

Nel corso dell'esperimento è stato notato un comportamento anomalo del campione che ha seguito il metodo I al momento dell'aggiunta dei 2 mL di ACN alla miscela del tampone col la soluzione precipitante. In pochi secondi si è costituita una formazione dalla consistenza quasi gelatinosa simile ad una "medusa". Man mano che il tempo di contatto aumentava si andava ad ingrandire anche la formazione anomala. È stato comunque proseguito l'esperimento come fatto precedentemente.

Nell'aggiunta dei 2 mL di MeOH invece non è accaduto nulla di strano.

Inoltre, è stato ripetuto un esperimento con l'IbuNa nel quale è stata simulata la filtrazione in cartuccia. È stata effettuata la precipitazione offline nei due diversi metodi e successivamente, sono stati aggiunti i 2 mL di solvente di lavaggio. I 2,5 mL di soluzione sono stati essiccati in stufa e risospesi in 2,5 mL di WMQ. È stato variato il volume di risospensione per ottenere uno spettro molto più chiaro anche nella parte sinistra in quanto diluito.

I risultati ottenuti dalle analisi allo spettrofotometro di tale esperimento sono stati riportati nella Figura 3.14, nella quale vengono confrontati gli spettri del farmaco trattato nei due metodi di analisi, con due diversi volumi di risospensione.

Dalla Figura 3.14 è possibile notare il confronto tra le due diverse concentrazioni, ma per quantificare realmente il farmaco è stata considerata l'assorbanza a 265 nm ed è stata così calcolata la concentrazione esplicitando l'equazione della retta di calibrazione.

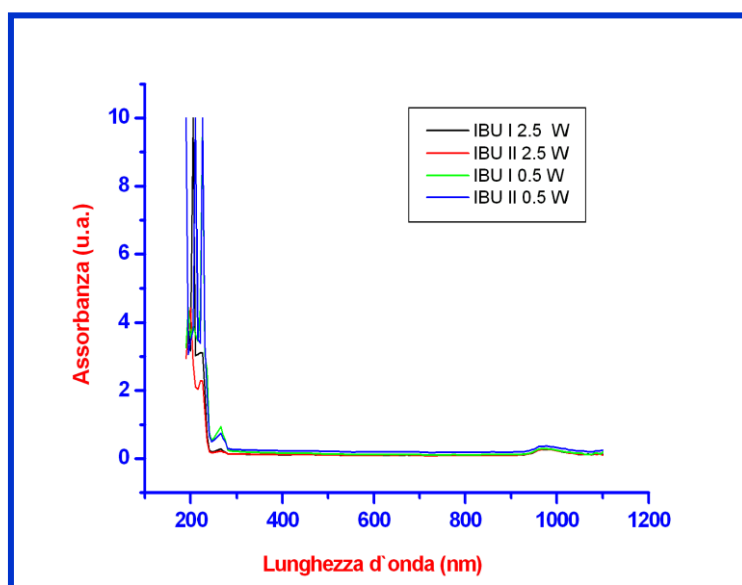


Figura 3.14. Analisi dell'Ibu Na in TF25 risospeso in 0,5 mL (verde e blu) e in 2,5 mL (nero e rosso)

La Tabella 3.7 mostra quanto IbuNa è stato recuperato dall'esperimento eseguito, tenendo conto anche della concentrazione teorica per poi calcolare la percentuale trovata.

Tabella 3.7 Quantificazione dell'Ibu Na in TF25 trattato con metodo I e II risospeso in 0,5 e 2,5 mL

Campione	Metodo	IbuNa (mg/mL)		Recupero (%)
		Teorica	Trovata	
1	Ibu Na I 0,5	4,25	0,36	8,5
2	Ibu Na II 0,5	2,83	0,54	19,1
3	Ibu Na I 2,5	0,85	0,13	15,3
4	Ibu Na II 2,5	0,56	0,10	17,6

I risultati ottenuti risultano essere molto bassi, con una percentuale di recupero più bassa col metodo I in entrambe le diluizioni.

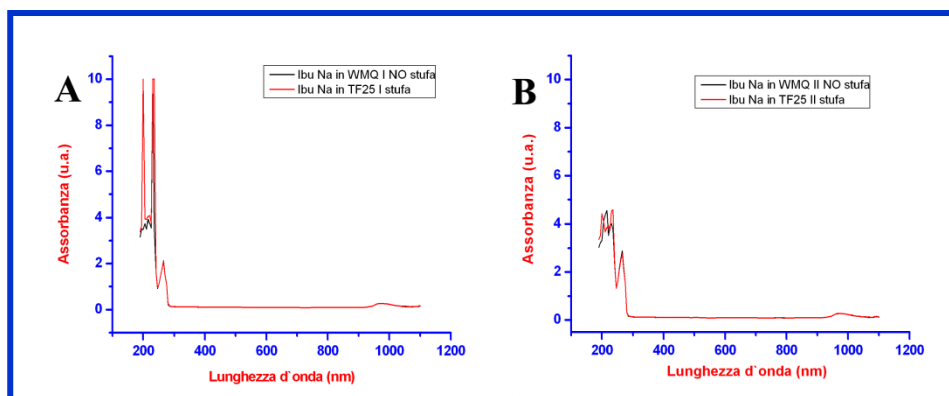
Visti i risultati non conformi alle aspettative, sono stati allestiti degli esperimenti per verificare se l'essiccazione fosse la causa del basso recupero di farmaco.

Quindi sono stati pipettati in dei tubi di plastica 200 o 300 μ L, a seconda del metodo, di IbuNa. Seguendo la procedura dell'esperimento, sono stati messi in stufa sino al loro completo essiccamento e successivamente sono stati risospesi in 2,5 mL di WMQ e sono stati analizzati all'UV.

Inoltre, per poter effettuare un paragone sull'azione della temperatura dei 100 °C sul composto, sono stati preparati dei campioni allestiti pipettando 200 o 300 μ L di IbuNa e aggiungendo 2300 o 2200 μ L di WMQ, a seconda del metodo, raggiungendo così il volume finale di 2,5 mL. In seguito, i campioni sono stati vortexati per qualche minuto e sono stati analizzati allo spettrofotometro. È stato saltato il passaggio in stufa.

Entrambi gli esperimenti sono stati realizzati sia utilizzando l'IbuNa sciolto in WMQ che l'IbuNa sciolto in TF25 mM.

Gli spettri ottenuti dall'analisi sono mostrati nella Figura 3.15 nella quale è possibile mettere a confronto il metodo I (Fig. 3.15.A) con il metodo II (Fig. 3.15.B).

**Figura 3.15.** Analisi dell'IbuNa con metodo I (A) e metodo II (B) essiccato e non

Per avere un'idea del recupero del farmaco ottenuto, è stata calcolata la sua concentrazione utilizzando il valore di assorbanza a 265 nm e trasformandola in concentrazione attraverso la curva di calibrazione.

La Tabella 3.8 mostra nella terza colonna da sinistra, la concentrazione di farmaco attesa, quella quantificata e la sua percentuale di recupero.

Tabella 3.8 Risultati di quantificazione dell'Ibu Na attraverso analisi UV-Vis

Campione	Metodo	IbuNa ($\mu\text{g/mL}$)		Recupero farmaco (%)
		Teorica	Trovata	
1	Ibu W I + W	2040	2045,5	100,3
2	Ibu TF25 I seccato	2040	1367,5	67,0
3	Ibu W II + W	1360	1335,0	101,8
4	Ibu TF25 II seccato	1360	1938,0	142,5
5	Spe Ibu I	850	1196,3	140,6
6	Spe Ibu II	567	2617,7	461,7

I valori ottenuti (Tab. 3.8) mostrano una quantificazione dell'IbuNa molto superiore a quella attesa tranne nel caso del campione n.2. È stato ottenuto un recupero molto vicino al 100 % per i campioni n.1 e n. 3, mentre per gli altri si passa ad una percentuale del 140 % per arrivare al campione n.6 con un recupero del 462 %.

Dai risultati è apparso evidente che non è stata ottenuta la quantificazione attesa, quindi si è provveduto alla ripetizione della curva di calibrazione dell'IbuNa sia sciolto in WMQ che in TF25 (Fig. 3.16), pensando che l'errore di quantificazione fosse dovuto alla retta.

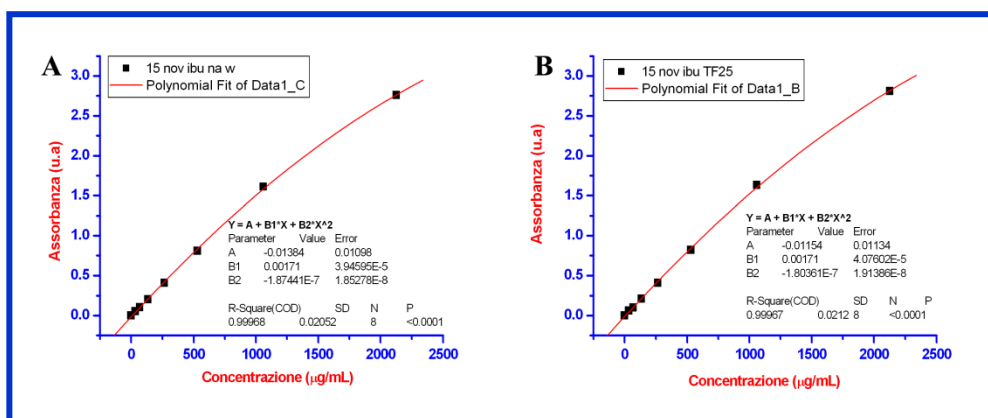


Figura 3.16. Rette di calibrazione dell'IbuNa in WMQ (A) e dell'IbuNa in TF25 (B)

Le rette presenti nella Figura 3.16 mostrano l'estrema somiglianza delle due rette, aventi addirittura il valore R quasi identico. Quindi il problema della quantificazione non è attribuibile alla retta di calibrazione.

Gli esperimenti sono proseguiti utilizzando il TF25 come campione, infatti è stato trattato come tale nella filtrazione in Spe, testando i due metodi.

È stato seguito il protocollo al Paragrafo 3.4.3.4 ma in aggiunta è stata eseguita un'analisi spettrofotometrica prima e dopo l'essiccazione in stufa.

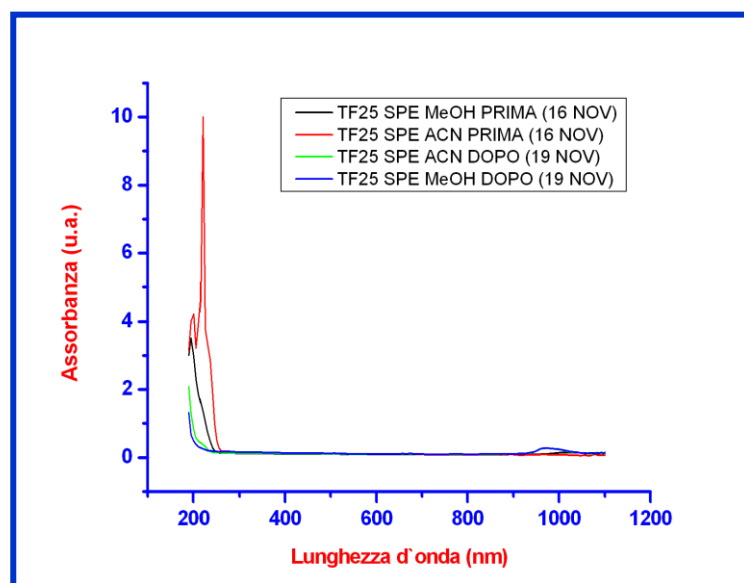


Figura 3.17. Analisi del TF25 trattato come spe prima e dopo l'essiccazione

Dalla Figura 3.17 è possibile notare che prima dell'essiccazione sono presenti due picchi, quello relativo al metodo I (in rosso) e al metodo II (in nero), che raggiungono un'assorbanza di 3,5 e 10 u.a. rispettivamente. In seguito alla permanenza in stufa gli spettri appaiono invece molto puliti e senza nessun picco significativo.

Nel corso dell'esperimento, inoltre, è stato preparato un campione di IbuNa in WMQ, a concentrazione nota (2,04 mg/mL), il quale è stato seccato e risospeso in 2,5 mL di WMQ ed è stato quantificato allo spettrofotometro (Fig. 3.18).

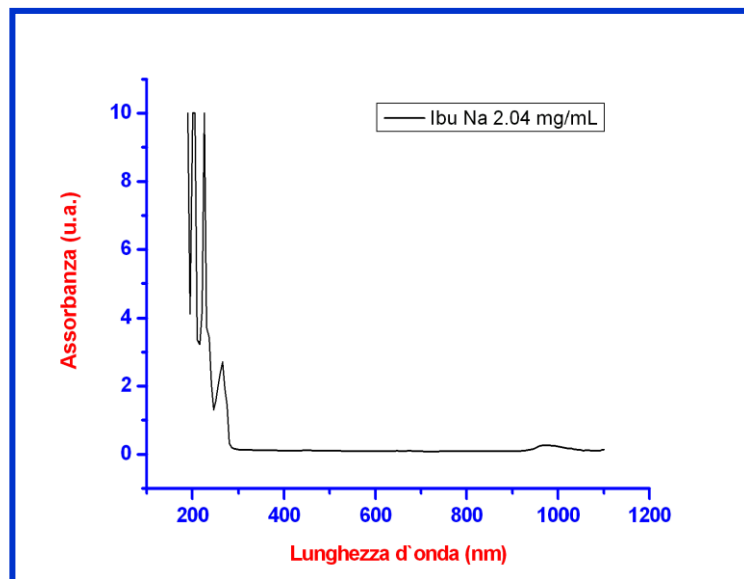


Figura 3.18. Analisi di Ibu Na a concentrazione nota (2,04 mg/mL)

Lo spettro rappresentato in Figura 3.18 appare abbastanza pulito e dalla forma abbastanza regolare, ma se si procede con la quantificazione del farmaco attraverso l'utilizzo della propria assorbanza a 265 nm e la conversione in concentrazione attraverso l'utilizzo della retta di calibrazione, si ottengono 2120,7 $\mu\text{g/mL}$, ciò significa che si quantifica una concentrazione superiore a quella realmente utilizzata (104 %).

Data l'incomprensione della non corretta quantificazione del campione a concentrazione nota, è stata allestita un'ulteriore retta di calibrazione dell'IbuNa in WMQ utilizzando una soluzione madre nuova appena preparata.

La Figura 3.19.A mostra la retta dell'IbuNa ottenuta come da protocollo (Par. 4.5.1.4) e il confronto con le due rette precedenti (Fig. 3.19.B).

Dal confronto delle ultime tre rette realizzate è palese l'uguaglianza tra le ripetizioni, infatti, come si nota dalla Figura 3.19.B i punti sono perfettamente sovrapposti. Tale risultato rafforza l'idea che il problema non risieda nella retta di calibrazione la quale è risultata ripetibile.

In seguito ai risultati di recupero del farmaco ottenuti, è stato allestito un esperimento atto a confrontare simultaneamente diverse condizioni, nel tentativo di capire quale fosse il passaggio critico del reale esperimento di filtrazione Spe.

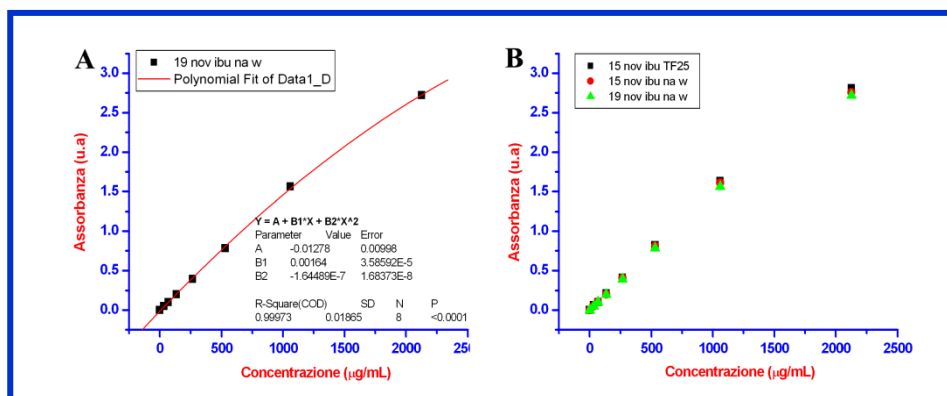


Figura 3.19. Retta di Ibu Na in WMQ con nuova madre (Fig. 3.16.A) e confronto con precedenti (Fig. 3.16.B)

La Tabella 3.9 descrive i risultati ottenuti dalle diverse prove effettuate: i campioni n. 1 e 3 sono stati costituiti con 200/300 µL di IbuNa portati a 2,5 mL di volume con WMQ, i campioni n. 2 e 4 sono stati essiccati in stufa e risospesi in 2,5 mL di WMQ, i campioni n. 5-6 sono stati trattati con il metodo Spe ma simulando la filtrazione.

Come dati matematici sono state mostrate le concentrazioni teoriche, quelle effettivamente ottenute e la percentuale di recupero.

Tabella 3.9 Risultati dell'IbuNa in WMQ e in TF25 testato nelle tre condizioni

Campione	Metodo	IbuNa (µg/mL)		Recupero farmaco (%)
		Teorica	Trovata	
1	300 Ibu in WMQ + WMQ*	2040	2045	100,3
2	300 Ibu in TF25 seccato**	2040	1367	67,0
3	200 Ibu in WMQ + WMQ*	1360	1385	101,8
4	200 Ibu in TF25 seccato**	1360	1938	142,5
5	Spe Ibu Na I***	850	1195	140,6
6	Spe Ibu Na II***	567	2618	461,7

* 200+2300/300+2200 senza passaggio stufa

** 200/300 µL seccati e risospesi in 2,5 mL di WMQ

*** trattati come spe ma filtrazione simulata

Dalla Tabella 3.9 emerge che dal trattamento che salta l'essiccazione in stufa (camp. 1, 3) sono state ottenute delle percentuali che si avvicinano parecchio al 100% nonostante lo superino leggermente in entrambi i metodi.

I campioni n. 2 e 4 che sono stati essiccati, invece, mostrano un recupero del 67 % col metodo I e del 142,5 % col metodo II. Tali percentuali sono molto strane soprattutto se si considera che non sono stati utilizzati gli acidi della soluzione precipitante, ma si è semplicemente seccato e risospeso. Il recupero del farmaco è maggiormente anomalo

nei campioni n. 5 e 6 che sono stati trattati con la precipitazione offline e per i quali sono state trovate delle percentuali del 140,6 e 461,7 % rispettivamente per il metodo I e per il metodo II. È stato ottenuto un risultato senza alcun senso logico perché si è quantificato più farmaco di quello realmente utilizzato.

In seguito ai risultati registrati è stato effettuato un esperimento utilizzando sia l'IbuNa in WMQ che quello in TF25 a diverse condizioni: eseguendo una semplice diluizione del campione e raggiungendo il volume finale di 2,5 mL con WMQ (camp. n.1-4), essiccando i campioni e risospingendoli con 2,5 mL di WMQ (camp. n. 5-8) ed infine trattando il campione col metodo Spe ma simulando la filtrazione (camp. n. 9-12).

I risultati illustrati nella Tabella 3.10 evidenziano, innanzitutto, una scarsa ripetibilità dei dati. Infatti nei primi quattro campioni in cui le condizioni sono le stesse, a parte il volume del campione e la composizione della soluzione madre in WMQ o in TF25, non sono state ottenute le stesse percentuali. Si oscilla, infatti, dal 92,6 al 100,2 % per il metodo I e dal 99,6 al 88 % per il metodo II. Inoltre i risultati non sono uguali a quelli mostrati in Tabella 3.9 (camp. n. 1, 3).

Per i campioni n. 5-8, che sono stati seccati e risospesi, la situazione è molto simile: si passa da una quantificazione superflua del 4,6 al 94,2 % per il metodo I, al 97,9 e 100,6 % per il metodo II.

I campioni che sono stati trattati col metodo Spe invece, mostrano altrettanta variabilità, infatti, è stato ottenuto un recupero del 70 e 22,5 % per il metodo I e 33,2 e 45 % per il metodo II. Infine è possibile constatare che, nell'insieme, i risultati ottenuti non mettono in evidenza alcuna costante.

L'esperimento qui appena commentato è stato realizzato mediante l'utilizzo delle micropipette a volume variabile Eppendorf, ed è stato ripetuto lo stesso identico esperimento per testare l'utilizzo delle micro pipette a volume variabile Gilson, per verificare se il problema potesse essere la calibrazione di tali strumenti ed il conseguente prelievamento di diverse concentrazioni di farmaco.

Tabella 3.10 Risultati dell'IbuNa in WMQ e in TF25 nelle tre diverse condizioni (Eppendorf)

Campione	Metodo	IbuNa ($\mu\text{g/mL}$)		Recupero farmaco (%)
		Teorica	Trovata	
1	300 Ibu in WMQ + WMQ*	2040	1888	92,6
2	300 Ibu in TF25 + WMQ*	2040	2045	100,2
3	200 Ibu in WMQ + WMQ*	1360	1354	99,6
4	200 Ibu in TF25 + WMQ*	1360	1197	88,0
5	300 Ibu in WMQ seccato**	2040	2134	104,6
6	300 Ibu in TF25 seccato**	2040	1921	94,2
7	200 Ibu in WMQ seccato**	1360	1332	97,9
8	200 Ibu in TF25 seccato**	1360	1368	100,6
9	Spe Ibu Na WMQ I***	850	595	70,0
10	Spe Ibu Na WMQ II***	567	188	33,2
11	Spe Ibu Na TF25 I***	850	192	22,5
12	Spe Ibu Na TF25 II***	567	255	45,0

La Tabella 3.11 descrive i risultati ottenuti dai diversi trattamenti dell'Ibu Na in WMQ e in TF25. È possibile notare la concentrazione teorica, la concentrazione trovata in seguito alla conversione dell'assorbanza a 265 nm in concentrazione e nell'ultima colonna a destra è presente la percentuale di recupero del farmaco.

I risultati ottenuti dall'esperimento eseguito con le Gilson non mettono in evidenza alcun miglioramento eclatante della quantificazione del farmaco d'interesse. Le percentuali trovate dei campioni n. 1-8 appaiono sicuramente superiori a quelle viste in Tabella 3.8, ma tendono comunque ad eccedere oltre al 100%, quantificando quindi una concentrazione di IbuNa superiore a quella utilizzata.

Le percentuali ottenute dal metodo Spe (camp. n. 9-12) risultano essere sempre non ripetibili e senza una costante comune.

Nel tentativo di cercare di dare un senso alla variabilità finora riscontrata, sono state effettuate sei repliche di ciascun campione presente nelle Tabelle 3.10 e 3.11.

Tabella 3.11 Risultati dell'IbuNa in WMQ e in TF25 nelle tre diverse condizioni (Gilson)

Campione	Metodo	IbuNa ($\mu\text{g/mL}$)		Recupero farmaco (%)
		Teorica	Trovata	
1	300 Ibu in WMQ + WMQ*	2040	1956	95,9
2	300 Ibu in TF25 + WMQ*	2040	2280	111,8
3	200 Ibu in WMQ + WMQ*	1360	1400	102,9
4	200 Ibu in TF25 + WMQ*	1360	1414	104,0
5	300 Ibu in WMQ seccato**	2040	2224	109,1
6	300 Ibu in TF25 seccato**	2040	1963	96,2
7	200 Ibu in WMQ seccato**	1360	1373	101,0
8	200 Ibu in TF25 seccato**	1360	1344	98,8
9	Spe Ibu Na WMQ I***	850	143	16,8
10	Spe Ibu Na WMQ II***	567	164	29,0
11	Spe Ibu Na TF25 I***	850	694	81,7
12	Spe Ibu Na TF25 II***	567	133	23,5

La Figura 3.20 rappresenta il risultato ottenuto dalle ripetizioni di ciascun campione. Nella Figura 3.20.A è mostrato l'istogramma ottenuto dalla media delle repliche effettuate il giorno in cui è stato eseguito l'esperimento, corredato di deviazioni standard. Il giorno successivo i campioni sono stati vortexati ulteriormente e sono state ripetute le analisi spettrofotometriche (Fig. 3.20.B). Infine, la Figura 3.20.C rappresenta il confronto della quantificazione del farmaco nei due giorni di analisi.

Dai risultati rappresentati in Figura 3.20.A è evidente la differenza di variabilità in presenza e non della soluzione precipitante acida prevista dal protocollo. Infatti, nei primi quattro campioni che non hanno subito il trattamento con l'acform la deviazione standard è molto bassa, mentre negli ultimi quattro è molto evidente soprattutto nell'IbuNa in TF25 trattato col metodo I.

Avendo avuto il presentimento che il deposito presente sul fondo del tubo in seguito all'essiccazione non si fosse completamente disciolto nel corso della risospensione in WMQ, il giorno successivo i campioni sono stati vortexati per 5-10 minuti ed è stata ripetuta l'analisi allo spettrofotometro UV-Vis.

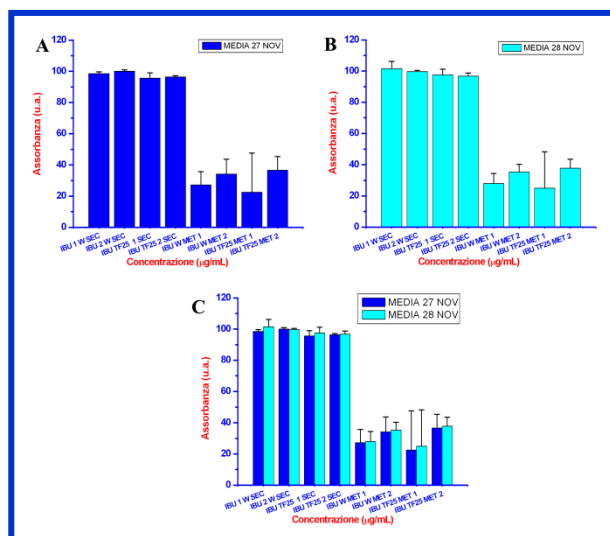


Figura 3.20. Ripetizione di repliche $n=6$ per ciascun trattamento dell'ibuNa in WMQ e TF25

Come è possibile osservare in Figura 3.20.B, ma in modo più immediato in Figura 3.20.C, la ripetizione non ha modificato o aumentato in modo significativo il recupero del farmaco. Si nota un leggero aumento del recupero ma a spese di un aumento consistente della deviazione standard.

In Tabella 3.12 sono mostrate le medie delle concentrazioni di farmaco quantificate nei campioni ($n=6$) e le percentuali di recupero.

I dati descritti in Tabella 3.12 evidenziano una netta differenza di recupero tra i campioni n. 1-4 e quelli trattati con la soluzione precipitante (camp. n. 5-8). Se si prendono in considerazione i primi quattro campioni, è possibile notare che il recupero appare leggermente più alto per il campione sciolto in WMQ, mentre paragonando i due metodi è possibile affermare che tendono ad equivalersi. Negli ultimi quattro campioni, invece, è stato ottenuto un crollo del recupero del farmaco che si aggira intorno al 30 % ca., con un leggero aumento con l'utilizzo del metodo II. Concludendo è possibile affermare che non è stata ottenuta alcuna ripetibilità.

Al termine di queste prove è stato provveduto alla misurazione del pH dei campioni trattati per verificare se magari il problema del recupero totale del farmaco potesse risiedere nella acidità/basicità del campione.

Tabella 3.12 Risultati delle ripetizioni dei campioni (n=6) con pipette Gilson

Campione	Metodo	IbuNa ($\mu\text{g/mL}$)		Recupero farmaco (%)
		Teorica	Trovata	
1	Ibu Na in WMQ I secco	2040	2009,1	98,5
2	Ibu Na in TF25 I secco	2040	1950,3	95,6
3	Ibu Na in WMQ II secco	1360	1361,2	100,1
4	Ibu Na in TF25 II secco	1360	1311,2	96,4
5	Ibu Na in WMQ Spe I	850	231,4	27,2
6	Ibu Na in WMQ Spe II	567	194,0	34,2
7	Ibu Na in TF25 Spe I	850	191,3	22,5
8	Ibu Na in TF25 Spe II	567	207,3	36,6

La Tabella 3.13 illustra il valore del pH dei campioni trattati secondo i diversi metodi utilizzati finora.

Tabella 3.13 Misurazione pH

Campione	Metodo	pH
1	Ibu Na in WMQ I secco	6,64
2	Ibu Na in TF25 I secco	6,81
3	Ibu Na in WMQ Spe I	4,70
4	Ibu Na in WMQ Spe II	4,80
5	Ibu Na in TF25 Spe I	4,45
6	Ibu Na in TF25 Spe II	4,90

I valori ottenuti dalla misurazione del pH (Tab. 3.13) non mostrano alcuna anomalia, ma per essere sicuri è stato scelto un campione random delle batterie analizzate ed è stato trattato con NaOH 0,5 M. Al campione sono state aggiunte un numero di gocce di base tale da far in modo che il pH fosse 7. In seguito è stato ripetuto lo spettro ed è stata ricalcolata la concentrazione di farmaco recuperata. Il risultato ottenuto è stata una percentuale del 33 %, rispetto al 24 % ottenuto precedentemente senza alterare il pH del campione.

In letteratura sono stati trovati dei lavori che esaltano i vantaggi dell'utilizzo delle HybridSpe. È da sottolineare che risulta essere più frequente l'utilizzo delle piastre da 96 pozzetti al posto delle cartucce da noi prescelte [22]. Moriarty *et al.* [21] hanno eseguito

degli esperimenti a tal proposito utilizzando dei campioni di plasma nei quali sono andati ad identificare sostanze come serotonina, dopamina e melatonina. Durante i loro studi hanno utilizzato volumi inferiori di campione e di soluzione precipitante rispetto ai nostri, testando, come nel nostro caso, il metodo dell'acetonitrile e del metanolo combinati con l'acido formico. Addirittura hanno dimostrato un recupero migliore utilizzando entrambi i solventi contemporaneamente. I loro risultati sono stati parecchio soddisfacenti esaltando un recupero del farmaco molto vicino al 100%. Pertanto, visti i nostri risultati sarebbe opportuno testare i due metodi utilizzati apportando delle modifiche al nostro protocollo: facilitando la precipitazione offline da una breve centrifuga in minispin della durata di 10 minuti, evitando la fase di essiccamento in stufa, che potrebbe alterare qualche componente della soluzione e la seguente risospensione, ed analizzando direttamente il campione raccolto in seguito alla filtrazione. In questo modo si escluderebbero variabili importanti che potrebbero alterare il recupero del farmaco da quantificare.

3.5.2.3 Metodica del Folch

Per quanto riguarda l'estrazione dei lipidi e delle proteine sono diffusi in letteratura diversi metodi utilizzati, ma in generale i più comuni risultano essere quelli caratterizzati dallo sfruttamento delle capacità estrattive dei solventi organici.

In linea di principio, il solvente o la miscela di solventi usato deve essere adeguatamente polare per rimuovere i lipidi dalla loro associazione con le membrane cellulari e costituenti dei tessuti, ma anche non così polare da non permettere al il solvente di dissolvere rapidamente tutti i trigliceridi e gli altri lipidi apolari [23].

Folch et al. è stato uno dei primi a riconoscere questo e sviluppare il sistema fase di cloroformio/metanolo/acqua (il cosiddetto metodo "Folch"), che, sotto varie modifiche, continua a essere considerato il metodo più classico e più affidabile per l'estrazione di lipidi [23].

Pertanto, la deproteinizzazione della cute è stata realizzata anche attraverso l'utilizzo della metodica del Folch (Par. 3.4.3.5) con la quale è possibile separare i lipidi e le proteine utilizzando una miscela di CHCl_3 e MeOH in rapporto di 2:1. La separazione delle fasi si verifica nel momento dell'aggiunta di un volume di WMQ pari a quella del MeOH. Ciò che si ottiene è una fase inferiore costituita da CHCl_3 ed una superiore nella quale si sarà ripartito il MeOH con l'WMQ. I lipidi e le proteine si dovrebbero posizionare nella fase inferiore.

Dopo aver preparato la cute disciolta in Collagenase come descritto nel Paragrafo 3.4.2 sono stati preparati tre diversi campioni: il primo composto da 0,5 mL di cute in collagenase e 0,5 mL di IbuNa in WMQ; il secondo costituito da 0,5 mL di Collagenase e

D-BPS e da 0,5 mL di IbuNa in WMQ; infine il terzo era solamente cute in Collagenase, che è stato considerato il bianco del primo campione. Dopo qualche minuto di spipettamento, 0,5 mL del campione (1 mL) sono stati messi a contatto con la soluzione Folch (8 mL di cloroformio e 4 mL di MeOHe 4 mL WMQ) e sono stati seguiti tutti i vari passaggi come descritto nel Paragrafo 3.4.3.5.

Successivamente, sono stati eseguiti gli spettri delle due fasi di ciascun campione per andare a monitorare in quale delle due si fosse distribuito il farmaco d'interesse.

La Figura 3.21.A mostra la sovrapposizione degli spettri ottenuti dalla fase metanolica, mentre nella Figura 3.21.B è rappresentata la fase cloroformica dei tre campioni analizzati.

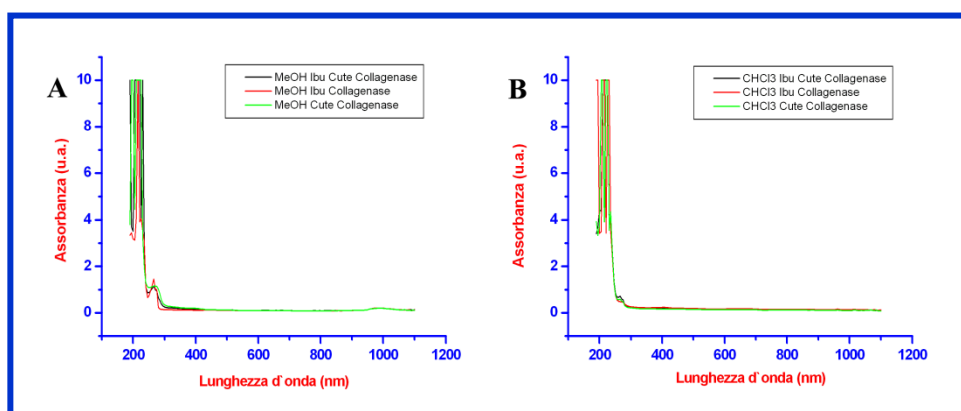


Figura 3.21. Spettri tal quali della fase metanolica (A) e della fase cloro formica (B)

Se si analizzano gli spettri ottenuti è possibile notare che nella Figura 3.21.A è evidente un picco a 265 nm abbastanza consistente, ma sorprende che ci sia un assorbimento simile anche nel campione di cute in Collagenase (verde) che non contiene il farmaco. È ipotizzabile che sia presente qualche sostanza che assorbe alla stessa lunghezza d'onda dell'IbuNa.

Nella Figura 3.21.B sono apprezzabili dei picchi nella nostra regione d'interesse anche se di minor intensità. È necessario approfondire se si tratti del farmaco che si è distribuito anche nella fase metanolica o si tratti di altre sostanze presenti nella soluzione che interferiscono.

Per tale motivo nell'esperimento successivo sono stati allestiti dei campioni che rappresentassero i bianchi dei veri campioni di interesse per evitare di considerare anche altre sostanze nella quantificazione del farmaco.

Dal valore di assorbanza fornito dallo spettrofotometro si è ottenuta la concentrazione del farmaco attraverso l'utilizzo della curva di calibrazione.

La Tabella 3.14 mostra i risultati ottenuti dall'esperimento, le concentrazioni attese e le percentuali di farmaco recuperato rispetto al 100 %.

Tabella 3.14 Quantificazione Ibu Na nelle due fase del Folch

Campione	Metodo	Concentrazione ($\mu\text{g/mL}$)			Recupero (%)	
		Teorica	Trovata		metanolo	cloroformio
			metanolo	cloroformio		
1	Ibu Na cute	531	638,4	346,5	120,2	65,3
2	Ibu Na collag.	944	901,2	268,4	95,5	28,4
3	Cute Col	-	611,6	180,2		

I valori registrati si sono rivelati alquanto strani, infatti, non è stata ottenuta una netta localizzazione del farmaco nella fase metanolica, nonostante la percentuale di recupero sia più alta che nella fase cloroformica. Inoltre, se si considera la somma delle concentrazioni ottenute nelle due diverse non si raggiunge il 100 % atteso.

Ciò che è stato osservato nello spettro del campione di cute in Collagenase (in verde) è stato confermato anche dalla quantificazione, in quanto è osservabile un'assorbanza di 611,6 nm nella fase metanolica.

In seguito ai risultati ottenuti è stato ripetuto l'esperimento prendendo in considerazione anche i bianchi dei campioni.

Per il campione n. 1 sono stati pipettati, in una provetta eppendorf, 0,5 mL di soluzione di Collagenase e 0,5 mL di WMQ che mima l'IbuNa del campione n. 2 dell'esperimento precedentemente (Tab. 3.14). Il campione n. 2 è invece, costituito dal farmaco sciolto in WMQ (0,5 mL) e da WMQ. Infine, il campione n. 3 rappresenta il bianco del campione n. 2, essendo costituito esclusivamente da WMQ. I tre campioni sono stati spipettati per qualche minuto per favorire la loro completa miscelazione. Successivamente, 0,5 mL del loro volume sono stati trattati con la soluzione Folch (Par. 3.4.3.5) ed è stato eseguito lo spettro sia della fase metanolica che di quella cloroformica.

La Figura 3.22 mostra gli spettri tal quali ottenuti dallo spettrofotometro, nella Figura 3.22.A è presente la fase metanolica dei campioni mentre nella 3.22.B quella cloroformica.

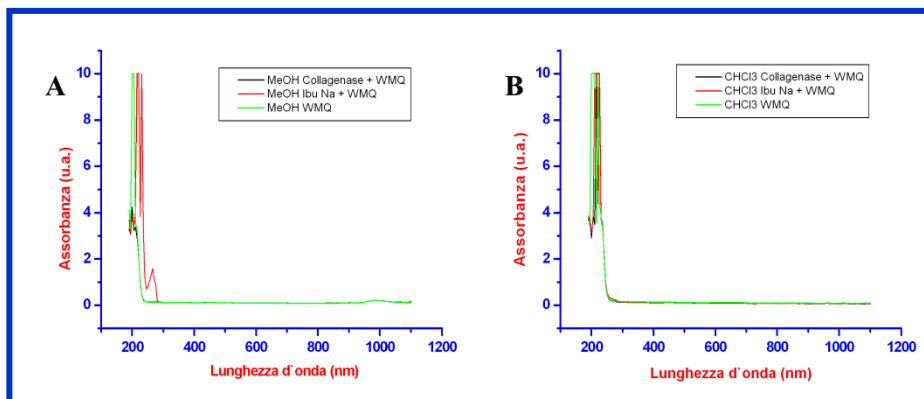


Figura 3.22. Spettri tal quali della fase metanolica (A) e della fase cloro formica (B)

Da un primo colpo d'occhio si nota un unico picco nella regione di interesse esclusivamente nella fase metanolica del campione n. 1 come erano le nostre previsioni.

Per un'analisi ancora più precisa ed approfondita, è stata eseguita un'operazione di azzeramento degli spettri, decidendo di far partire entrambi gli spettri dai 350 nm.

La Figura 3.23.A mostra l'azzeramento della fase metanolica e la 3.23.B della fase cloroformica.

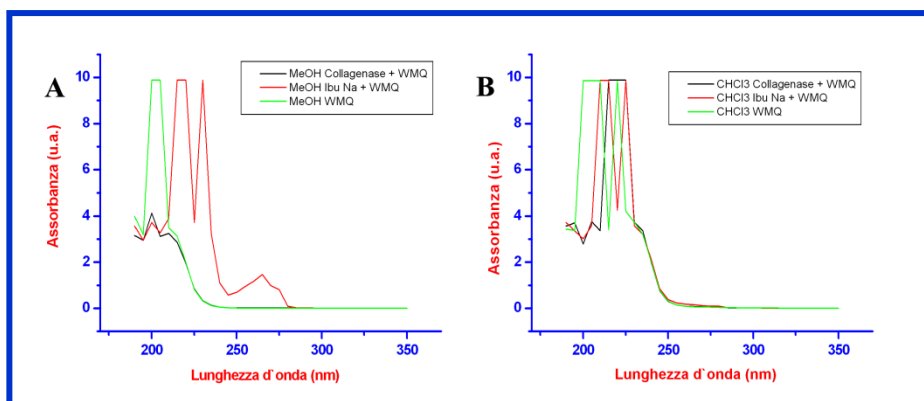


Figura 3.23. Spettri azzerati della fase metanolica (A) e della fase cloro formica (B)

Gli spettri così elaborati confermano la presenza del farmaco nella fase metanolica (Fig. 3.23.A), nonostante il picco appaia con una forma non perfettamente simmetrica.

Prendendo in considerazione i campioni costituiti ed analizzati in questo esperimento e in quello precedente, è stato possibile eseguire anche un'ulteriore operazione di normalizzazione. A ciascun campione è stata sottratta l'assorbanza del rispettivo bianco ed è stato costruito in questo modo lo spettro normalizzato (Fig. 3.24).

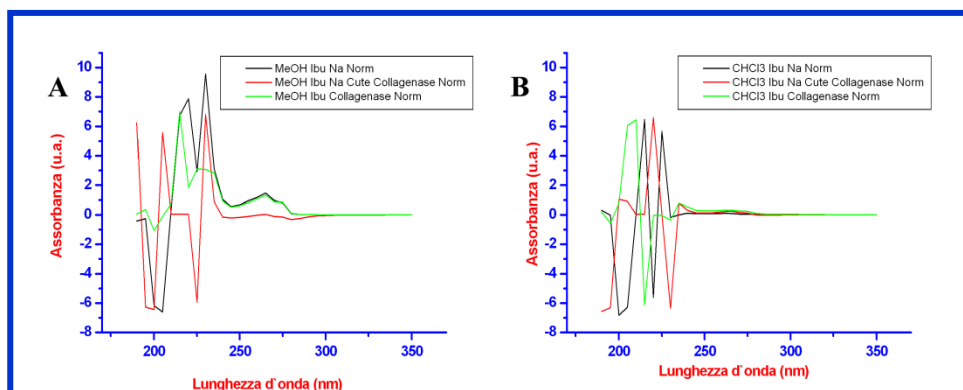


Figura 3.24. Spettri normalizzati della fase metanolica (A) e della fase cloroformica (B)

Dalla Figura 3.24.A si nota una forma del picco costante in tutti e tre i campioni, con una sovrapposizione dell'IbuNa in WMQ e dell'IbuNa in Collagenase, mentre l'assorbanza del farmaco con la cute in Collagenase sembra essere molto basso.

Per quantificare nel modo migliore il farmaco recuperato sono state calcolate le vere concentrazioni ottenute e confrontate con quelle teoriche.

Nella Tabella 3.15 vengono riportate le concentrazioni di farmaco recuperate in seguito all'esperimento prendendo in considerazione l'assorbanza del campione che è stato precedentemente normalizzato, ossia gli è stato sottratto il proprio bianco (WMQ, Collagenase, cute in Collagenase rispettivamente per i campioni n.1, 2, 3).

Tabella 3.15 Quantificazione dell'Ibu Na nei campioni normalizzati

Campione	Metodo	Concentrazione ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			Recupero (%)	
		Teorica	Trovata		metanolo	cloroformio
			metanolo	cloroformio		
1	Ibu Na in WMQ	1000	1004,1	68,5	100,4	6,4
2	Ibu Na collag.	531	890,9	219,6	94,4	23,3
3	Ibu Na Cute Col	944	34,35	171,2	6,5	32,3

Le percentuali di recupero elencate nella Tabella 3.15 mostrano un 100 % per il campione n. 1 ottenuto nella fase metanolica, ma inaspettatamente è stato ottenuto anche un 6,4 % nella fase cloroformica. Per il campione n. 2 è stata ottenuta una percentuale abbastanza elevata del 94 %, ma anche in questo caso, se si considera il recupero nella fase cloroformica non si ottiene il 100 % teorico. Nel campione n. 3 il risultato ottenuto non è stato dei migliori, è stata infatti, quantificata una concentrazione bassissima (6,5 %) nel metanolo e una concentrazione del 32,3 % nella fase cloroformica.

È stato ipotizzato che il problema della quantificazione potesse essere dovuto ai tubi in plastica che si stavano utilizzando, pensando ad una possibile reazione del cloroformio con la plastica. Per questo motivo si è passato all'utilizzo di tubi in vetro, della capacità 10 mL. In conseguenza del loro volume massimo sono state modificate le quantità dei solventi da utilizzare mantenendo sempre costanti i rapporti (4 mL cloroformio-2 mL di metanolo- 2 mL di WMQ).

L'esperienza è stata ripetuta utilizzando queste nuove condizioni e dimezzando di conseguenza anche il volume del campione, riducendolo da 0,50 mL a 0,25 mL.

Sono stati dunque, preparati i campioni come nell'esperienza precedente includendo anche i rispettivi bianchi: IbuNa in WMQ e il suo bianco costituito solo da WMQ, IbuNa con Collagenase e il bianco di sola Collagenase e WMQ ed infine, l'IbuNa in cute in Collagenase per il quale il suo bianco era costituito da cute in Collagenase e WMQ.

In seguito, sono stati eseguiti gli spettri delle fasi metanolica e cloroformica.

La Figura 3.25 rappresenta l'analisi tal quale dei campioni analizzati all'UV-Vis.

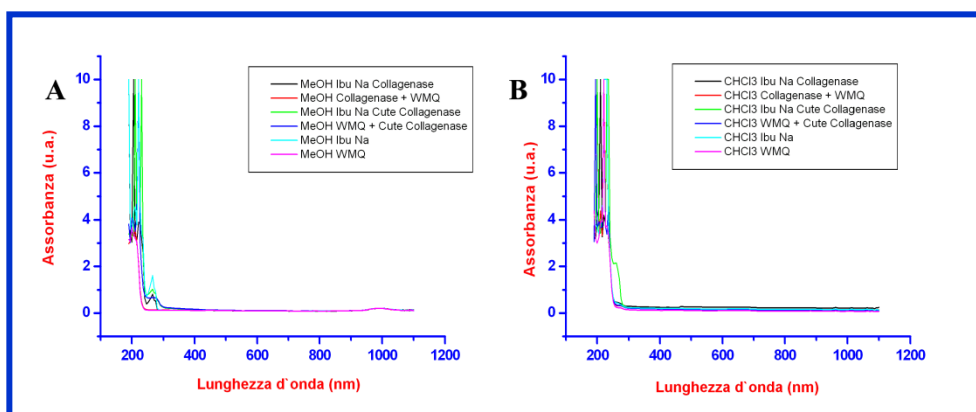


Figura 3.25. Spettri tal quali della fase metanolica (A) e della fase cloro formica (B)

Dagli spettri è possibile osservare che nella Figura 3.25.A, che rappresenta la fase metanolica, dei picchi evidenti per l'IbuNa in WMQ, l'IbuNa con Collagenase, ed infine per l'IbuNa in cute e Collagenase. Per i rispettivi bianchi lo spettro appare decisamente piatto, fatta eccezione per la cute in Collagenase che evidenzia un'assorbanza nella regione di assorbimento dell'IbuNa. Mentre nella fase cloroformica (Fig. 3.22.B) gli spettri sembrano essere tutti abbastanza piatti tranne il campione in verde che mostra un una sorta di spalla differente dagli altri.

Come fatto nell'esperienza precedente si è proseguito con l'azzeramento degli spettri e la relativa normalizzazione per far in modo che venisse più semplice e immediato analizzare il comportamento del farmaco d'interesse.

La Figura 3.26.A rappresenta la sovrapposizione della fase metanolica dei campioni azzerati, la Figura 3.26.B mostra la fase cloroformica del'azzeramento degli spettri,

mentre la Figura 3.26.C e 3.26.D mostrano gli spettri normalizzati dei tre campioni nella loro fase metanolica e cloroformica rispettivamente.

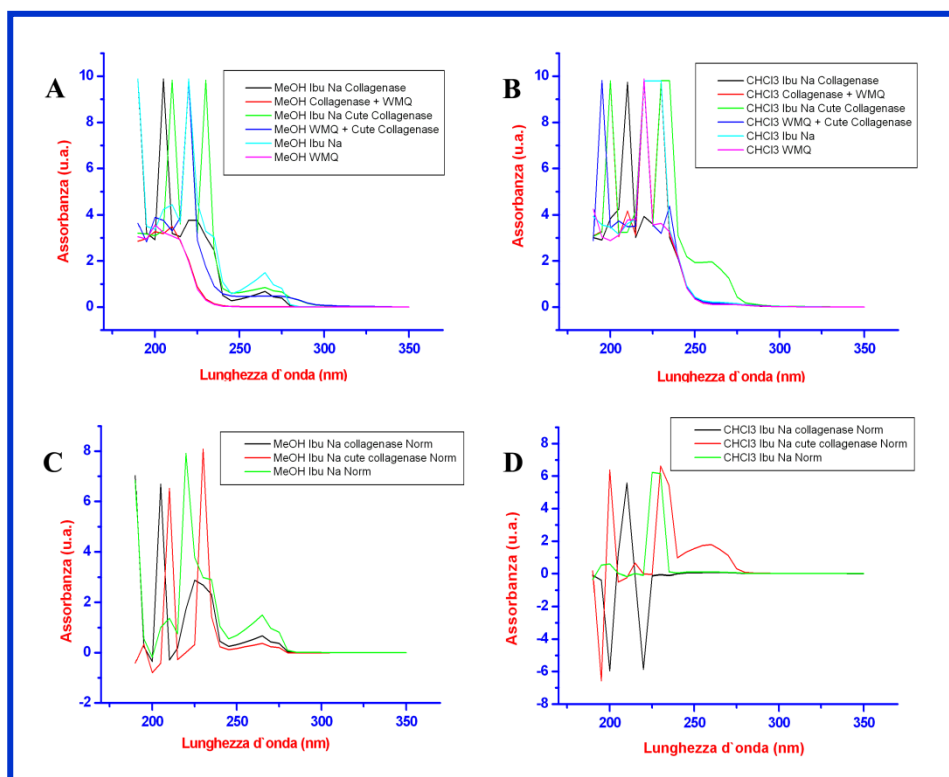


Figura 3.26. Spettri azzerati e normalizzati della fase metanolica (A e C) e della fase cloro formica (B e D)

Dall'azzeramento degli spettri (350 nm) è confermato quanto descritto su quelli tal quali, infatti appare maggiormente evidente l'assorbimento intorno ai 265 nm della cute in Collagenase nella fase metanolica (Fig. 3.26.A) e dell'IbuNa con cute e Collagenase nella fase cloroformica (Fig.3.26.B).

La normalizzazione della fase metanolica (Fig. 3.26.C) mette in evidenza i picchi dei tre campioni, che mostrano un'assorbanza differente, mentre ci si attendeva una concentrazione identica per i campioni in rosso e in nero. La fase cloroformica normalizzata (Fig. 3.26.D) invece fa ipotizzare un'assenza totale di farmaco in tutti i campioni a parte la stranezza del campione dell'IbuNa con cute e Collagenase.

Se si passa all'analisi concreta dei dati per quantificare il farmaco presente in ciascuna delle due fasi si ottengono i valori descritti in Tabella 3.16, nella quale vengono rappresentate le concentrazioni teoriche, quelle trovate e la percentuale di recupero nelle due fasi di separazione.

Tabella 3.16 Quantificazione dell'IbuNa normalizzato nelle tre condizioni

Campione	Metodo	IbuNa ($\mu\text{g/mL}$)			Recupero (%)	
		Teorica	Trovata		metanolo	cloroformio
			metanolo	cloroformio		
1	Ibu Na in WMQ	1000	1024,0	75,6	102,4	7,1
2	Ibu Na collag.	500	438,0	63,3	87,6	11,9
3	Ibu Na Cute Col	500	244,6	1028,2	48,9	193,6

I risultati in Tabella 3.16 mostrano un andamento molto simile all'esperimento precedente, infatti, sembrerebbe che il campione n. 1 si ripartisca totalmente nella fase metanolo-WMQ, nonostante si quantifichi una piccola percentuale anche nel cloroformio eccedendo dal 100%. Nel campione n. 2 il recupero del farmaco nel metanolo è leggermente inferiore (87,6 %), ma se si somma a quello riscontrato nel cloroformio (11,9 %), si ottiene un 99,5 % che acquisterebbe un senso logico. Nel campione n. 3 le quantificazioni ottenute risultano essere parecchio anomale in quanto è stato quantificato un 48,9 % nel metanolo e un 193,6 % nel cloroformio.

L'analisi dei dati ottenuti dagli esperimenti realizzati portano alla conclusione che l'ipotesi iniziale riguardante la distribuzione dell'IbuNa nella fase metanolica possa essere corretta. Nonostante questo, resta scontata la necessità di approfondire la ripartizione del farmaco eseguendo dei replicati utilizzando della cute appena degradata per essere sicuri dell'efficacia del metodo. Inoltre, sarebbe opportuno eseguire delle ulteriori analisi per determinare esattamente cosa rappresenti il picco anomalo riscontrato nella fase cloroformica che non sembra assomigliare ad un vero e proprio picco corrispondente all'IbuNa. Infine, potrebbe essere produttivo effettuare delle prove modificando la miscela organica. In letteratura sono stati trovati, infatti, dei lavori nei quali al cloroformio viene preferito il diclorometano, in quanto considerato un solvente meno pericoloso, con meno restrizioni e svantaggi per il suo utilizzo, indipendentemente dal tipo di campione da analizzare [24]. In altri casi invece la miscela organica utilizzata risulta essere composta da esano ed isopropanolo [25].

Concludendo, è possibile affermare che la metodica proposta potrebbe realmente mostrarsi efficace per l'eliminazione delle proteine e dei lipidi dai campioni d'interesse.

4

Hplc

4.1 Introduzione

Un ulteriore obiettivo preposto in questa tesi è stato quello di individuare e validare una metodica di separazione cromatografica adatta ai campioni ottenuti dall'esperimento di veicolazione transdermica, considerando un trattamento minimo del campione.

In questo capitolo vengono elencati i materiali e gli strumenti utilizzati per la messa a punto del metodo di separazione cromatografica. Vengono anche descritte le metodiche e le modalità di allestimento degli esperimenti condotti.

4.2 Materiali

Prodotti chimici. Tutti i prodotti chimici utilizzati sono stati conservati come prescritto dal produttore, ed utilizzati senza nessuna ulteriore purificazione o reazione chimica. Laddove questa frase non fosse soddisfatta, sarà indicato nel testo la motivazione e l'accorgimento attuato. I prodotti chimici usati sono: due lotti di ibuprofene sale sodico (IbuNa), di cui il primo è stato aperto il 1/12/2009 (100%, Sigma-Aldrich) mentre il secondo lotto il 31/05/2012 (100%, Sigma-Aldrich), il diclofenac sale sodico (DicloNa, 99%, Sigma-Aldrich), il fosfato di potassio monobasico (KH_2PO_4 , 99,9%, Fluka), il fosfato di potassio dibasico (K_2HPO_4 , 99%, Riedel-de Haën), l'acido cloridrico (HCl, 37,9% w/w, Sigma-Aldrich), l'idrossido di sodio (NaOH, 98% w/w, Sigma-Aldrich), l'acido formico (AcFor, 98 - 100%, Sigma-Aldrich), le compresse di sodio e potassio cloruro e tampone fosfato (PBS-T, Sigma-Aldrich), il pentaossido di fosforo (min. 98,5%, Sigma-Aldrich), il gel di silice (perle arancioni, Kraemer & Martin GmbH), la soluzione tampone a pH 4 (J.T. Baker), la soluzione tampone a pH 7

(Radiometer Copenhagen), e le soluzioni elettrolitiche KCl 3M - satura in AgCl (per la sonda 423, Mettler Toledo, GmbH) e KCl 3M (per la sonda 412, Mettler Toledo, GmbH).

Inoltre, sono stati utilizzati anche dei reagenti specifici per le analisi in cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC). Questi sono: il fosfato di potassio monobasico ($\text{c-KH}_2\text{PO}_4$, 100,1%, Fluka), il fosfato di potassio dibasico ($\text{c-K}_2\text{HPO}_4$, 100%, Sigma-Aldrich), l'acqua (c-WMQ , Sigma-Aldrich, n. cat. 34877, lotto BCBH6451V), l'acetoni-trile (ACN, grado gradiente, J.T. Baker, n. cat. 9012, lotto 1032222019), il metanolo (MeOH, grado gradiente, J.T. Baker, n. cat. 8402, lotto 1115012003), il 2-propanolo (iPrOH, J.T. Baker, n. cat. 8175, lotto 1019614004), e il tetraidrofurano (THF, J.T. Baker, n. cat. 9441, lotto 1034302033).

Laddove venga indicato "a temperatura ambiente", se non altrimenti specificato, deve intendersi "ad una temperatura compresa tra i 22° e i 25°C".

Altro. Inoltre, sono stati utilizzati: matracci di varie misure, beaker, vetrini da orologio, spatole, microtubi da centrifuga in plastica da 1,5 mL (microprovette), tubi da centrifuga in polipropilene da 50 mL (provette da 50), bottiglie in plastica di volumi variabili sino a 500 mL, puntali per micropipette da 20, 200 e 1000 μL (Eppendorf o Gilson), pipette graduate in vetro da 10 mL, pipette Pasteur, vials per HPLC, bottiglie di vetro da 1 L (Duran), carta da pesata (Wägebapier MN 226, Macherey-Nagel), imbuto filtrante in vetro da utilizzare collegato al sistema sotto vuoto (Whatman™), filtri in microfibra di vetro (cut-off: 0,7 μm , Ø 47 mm, Whatman™), filtri in nylon (Magna; cut-off: 0,22 μm , Ø 47 mm, GE Water & Process Technologies), imbuto filtrante sterile con filtro in acetato di cellulosa (cut-off: 0,22 μm , Corning), filtri a siringa di due marche ((1) Acrodisc; cut-off: 0,2 μm , Ø 13 mm, Pall Life Sciences; (2) cut-off 0,2 μm , Ø 13 mm, Whatman™) e siringhe in plastica complete di ago metallico (10 mL, Pic Indolor), carta verde filtrante speciale per la sterilizzazione (carta verde, Steri-Green™, 3M Health Care).

Tutta la vetreria destinata all'utilizzo nelle analisi in cromatografia ad alta pressione è stata accuratamente lavata con acqua saponata, risciacquata con acqua di fonte, e successivamente con acqua distillata o con acqua Milli-Q (WMQ); solo occasionalmente è stata risciacquata in ultimo con iPrOH. Tutti gli oggetti in plastica riutilizzabili sono stati lavati con acqua e detersivo, risciacquati con acqua di fonte, e successivamente con acqua distillata o con WMQ; gli aghi metallici delle siringhe sono stati lavati con EtOH.

Protezione. Le soluzioni contenenti HCl e NaOH, usate per aggiustare il pH dei tamponi ed in generale tutti i solventi organici, sono stati maneggiati sotto cappa chimica. L'operatore ha sempre utilizzato i dispositivi di protezione personale quali: camice, guanti in nitrile, e calzature di sicurezza.

4.3 Strumenti

Gli strumenti utilizzati per la realizzazione di questa tesi sono i seguenti: un sistema per la produzione di WMQ (Labo Star 7TWF-DI/UV, Siemens), una bilancia analitica sensibile alla quarta cifra decimale (ABS 120-4, Kern), un pH-metro con sonda termometrica incorporata (pH 5/6, Eutech Instruments Pte Ltd.) ed equipaggiato con due elettrodi combinati (InLab[®] 423 o InLab[®] 412, Mettler Toledo), un agitatore magnetico (F60, Falc), una stufa termoventilata (FD53, Binder GmbH), una stufa non ventilata (E28, Binder GmbH), una pompa da vuoto (duo 2,5 A, Pfeiffer), una centrifuga (Heraeus Megafuge 11 R, Thermo Scientific, Waltham), alcune micropipette a volume variabile da 20, 200, e 1000 μ L (Eppendorf e Gilson), un pipettatore (Accu-Jet, Brand), un vortex (GVlab, Gilson), uno spettrofotometro UV-Vis a singolo raggio (Cary UV-Vis, Varian), una cuvetta in quarzo (QS 1000 μ L, cammino ottico: 1 cm, Hellma), un rifrattometro di Abbe (Atago co. Ltd), un apparecchio per la misurazione del punto di fusione (SMP11, Stuart), uno spettrofotometro NMR operante a 500 MHz (Unity 500, Varian), uno spettroscopio IR (Vector-22, Bruker), un cromatografo liquido ad alta pressione (HPLC; LC-2010 CHT, Shimadzu) equipaggiato con una colonna cromatografica (EC 150/4,6 NUCLEODUR[®] 100-5 C18 ec, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) per la quale sono state utilizzate due colonne di guardia (EC 4/3 NUCLEODUR[®], 100-5 C18 ec, e la CC 8/4 NUCLEODUR[®], 100-5 18 ec, entrambe della Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) ed una pre-colonna (cut-off: 0,2 μ m, Supelco, n. cat. 55215-U), un frigorifero (4°C, Indesit), e un frigorifero-freezer combinato (4°C/-21°C Indesit).

4.4 Preparazione e caratterizzazione delle soluzioni

In questo paragrafo si riportano i metodi di preparazione delle diverse soluzioni utilizzate per questo studio. Laddove è stato necessario, i vari sottoparagrafi possono essere accompagnati anche dalle metodiche di caratterizzazione per una determinata soluzione.

4.4.1 Acqua per HPLC

Per le analisi in HPLC è stata utilizzata WMQ ottenuta per osmosi inversa (0,055 μ S/cm, filtro 0,2 μ m). Per verificare la sua purezza, è stata acquistata anche un'acqua specifica per HPLC (c-WMQ) e le due acque sono state sottoposte alle analisi descritte di seguito.

4.4.1.1 Spettrometria UV-Vis

È stata analizzata la capacità di assorbimento nella regione spettrale compresa tra 1100 e 190 nm. Per fare ciò, 600 μL di ognuna delle due acque sono stati pipettati nell'apposita cuvetta in quarzo (cammino ottico: 1 cm), assicurandosi che le pareti ottiche, interne ed esterne, della stessa fossero pulite da impronte e/o impurezze. Gli spettri sono stati ottenuti grazie al software Cary UV-Vis; i dati relativi sono stati successivamente esportati ed elaborati con i programmi Excel 2003, ed Origin 6.0.

4.4.1.2 Indice di Rifrazione

Sempre con lo stesso intento, si sono misurati anche i rispettivi indici di rifrazione. Per la loro misurazione è stato utilizzato il rifrattometro di Abbe. Come mostrato in Figura 4.1, questo strumento è costituito da un sistema di due prismi, di cui uno mobile (2 in Fig. 4.1) ed uno inamovibile (1 in Fig. 4.1), che distano fra loro circa 0,15 mm quando sono sovrapposti, una sorgente di luce diffusa (589 nm; 3 in Fig. 4.1), ed un cannocchiale oculare (4 in Fig. 2.1).

Per l'analisi si è proceduto come qui descritto. Dopo aver acceso la sorgente luminosa (3 in Fig. 4.1), è stata posta una goccia d'acqua sopra il prisma inamovibile (1 in Fig. 4.1) e si è posizionato quindi il prisma mobile (2 in Fig. 4.1) su quello inamovibile. A questo punto, attraverso l'oculare (4 in Fig. 4.1) si è potuto osservare un campo illuminato suddiviso in due zone: una chiara ed una scura. Si è proceduto quindi con la "messa a fuoco" che serve ad allineare i prismi con il fascio luminoso in modo da ottenere una netta separazione tra le due zone. Solo a questo punto è stato possibile rilevare direttamente dal display (5 in Fig. 4.1) il valore numerico dell'indice di rifrazione.



Figura 4.1. Refrattometro di Abbe. Lo strumento è composto da (1) un prisma inamovibile ed (2) uno mobile, (3) una sorgente luminosa (589 nm), (4) un oculare e (5) un interruttore elettrico con display per la visualizzazione dell'indice di rifrazione.

4.4.2 Soluzioni madre di KH_2PO_4 e K_2HPO_4 1M

Le soluzioni madre dei due sali, K_2HPO_4 (P.M. 174,18 Da) e KH_2PO_4 (P.M. 136,09 Da), sono state preparate secondo il seguente protocollo. Il peso molecolare dei due sali è stato usato per calcolare la quantità effettiva che era necessario pesare per ottenere un litro di soluzione 1 M (una mole/L soluzione). Pertanto, si sono pesati 174,18 g di K_2HPO_4 e 136,09 g di KH_2PO_4 . I sali sono stati versati in un matraccio e disciolti in WMQ. A completa dissoluzione dei sali, entrambe le soluzioni sono state portate a volume, aliquotate in bottiglie di vetro Duran, e conservate al riparo dalla luce fino al loro utilizzo. Questo protocollo rimane invariato nel caso vengano utilizzati i sali per HPLC (i.e., c- K_2HPO_4 e c- KH_2PO_4). Il peso non è stato ricalcolato in funzione della purezza dei sali (99-100,1%).

4.4.3 Tampone fosfato 50 mM

Il tampone fosfato 50 mM (TF-50) è stato preparato sempre al momento dell'uso. In un matraccio da 1 L sono stati pipettati 21,1 mL di KH_2PO_4 (1 M) e 28,9 mL di K_2HPO_4 (1 M), o delle rispettive madri preparate con i sali per HPLC (i.e., c- KH_2PO_4 e c- K_2HPO_4). Alla miscela così ottenuta è stata aggiunta una quantità di WMQ tale da portarsi al di sotto del menisco di qualche millimetro. La miscela è stata quindi versata in un beaker per controllare il pH della soluzione (Par. 4.5.1.3). Il pH del TF-50 è stato aggiustato, sotto agitazione magnetica, con l'aggiunta di NaOH acq. o di HCl acq. nel caso che lo stesso fosse rispettivamente inferiore o superiore a 7. Nella stragrande maggioranza dei casi, si è usata una soluzione di HCl acq. al 4% circa (v/v). Quest'ultima è stata preparata in un matraccio da 25 mL, pipettando 2,70 mL di HCl acq al 37,9% (v/v) e portando a volume fino al menisco con WMQ. I calcoli per le diluizioni sono stati effettuati utilizzando l'equazione di seguito riportata:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

(1)

dove "C₁" e "V₁" rappresentano rispettivamente la concentrazione della soluzione di HCl acq al 37,9%, ed il volume incognito della stessa da prelevare, mentre "C₂" e "V₂" rappresentano rispettivamente la concentrazione ed il volume finale della soluzione di HCl acq. al 4% circa che si deve preparare.

Dopo aver aggiustato il pH del TF-50 a 7, la soluzione è stata versata nuovamente nel matraccio ed infine è stata portata a volume con WMQ. Il pH della soluzione finale è stato rimisurato, come precedentemente descritto, per confermare che il valore precedentemente ottenuto fosse rimasto tale.

Dovendo filtrare il tampone prima del suo utilizzo in HPLC, e per verificare potenziali interazioni tra la membrana filtrante ed il TF-50 che potessero indurre la precipitazione di sali nel tempo, lo stesso è stato filtrato sottovuoto utilizzando filtri in microfibra di vetro (\emptyset pori: $0,7 \mu\text{m}$) o filtri in acetato di cellulosa (\emptyset pori: $0,22 \mu\text{m}$). In entrambi i casi, la prima porzione di filtrato è stata usata per avvinare la bottiglia di raccolta, ed è stata scartata. Della seconda porzione del filtrato, una parte, circa 50 mL, è stata lasciata a riposo per 63 giorni in provette da 50, a temperatura ambiente, e al riparo dalla luce, la restante parte è stata utilizzata per la preparazione di due "fasi mobili 2" (vedi oltre Tab. 4.1), una costituita dal TF-50 filtrato con filtri in microfibra di vetro e l'altra costituita dal TF-50 filtrato con filtri in acetato di cellulosa. Anche le due fasi mobili di tipo due, a loro volta, sono state lasciate a riposo per 63 giorni in provette da 50. Trascorso questo tempo, le provette sono state oggetto di ispezione visiva macroscopica, prima e dopo agitazione manuale. Inoltre, le stesse sono state centrifugate (condizioni operative: centrifuga megafuge, rotore S41, rcf 3026, 20°C). Dopo centrifugazione le provette sono state ispezionate visivamente.

4.4.4 Tampone fosfato 25 mM

Il tampone fosfato 25 mM (TF-25) è stato preparato a partire dal TF-50. Per la preparazione di 1 L di soluzione sono stati opportunamente miscelati, in un matraccio da 1 L, 500 mL di TF-50 e WMQ fino a qualche mm sotto il menisco. Successivamente, è stato misurato il pH (Par. 4.5.1.3) ed lo stesso è stato aggiustato con l'aggiunta di poche gocce di HCl acq al 4% circa (v/v), in quanto è stato sempre rilevato un pH superiore a 7. Una volta raggiunto il valore desiderato, la soluzione è stata versata nuovamente nel matraccio e portata a volume. Il pH è stato infine rimisurato.

4.4.5 Solventi utilizzati per le separazioni in HPLC

I solventi utilizzati per le separazioni in HPLC, per il lavaggio delle varie porzioni dello strumento, o per lavare la colonna dopo il suo utilizzo, sono caratterizzati da un'elevata purezza, garantita dalla ditta dalla quale si acquistano, che permette di evitare il passaggio in colonna di eventuali impurezze che potrebbero impaccarla e compromettere l'analisi.

Tuttavia, i solventi organici, le loro miscele, il TF-50 ed il TF-25 sono stati filtrati sotto vuoto rispettivamente con filtri in microfibra di vetro, in nylon, o in acetato di cellulosa. Come precedentemente indicato, la prima porzione di filtrato è stata usata per avvinare le bottiglie di raccolta ed è stata scartata. I solventi, loro miscele, ed i tamponi sono stati filtrati direttamente nelle bottiglie collegate alle porte dello strumento (vedi oltre Fig. 4.2).

4.4.6 Fase mobile

Con il termine “fase mobile” (FM) si intende quella miscela di solventi usata per la separazione cromatografica delle sostanze oggetto del nostro studio. Nel nostro caso, la metodica di separazione ha subito alcune modifiche, e pertanto le fasi mobili utilizzate sono state ben diciassette (Tab. 4.1).

Nella maggior parte dei casi la miscelazione delle sostanze che compongono la fase mobile è stata effettuata automaticamente dallo strumento, e dunque la fase mobile si è creata materialmente nella camera di miscelazione dello strumento. Pertanto, l'operatore ha dovuto solo riempire le bottiglie con i solventi filtrati. Non è stato nemmeno necessario degasare i solventi, in quanto lo strumento procede autonomamente anche relativamente a questo punto.

Tuttavia, fanno eccezione a quanto descritto qui sopra, e solo relativamente al miscelamento, la FM-1, e la FM-17, dove ACN e THF (7:3, v:v), e TF-25 e ACN sono stati rispettivamente pre-miscelati dall'operatore in un'unica bottiglia. La FM-17 è stata pre-miscelata solo una volta.

Tabella 4.1. Composizione percentuale volumetrica delle diverse fasi mobili

FM	Composizione (% v/v)				
	TF-50	TF-25	ACN	THF	iPrOH
1	73		18,9	8,1	
2	73		27		
3	75		25		
4	74		26		
5	72		28		
6	71		29		
7	70		30		
8	72		27		1
9	71		27		2
10	70		27		3
11	68		27		5
12	65		27		8
13	73		26,5		0,5
14	72,5		26,5		1
15	73		22		5
16	73		26		1
17	73	27			

4.4.7 Soluzioni da iniettare in HPLC

Tutte le soluzioni così dette "da iniettare in HPLC", e cioè quelle che passeranno all'interno della colonna cromatografia, e che quindi subiranno una separazione dei componenti, sono state preparate in una microprovetta per aggiunta dei relativi volumi.

Il contenuto della microprovetta è stato poi completamente aspirato con una siringa in plastica (5 mL) e, sostituendo l'ago metallico con un filtro a siringa Acrodisc o Whatman™, successivamente filtrato dentro delle provette pulite per HPLC, che indicheremo con il termine "vial". Le vial vengono chiuse con un setto in silicone perforabile ed un tappo forato in plastica. Per evitare che siano presenti dei contaminanti all'interno delle vial pulite, le stesse si conservano all'interno di bustine di plastica ben sigillate. In considerazione delle piccole dimensioni delle vial, alcune gocce del filtrato sono state sempre usate per avvinare le stesse. Inoltre, per evitare contaminazioni esterne, le soluzioni vengono filtrate in assenza di movimenti dell'aria (i.e., finestre chiuse, condizionatore spento), e da un operatore che veste sempre adeguatamente.

Nella stragrande maggioranza dei casi, le soluzioni così preparate sono state direttamente inserite nell'apposito alloggiamento dello strumento e di seguito analizzate. Solo in alcuni casi in cui l'analisi è stata ripetuta, i campioni utilizzati, sono rimasti all'interno delle vial nell'alloggiamento dello strumento, a temperatura ambiente ed al riparo dalla luce, per non più di venti giorni fino alla ripetizione dell'analisi.

Qualitativamente parlando, le soluzioni iniettate contenevano: una delle 17 FM (Tab. 4.1), ACN:WMQ (rapporti variabili fino ad un massimo contenuto in acqua del 20%), MeOH:WMQ (rapporti variabili fino ad un massimo contenuto in acqua del 20%), IbuNa in FM 1-17, DicloNa in FM 1-17, IbuNa e DicloNa in FM-1, -2 e -17.

4.4.8 Soluzione salina tamponata in tampone fosfato

La soluzione salina di sodio e potassio cloruro in tampone fosfato (PBS) è stata preparata sciogliendo una pastiglia di PBS-T per ogni 200 mL di WMQ. La miscela è stata successivamente sottoposta ad agitazione con agitatore magnetico per favorire la sua solubilizzazione. A dissoluzione avvenuta, il PBS possiede un pH di 7,4 e come riportato in etichetta è così composto: tampone fosfato contenente KH_2PO_4 e Na_2HPO_4 (0,01 M), cloruro di potassio (0,0027 M), e cloruro di sodio (0,137 M).

4.5 Molecole modello e loro caratterizzazione

Le molecole modello utilizzate sono due farmaci anti-infiammatori non steroidei, nella loro forma salificata. Questi sono il sale sodico dell'ibuprofene (IbuNa) e quello del diclofenac (DicloNa).

4.5.1 Ibuprofene sale sodico

Durante lo svolgimento di questo studio sono stati utilizzati due lotti di IbuNa, in quanto il primo pur mantenendo le sue caratteristiche macroscopiche ha modificato il suo odore. Pertanto, quando si è entrati in possesso del secondo lotto, i due lotti sono stati sottoposti a diverse analisi, qui di seguito descritte, per evidenziarne le eventuali differenze.

4.5.1.1 Conservazione

I due lotti sono stati conservati nei contenitori originali così come prescritto dalla ditta produttrice, e quindi a temperatura ambiente ed all'interno di un armadio del laboratorio. Successivamente, a causa di alcuni risultati ottenuti con gli esperimenti descritti nel Paragrafo 4.7.1, il secondo lotto è stato conservato sempre nel suo contenitore originale leggermente aperto posto all'interno di un essiccatore in vetro non ambrato, il cui fondo è stato riempito con gel di silice, dove è inoltre presente un piccolo beaker contenente del pentaossido di fosforo, entrambi con lo scopo di eliminare l'umidità dell'ambiente.

4.5.1.2 Punto di fusione

Il punto di fusione è un parametro molto utile per la determinazione della purezza di una sostanza. La sua misurazione è stata effettuata per entrambi i lotti di IbuNa presi singolarmente e come miscela, ottenuta tritutando in un vetrino da orologio una piccola quantità dei due lotti (in rapporto 1:1). Le polveri (semplici o composte) sono state prelevate con la estremità aperta di un capillare in vetro, e si è fatto in modo che finissero nella estremità chiusa. A questo punto il capillare è stato inserito nell'apposito alloggiamento all'interno dello strumento, a contatto con una piastrina dotata di resistenza elettrica. Lo strumento è dotato inoltre di una lente che permette l'ingrandimento del capillare, e di vedere il momento esatto in cui la sostanza inizia la sua fusione, e la temperatura registrata dal termometro incorporato. Questa rappresenta il punto di fusione. Inoltre, è stata annotata anche la temperatura alla quale la fusione è risultata completa. I valori di temperatura ottenuti sperimentalmente sono stati confrontati con i dati presenti in letteratura (vedi Fig. 4.4).

4.5.1.3 Misurazione del pH

Il pH delle soluzioni contenenti IbuNa è stato misurato con un pH-metro equipaggiato con la sonda InLab 423; solo occasionalmente è stata utilizzata la sonda Inlab 412. Prima di ogni misurazione, la calibrazione dello strumento è stata sempre verificata. Per fare ciò, la sonda viene inizialmente inserita in una soluzione standard a pH 7 e si annotano il pH rilevato dallo strumento, i mV, e la temperatura. Successivamente, si inserisce la sonda in una soluzione standard a pH 4, e si annotano i medesimi valori sopra citati. Tutti questi valori sperimentali servono per calcolare il parametro indicato nel manuale dello strumento con il termine "Slope %" che indica il grado di bontà della calibrazione, e viene calcolato utilizzando l'equazione (2):

$$\text{Slope \%} = \frac{[E_2 - E_1]}{[3 \times S_{\text{teorico}}]} \times 100$$

(2)

dove "E₂" rappresenta i mV rilevati dallo strumento quando la sonda è immersa nella soluzione a pH 4, "E₁" i mV relativi alla soluzione a pH 7, "S teorico" è invece un valore relativo alla temperatura rilevata dallo strumento, e viene calcolato con l'equazione (3), la quale è stata realizzata per regressione lineare di alcuni dati di temperature forniti dalla ditta madre:

$$S_{\text{teorico}} = \frac{Y - A}{B}$$

(3)

dove "A" e "B" sono i parametri forniti dalla regressione lineare (Origin 6.0) ed equivalgono rispettivamente a 54,26 e 0,196. Infine "Y" è la temperatura rilevata dallo strumento nel momento dell'analisi. Quando il valore dello "Slope %" è compreso tra 95 e 102 % e l'E₁ tra -15 e +15, significa che lo strumento possiede una buona calibrazione. Nei pochissimi casi in cui questi valori sono risultati inferiori, è stato necessario immergere la sonda nella soluzione standard a pH 4 per alcune ore, e poi procedere al controllo dei valori sopra indicati. Inoltre, prima di ogni utilizzo, è stato sempre controllato il livello della soluzione elettrolitica all'interno della sonda e, ove necessario, lo stesso è stato ripristinato.

Sono stati misurati i valori di pH di alcune soluzioni che contenevano IbuNa (entrambi i lotti). Per quanto riguarda il primo lotto, è stato misurato il pH delle soluzioni in WMQ, PBS, TF-50 e in FM-2, aventi concentrazioni 1 mg/mL. Per quanto riguarda invece il secondo lotto, è stato misurato il pH delle soluzioni madre in TF-25 in un intervallo di concentrazioni compreso tra 0,033 e 17 mg/mL.

4.5.1.4 Spettroscopia UV-Vis

Le soluzioni di IbuNa (entrambi i lotti) in vari solventi sono state analizzate qualitativa-mente e quantitativamente mediante spettrofotometria UV-Vis. In entrambi i casi, è stata presa in considerazione la capacità di assorbimento (ABS, unità di misura arbitrarie) nella regione spettrale compresa tra 1100 e 190 nm. Per fare ciò, 600 μ L della soluzione in esame e del suo bianco sono stati pipettati in una cuvetta di quarzo, che è stata poi inserita nell'apposito alloggiamento dello strumento. Si precisa che utilizzando una sola cuvetta, il bianco è sempre stato analizzato prima del campione in esame. Inoltre la cuvetta, tra una analisi e l'altra, è stata sempre abbondantemente sciacquata con WMQ per tre volte, indipendentemente dal solvente in cui l'IbuNa era disciolto.

Gli spettri sono stati ottenuti grazie al software Cary UV-Vis; i dati relativi sono stati successivamente esportati ed elaborati con i programmi Excel 2003, ed Origin 6.0. Gli spettri sono stati azzerati alla lunghezza d'onda di 350 nm. Per le analisi quantitative, gli spettri azzerati sono stati normalizzati rispetto al loro bianco.

Le *analisi qualitative* sono state eseguite per verificare forma, posizione, ed intensità dei picchi di assorbimento dell'IbuNa, e se questi variassero in funzione del solvente in cui la molecola si trovava disciolta.

Per quanto riguarda le analisi qualitative, il primo lotto di IbuNa è stato analizzato in soluzione acquosa (WMQ) ed in FM-2 alle concentrazioni di 62,5, 125, 250 e 500 μ g/mL ottenute tutte per diluizione seriale partendo dalle soluzioni madri (1 mg/mL). Inoltre, sono state analizzate 15 soluzioni (PBS) ottenute per diluizione seriale, ognuna avente concentrazione pari alla metà rispetto alla precedente, a partire da una soluzione madre (1 mg/mL). Il secondo lotto è stato analizzando in TF-25 alle concentrazioni di 33,2, 265,6 e 2125 μ g/mL ottenute per diluizione seriale a partire dalla soluzione madre (17 mg/mL).

Il secondo lotto è stato anche analizzato in soluzione acquosa, 2,1 mg/mL, ottenuta per diluizione della soluzione madre (4,3 mg/mL) preparata dopo che il sale era stato conservato in stufa a 100°C per 24, 48, 96 e 168 ore. Lo stesso lotto, è stato analizzato alle concentrazioni 0,531, 1,062 e 2,125 mg/mL in soluzione acquosa, dopo essere stato conservato per 48 giorni in una campana di vetro sotto vuoto con all'interno silice e pentaossido di fosforo; i risultati sono stati poi confrontati con quelli ottenuti dalle analisi dello stesso lotto alle medesime concentrazioni, prelevato direttamente dal contenitore originale.

Per contro, le *analisi quantitative* sono state effettuate per allestire delle curve di calibrazione con le quali si potesse determinare la concentrazione di IbuNa in campioni incogniti.

Curve di calibrazione

Sono state allestite diverse curve di calibrazione i cui parametri essenziali sono riassunti nella Tabella 4.2. Tuttavia, il protocollo operativo è sempre stato lo stesso. Inizialmente, in tre matracci puliti si prepara la soluzione madre (17 mg/mL, n = 3). Si fa presente che la bilancia è sempre calibrata prima delle pesate, e la calibrazione validata con pesetti certificati (10, 25, 50 mg). Nel caso delle curve di calibrazione 4 e 5 in Tabella 4.2., l'IbuNa utilizzato è stato tolto dalla stufa ed è stato lasciato a riposo per qualche minuto nel vetrino d'orologio, prima di essere pesato. Solo nel caso delle curve di calibrazione 6 e 7, l'analisi non è stata effettuata in triplo e la soluzione madre di partenza ha come concentrazione 2,125 mg/mL.

Le soluzioni madre sono state utilizzate subito dopo la loro preparazione per allestire 9 o 6 diluizioni (Tab. 4.2). Per fare ciò si prendono 9 o 6 microprovette, in ognuna delle quali si pipettano 0,75 mL del solvente in cui l'IbuNa è stato disciolto. A questo punto, si prelevano 0,75 mL dalla madre e si pipettano nella prima microprovetta, si agita bene il contenuto pipettando, si prelevano 0,75 mL della diluizione n.1 dalla prima microprovetta e si pipettano nella seconda microprovetta. E così di seguito. In questo modo si otterranno 9 o 6 diluizioni, le quali possiedono sempre una concentrazione pari alla metà di quella precedente. In ogni microprovetta ci saranno 0,75 mL ad eccezione dell'ultima, la nona o la settima, in cui il volume sarà di 1,5 mL.

Tabella 4.2. Parametri delle curve di calibrazione UV-Vis

C. Callb.	Lotto	Conservazione ¹	Solvente	Conc. madre (mg/mL)	N. dll	ABS (nm)
1	1	? h, 100°C	WMQ	17	9	255 / 265
2	2	? h, 100°C	WMQ	17	9	255 / 265
3	2	CO	WMQ	17	9	255 / 265
4	2	24h, 100°C	WMQ	17	9	255 / 265
5	2	48h, 100°C	WMQ	17	9	255 / 265
6	2	CO	AcFor/MeOH *	17	6	255 / 265
7	2	CO	AcFor/ACN §	17	6	255 / 265

¹. ?h: i campioni sono stati conservati in stufa a 100°C, ma non è stato annotato il tempo di permanenza; CO: contenitore originale, conservato in un armadio del laboratorio a temperatura ambiente e al riparo dalla luce. *1% di Acido Formico diluito in metanolo (rapporti volumetrici 1:99). § 3% di Acido Formico diluito in acetonitrile (rapporti volumetrici 3:97).

Si procede pertanto, con l'analisi allo spettrofotometro come descritto precedentemente (Par. 4.5.1.4). Ottenuti i grafici, i relativi dati si esportano in formato CSV, e si aprono in Excel 2003 dove vengono elaborati. Durante questa fase, i dati (campioni e bianchi) vengono inizialmente azzerati ad una determinata lunghezza d'onda (350 nm) dove non è presente nessun assorbimento. Successivamente, i dati dei campioni vengono normalizzati rispetto al loro bianco, semplicemente per sottrazione, alle lunghezze d'onda di 255 e 265 nm. I

dati così ottenuti vengono messi in relazione con le concentrazioni corrispondenti, ed utilizzati per allestire dei grafici "concentrazione vs. assorbimento" (Origin 6.0). Questo si può fare per il triplicato, o per la media dei valori. I dati derivanti dalla media delle tre prove sono infine soggetti a regressione lineare o polinomiale al fine di trovare l'equazione che meglio modella l'andamento dei dati rispettivamente per confronto dei valori di R e R². Infine, le curve di calibrazione sono state validate. Le curve 1 e 2 sono state validate preparando due soluzioni madre con concentrazione pari a 17 mg/mL e 9 diluizioni seriali a partire da questa; i punti messi a confronto per la validazione sono la diluizione 3 (2,125 mg/mL), la 6 (0,2656 mg/mL), la 8 (0,066 mg/mL) e la 9 (0,033 mg/mL). Le curve 3-5 sono state validate con due soluzioni aventi concentrazione 2,125 e 0,066 mg/mL, ottenute per diluizioni seriali a partire da una soluzione madre avente concentrazione 17 mg/mL. Le curve 6 e 7 non sono state validate. Tutte le soluzioni preparate per la validazione sono state trattate come se fossero campioni a concentrazione incognita.

4.5.1.5 Spettroscopia IR

Sono state effettuate delle analisi spettrofotometriche IR dei due lotti di IbuNa, e di un lotto di IbuNa che era stato precedentemente solubilizzato in EtOH e successivamente posto in stufa a 135°C, per far evaporare il solvente. Nella spettroscopia IR, il campione viene irraggiato a delle lunghezze d'onda che corrispondono allo spettro infrarosso (IR). Le molecole assorbono una quantità di energia che determina transizioni tra livelli energetici e permette ai legami chimici tra gli atomi di vibrare, originando vibrazioni di "stretching" (i.e. il legame chimico si accorcia o si allunga) o di "bending" (i.e. il legame chimico si piega). Lo spettro IR che si ottiene avrà sull'asse delle ordinate i valori relativi alla "trasmittanza" (unità misura: %) e sull'asse delle ascisse quelli relativi alla frequenza indicata come "numero d'onda" (cm⁻¹), le bande ottenute evidenziano la presenza di determinati gruppi funzionali [26]. Questo studio è stato effettuato per osservare l'eventuale presenza di umidità ed altre differenze tra i vari lotti di IbuNa. Gli spettri sperimentali sono stati messi a confronto con uno spettro IR "standard" fornito dalla Sigma Aldrich.

Preparazione del campione

L'IbuNa è stato disperso ed emulsionato in un olio minerale (Nujol) in un mortaio di agata per ridurre al massimo le particelle solide. Successivamente, i campioni emulsionati sono stati distribuiti tra due dischetti trasparenti di NaCl. Il tutto è stato inserito nel relativo alloggiamento all'interno dello strumento e gli spettri registrati.

4.5.1.6 Spettroscopia NMR

Per gli stessi lotti di IbuNa analizzati con la spettroscopia IR è stata effettuata anche un'analisi spettroscopica NMR al protone. I campioni in questo caso sono stati disciolti in acqua deuterata e posti all'interno di appositi tubicini di vetro, tipici per questo tipo di analisi. Il tutto è stato inserito nel relativo alloggiamento all'interno dello strumento. Questa tecnica spettroscopica è l'unica che permette di determinare la struttura esatta della molecola attraverso l'interpretazione dello spettro. Lo spettro riporta in ascissa la variazione del campo magnetico ed in ordinata l'entità dell'energia assorbita [26]. Anche queste analisi sono state effettuate per studiare la composizione chimica dei diversi lotti e confrontare tra loro gli spettri ottenuti, evidenziandone eventualmente le differenze.

4.5.2 Diclofenac sale sodico

La seconda sostanza presa in considerazione in questo studio è il sale sodico del diclofenac (DicloNa). Come verrà indicato più avanti, il DicloNa è stato utilizzato nelle separazioni in HPLC come "Standard interno" (vedi oltre). Questa sostanza è stata conservata sempre nel contenitore originale, come prescritto dalla ditta produttrice. Essa ha subito alcune delle caratterizzazioni precedentemente descritte per l'IbuNa.

Per il DicloNa si sono misurati i pH delle soluzioni in WMQ, TF-50, PBS e in FM-2, in tutti i casi alle concentrazioni di 1 mg/mL. Inoltre, si è fatta anche una indagine qualitativa mediante spettrofotometria UV-Vis (Par. 4.5.1.4). In particolare, sono state analizzate le soluzioni in WMQ ed in TF-50 alle concentrazioni di 62,5, 125, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$, ottenute per diluizione seriale a partire dalla soluzione madre corrispondente (1 mg/mL). Sono state analizzate anche 14 diluizioni seriali in PBS, ognuna avente concentrazione pari alla metà della precedente, partendo dalla soluzione madre (1 mg/mL).

4.6 Cromatografia liquida ad alta pressione

La cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) è una tecnica cromatografica che permette di separare, una volta trovate le condizioni ideali, i componenti di una miscela complessa, attraverso le interazioni che si possono stabilire tra gli stessi, la fase stazionaria della colonna cromatografica (colonna), e la fase mobile che fluisce attraverso quest'ultima, trasportando il campione al suo interno [27]. Pertanto, si evince che dall'intensità dell'interazioni tra i sopraccitati elementi dipenderà la durata della corsa del campione; cioè il tempo necessario affinché ogni singolo componente fuoriesca dalla

colonna [27]. Questo “tempo” prende il nome di “tempo di ritenzione” ed è uno dei parametri più importanti per l’individuazione della/e molecola/e d’interesse [27].

Questa breve introduzione ci permette di dire che le metodiche di separazione validate constano di una parte strumentale (come è fatto lo strumento e come si mantiene funzionante) ed una parte sperimentale (come si è sviluppata la metodica di separazione). I paragrafi successivi seguono questa logica, in modo da rendere più chiara e fruibile l’analisi e la discussione dei dati che saranno presentati nel prossimo capitolo.

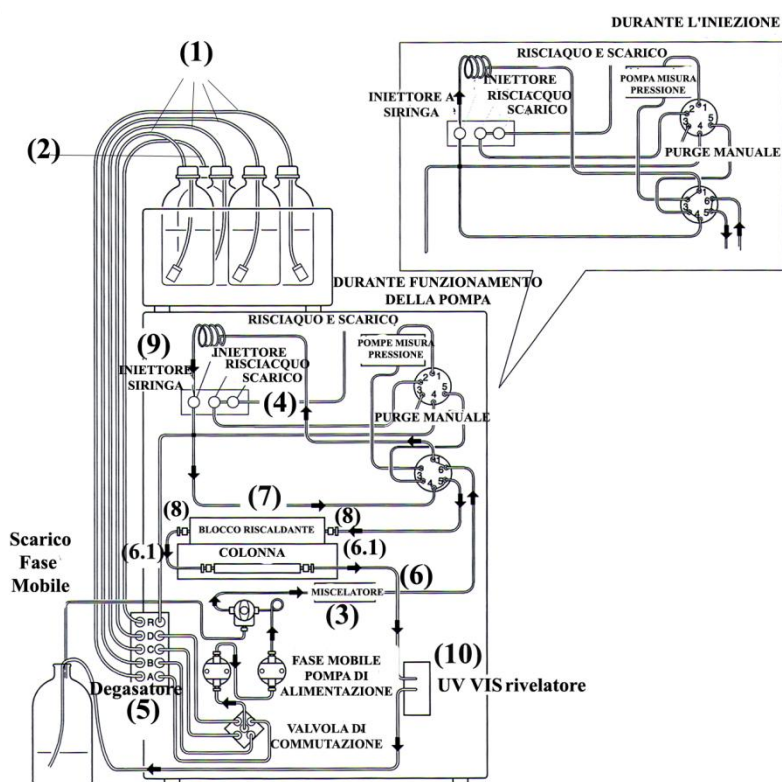


Figura 4.2. Schema HPLC. Nella figura viene schematizzato l’HPLC; esso è composto da: (1) quattro linee solventi; (2) una linea per la pulizia dell’ago; (3) una camera di miscelazione con due pompe; (4) un sistema di lavaggio della camera dei retro pistoni; (5) un sistema degasatore; (6) un circuito di tubi metallici che vanno dal miscelatore all’ingresso della colonna; (7) un blocco o forno riscaldante; (8) un sistema per escludere la colonna (union); (9) un autocampionatore ad alta velocità (ago di iniezione, due vassoi (rack) porta-campioni, un blocco termico per riscaldare o raffreddare i campioni contenuti nelle viali) ed infine (10) un rivelatore UV-Vis. Adattato da [28].

4.6.1 Elementi costituenti lo strumento

Il cromatografo utilizzato in questo studio è uno strumento compatto costituito, come mostrato in Figura 4.3 (vedi pagina precedente) dai seguenti elementi: (1) quattro linee solventi (bottiglie dedicate, pescanti), (2) una linea per la pulizia dell’ago dell’autocampionatore (bottiglia R), (3) una camera di miscelazione con due pompe, (4)

un sistema per il lavaggio della camera dei retropistoncini (bottiglietta), (5) un sistema degasatore, (6) un circuito in tubi metallici che parte dalla camera di miscelazione e crea un circuito tale da mettere in comunicazione l'ingresso in colonna con l'iniettore e la valvola ad alta pressione con quella a bassa pressione, (6.1) dei tubicini in peek che uniscono la colonna al (7) blocco riscaldante (forno), (8) un sistema per escludere la colonna (union), (9) un autocampionatore ad alta velocità (ago di iniezione, due vassoi (rack) portacampioni, un blocco termico per riscaldare o raffreddare i campioni contenuti nelle vials), ed (10) un rivelatore UV-Vis [14]. Inoltre, lo strumento può essere gestito completamente attraverso un computer grazie al software LCsolution Version 1.25, che permette di raccogliere ed analizzare i cromatogrammi. Nella Figura 4.2 (vedi pagina precedente) è inoltre possibile vedere il percorso della fase mobile, e del campione una volta iniettato.

In ultimo, si evidenzia che in questa tesi utilizzeremo la terminologia "in condizioni isocratiche" quando la fase mobile, il flusso, e la temperatura non cambiano, ed "in condizioni di gradiente" quando una o più variabili di quelle appena menzionate variano.

4.6.2 Colonna cromatografica utilizzata e suoi accessori

La colonna utilizzata per le analisi è una EC 150/4.6 NUCLEODUR® 100-5 C18 ec. Traducendo queste sigle, possiamo dire che (i) la colonna è lunga 150 mm ed ha un diametro interno di 4,6 mm [29]. (ii) Nel suo interno è presente della silice di terza generazione di tipo B, costituita da particelle totalmente sferiche il cui diametro è di 5 μm , e che presentano pori di 110 Å il cui volume è di 0,9 mL/g. La silice Nucleodur si contraddistingue anche per una buona stabilità alle alte pressioni (800 bar), un basso contenuto in metalli, una riproducibile microstruttura superficiale, e stabilità alla variazione di pH della fase mobile nel range 1-9 unità di pH [29]. (iii) Le particelle di silice sono rivestite con alconi contenenti 18 unità carboniose, il cui contenuto in carbonio è pari al 17,5% [29].

Come si può osservare in Figura 4.3, sulla superficie delle particelle sono presenti anche altri gruppi funzionali [29]. Nell'insieme il rivestimento delle particelle di silice permette la separazione dei composti mediante interazioni idrofobiche (forze di van der Waals) ed in minima parte con interazioni che coinvolgono i gruppi silanolicci [29].

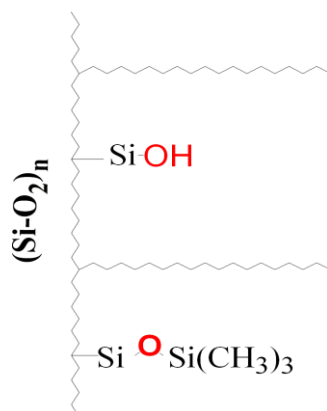


Figura 4.3. Schema fase stazionaria. Nella figura viene schematizzata la struttura chimica della fase stazionaria della colonna. Come si può osservare, sono presenti catene idrocarburiche a 18 atomi di carbonio unite alla catena di silice principale ed altri gruppi funzionali silanolic, i quali si trovano coinvolti nelle interazioni idrofobiche. Adattato da [29].

Si deduce quindi, che la fase stazionaria è di tipo “non-polare” e pertanto la fase eluente sarà polare. Questo tipo di cromatografia è indicata con la terminologia anglosassone “*reverse phase*” (o anche RP-HPLC).

Per salvaguardare e prolungare la vita della colonna sono stati acquistati due accessori che si posizionano prima della stessa. Rispettando la direzione del flusso, troveremo quindi (i) la pre-colonna (P), la colonna di guardia (CG), e la colonna (C). La funzione della pre-colonna è quella di impedire che dell’eventuale particolato grossolano (cut-off: 2 μm) giunga in colonna. Per contro, la colonna di guardia, come dice il suo nome, protegge la colonna dal materiale che si potrebbe depositare al suo interno per interazione con la fase stazionaria.

4.6.3 Accensione, inizializzazione, ed operazioni post-analisi

In questo paragrafo si riportano tutte le operazioni che si eseguono in automatico o manualmente dall’accensione allo spegnimento dello strumento.

All’accensione dell’HPLC, lo strumento stesso esegue automaticamente dei controlli che deve superare per essere pronto per l’utilizzo. Successivamente, si controlla l’acqua contenuta in una bottiglietta di vetro (20 - 25 mL) posta nel vano in cui è presente il degasatore e che serve per lavare i retropistoni (Fig. 4.2, elemento 4). Se la stessa si presenta di colore biancastro, oppure di consistenza opalescente, si sostituisce con WMQ fresca, sino al livello del supporto in plastica in cui è inserita. In condizioni normali, ciò avviene una volta alla settimana a prescindere o meno dal suo aspetto macroscopico. Dopodiché, si attivano manualmente i purge, ossia i lavaggi delle quattro linee del circuito e quella dell’iniettore; ciascuna delle cinque linee aspirerà, attraverso il pescante (Fig. 4.2,

elemento 1), alla velocità di 1 mL/min e per cinque minuti (tempo scelto dall'operatore), il solvente dalla propria bottiglia, il quale arriverà al sistema del degasatore (Fig. 4.2, elemento 5) che provvederà ad eliminare eventuali bolle d'aria presenti in questa porzione di circuito. Si vuole qui evidenziare che la durata del purge viene allungata in casi particolari quali (i) dopo il lavaggio e re-installazione dei filtri pescanti (10 - 15 min.), o (ii) dopo periodi lunghi in cui lo strumento non è stato utilizzato (10 - 20 min.).

A questo punto si accende il computer che gestisce lo strumento, e si impostano i parametri per le analisi da eseguire con o senza colonna (vedi oltre per dettagli). In ogni caso prima di qualsiasi analisi, lo strumento, con o senza colonna, viene condizionato massimo per una ora. Nella prima mezz'ora si porta a regime il flusso e/o le concentrazioni della fase mobile con un gradiente, nella seconda mezz'ora si mantengono i parametri impostati fino ad equilibrio. Per esempio, in presenza di colonna, si osserva la stabilità della linea di base nella schermata del *real time* fornita dal software dello strumento e, se non si nota alcuna deriva, è possibile iniziare con le analisi.

Finite le analisi, si procede con il lavaggio dello strumento con o senza colonna, prima dello spegnimento dello stesso.

4.6.4 Metodica di lavaggio dello strumento

Le metodiche di lavaggio dello strumento in presenza o meno la colonna sono differenti. Visto che normalmente la colonna è presente, la descrizione dei lavaggi partirà da queste condizioni. In funzione del numero di campioni analizzati si sceglie uno dei lavaggi indicati in Tabella 4.3. Ognuno di questi consta di tre fasi (indicate in Tab. 4.3 con F1 - 3) dove vengono flussate a 0,5 mL/min e per il tempo indicato tre differenti fasi mobili. La diversità dei metodi di lavaggio (corto, medio, lungo e lunghissimo), permette la scelta di quello più adatto, a seconda del tipo e del numero di campioni analizzati.

Il lavaggio può essere avviato manualmente, o automaticamente nel caso di analisi di campioni eseguiti in batteria, inserendolo in coda alla sequenza di analisi. Ciascun metodo è impostato in modalità "gradiente", ciò significa che il passaggio da una fase mobile all'altra avviene sempre in un intervallo di tempo di 10 minuti, nel quale le percentuali dei singoli solventi variano molto lentamente sino ad arrivare a quella impostata nel lavaggio.

Anche il passaggio dalla fase mobile di analisi alla prima di lavaggio avviene mediante un gradiente (gradiente iniziale in Tab. 4.3) che permette appunto il cambiamento delle fasi, ed in questo caso anche quello del flusso che si porterà, come precedentemente menzionato, a 0,5 mL/min. Inoltre, è da precisare che al termine della terza fase, è sempre presente un gradiente (gradiente finale in Tab. 4.3) di 10 minuti,

precedente allo spegnimento dello strumento, nel quale il flusso scenderà gradatamente a 0,1 mL/min.

Tabella 4.3. Composizione e durata dei lavaggi dello strumento con colonna

Fasi	Cortissimo	Corto	Medio	Lungo	Lunghissimo
<i>gradiente iniziale</i>	10	10	10	10	10
F1 - ACN/WMQ 23/73	200	200	400	400	700
<i>gradiente</i>	10	10	10	10	10
F2 - MeOH/WMQ 73/27	100	200	200	400	700
<i>gradiente</i>	10	10	10	10	10
F3 - ACN/WMQ 80/20	100	100	100	100	60
<i>gradiente finale</i>	10	10	10	10	10
Totale minuti	440	540	750	950	1510
Totale ore	7,33	9	12,5	15,83	25,17

Anche il circuito di iniezione può essere lavato generalmente con iPrOH, e altre volte, per lavaggi profondi, con WMQ. Si precisa, inoltre, che durante le analisi con colonna, sia prima che dopo l'iniezione del campione, si attiva il lavaggio dell'ago, per evitare eventuali contaminazioni da un campione all'altro, che potrebbero alterare i risultati.

In assenza di colonna e dei suoi accessori, lo strumento può essere lavato con WMQ o, in casi eccezionali, con iPrOH. Ad ogni modo, prima di poterlo collegare nuovamente alla colonna usata ed ai suoi accessori, è necessario eliminare completamente il solvente di lavaggio con la fase mobile di conservazione della colonna (ACN:WMQ, 80:20). Si precisa, inoltre, che il lavaggio in WMQ effettuato periodicamente, ossia una volta al mese, è quello consigliato dalla casa madre che prevede un lavaggio della durata di una notte intera, costituito esclusivamente da WMQ, ad un flusso basso (i.e., 0,1 mL/min), che passa esclusivamente nel circuito dello strumento, escludendo perciò la colonna.

Inoltre, circa una volta al mese, vengono smontati e lavati i filtri pescanti dalle bottiglie Duran. Si procede come qui descritto. I pescanti vengono svuotati del loro contenuto ed adagiati in un beaker contenente 100 mL di WMQ. Questo viene posizionato dentro la vasca di un bagnetto ad ultrasuoni operante a 35 kHz. Si effettuano quattro cicli di lavaggio da 30 minuti, in solvente differente (i.e., 1° ciclo: WMQ, 2° ciclo: iPrOH, 3° e 4° ciclo: WMQ). Alla fine di questa procedura, i filtri vengono posti ad asciugare sopra un foglio di carta da filtro, a testa in giù, prima di essere rimontati in ciascuna linea.

4.6.5 Analisi - Determinazione dei parametri pressori basali dello strumento

La determinazione dei parametri pressori basali dello strumento è stata ottenuta facendo fluire alcune fasi mobili nel circuito dello strumento, collegato attraverso la union (i.e., senza colonna) o la colonna cromatografica (varie combinazioni con gli accessori) come mostrato in Tabella 4.4 per 30 minuti. La scelta delle fasi mobili non è stata fatta in maniera casuale, ma in relazione a quelle che vengono utilizzate durante le analisi ed i rispettivi lavaggi.

Una volta acceso l'HPLC, e dopo aver eseguito le operazioni d'inizializzazione (Par. 4.6.3) si è proceduto iniziando sempre a monitorare la pressione dal flusso più basso, per poi aumentarlo.

Il passaggio da 0,1 a 0,5 mL/min o da 0,5 a 1 mL/min è sempre stato effettuato tramite un gradiente manuale della durata di 10 minuti. Inoltre, anche il passaggio da una fase mobile all'altra è stato raggiunto attraverso un gradiente manuale della durata di 10 minuti, al termine del quale si è ovviamente verificata la stabilità della pressione prima di annotare la pressione esistente in quelle specifiche condizioni.

Tali condizioni sono state verificate prima dell'inizio delle analisi di un determinato esperimento o comunque a seguito del lavaggio mensile consigliato dalla casa madre, a seguito del lavaggio post-analisi, o quando si è sostituito uno dei pezzi dello strumento.

Tali condizioni sono state verificate prima dell'inizio delle analisi di un determinato esperimento o comunque a seguito del lavaggio mensile consigliato dalla casa madre, a seguito del lavaggio post-analisi, o quando si è sostituito uno dei pezzi dello strumento.

Tabella 4.4. Condizioni per la determinazione dei parametri pressori basali dello strumento

Fase mobile			
Condizione	Composizione	Concentrazione (v/v)	Flusso (mL/min)
U	WMQ	100	0,5
U	WMQ	100	1,0
U	MeOH:WMQ	80:20	0,5
U	MeOH:WMQ	80:20	1,0
P+U	MeOH:WMQ	80:20	0,5
G+U	MeOH:WMQ	80:20	0,5
P+G+U	MeOH:WMQ	80:20	0,5
P+U	MeOH:WMQ	80:20	1
G+U	MeOH:WMQ	80:20	1
P+G+U	MeOH:WMQ	80:20	1
U	ACN:WMQ	80:20	0,5
U	ACN:WMQ	80:20	1,0
P+U	ACN:WMQ	80:20	0,5
G+U	ACN:WMQ	80:20	0,5
P+G+U	ACN:WMQ	80:20	0,5
P+U	ACN:WMQ	80:20	1
G+U	ACN:WMQ	80:20	1
P+G+U	ACN:WMQ	80:20	1
C	ACN:WMQ	80:20	0,5
C	ACN:WMQ	80:20	1,0
P + C	ACN:WMQ	80:20	0,5
P + C	ACN:WMQ	80:20	1,0
P + CG + C	ACN:WMQ	80:20	0,5
P + CG + C	ACN:WMQ	80:20	1,0
P + C	MeOH:WMQ	80:20	0,5
P + C	MeOH:WMQ	80:20	1,0
P + CG + C	MeOH:WMQ	80:20	0,5
P + CG + C	MeOH:WMQ	80:20	1,0

U = union; P = precolumna; CG = colonna di guardia; C = colonna

4.6.6 Analisi - Metodica per la quantificazione dell'ibuprofene sale sodico

La metodica di analisi utilizzata è stata il frutto di diverse modifiche apportate al protocollo utilizzato da M.B. Brown *et al.* [13]. Tali variazioni sono state necessarie a causa di diversi problemi che si sono manifestati nel tempo (vedi oltre).

4.6.6.1 Descrizione del protocollo originale di riferimento

La metodica di quantificazione di Brown *et al.* [13] prevede la separazione dell'Ibu (forma acida) in *reverse phase* utilizzando una fase mobile, pre-miscelata in un'unica bottiglia, costituita da TF-45:ACN:THF (73:18,9:8,1, v/v), e come colonna una Spherisorb RP-C18 (5 μ m, 150 \times 4,6 mm, Hichrom Ltd., UK) accessoriata solo con una colonna di guardia C18 (S5ODS2-10C5; 10 mm, Hichrom Ltd.). Tutti i campioni sono disciolti in fase mobile, ed in tutti è introdotto il Diclo (forma acida) come standard interno (20 μ g/mL). I campioni (volume di iniezione 100 μ L) sono eluiti ad un flusso di 1,1 mL/min e quantificati

ad una lunghezza d'onda di 273 e 264 nm rispettivamente per il Diclo (forma acida) e per l'Ibu (forma acida). Con l'eccezione di alcuni dettagli relativi al TF-45 (vedi poco più sotto), nessun altro parametro è indicato nella sovracitata metodica [13].

4.6.6.2 Modifiche apportate al protocollo di riferimento

Le modifiche apportate alla metodica di quantificazione di Brown *et al.* [13] sono qui schematicamente riassunte.

1. Concentrazione TF

Inizialmente si è utilizzato un TF leggermente più concentrato di quello indicato da Brown *et al.* [13]: 50 invece di 45 mM. Tuttavia, la nostra metodica finale utilizza un TF molto più diluito: TF-25. Un'altra differenza sostanziale riguarda il tipo di fosfato. Il nostro tampone fosfato è di potassio, mentre quello di Brown *et al.* è di sodio [13].

2. Eliminazione del THF e variazione dei rapporti di ACN e TF

In mancanza di un riferimento certo relativamente alla concentrazione di THF in grado di danneggiare i tubi in peek (i.e., polyether ether ketone) [29] si è deciso di eliminarlo dalla fase mobile tricomponente. Pertanto, si è in seguito giocato con i rapporti percentuali del TF-50 e dell'ACN, come mostrato in Tabella 4.5.

Tabella 4.5. Riassunto delle varie miscele ACN:TF-50

Prove	Composizione (% v/v)		mL/min	Fase Mobile
	ACN	TF-50	Flusso	Acronimo*
1	25	75	1	3
2	26	74	1	4
3	27	73	1	2
4	28	72	1	5
5	29	71	1	6
6	30	70	1	7

* vedi Tab. 4.1

3. Introduzione del iPrOH, e variazione rapporti nella nuova miscela trifasica

L'iPrOH è stato introdotto al posto del THF in quanto simile a quest'ultimo per quanto riguarda l'idrofilicità [30]. La fase mobile finale è stata prodotta dallo strumento nella camera di miscelazione. Anche in questo caso si è giocato con le diverse percentuali del iPrOH e del TF-50, mantenendo però costante la quantità dell'ACN nelle prove 2 - 6 (Tab. 4.6).

Una volta visti i risultati, si sono prese in considerazione le composizioni di fasi mobili con i cromatogrammi migliori, e si sono proseguite le prove.

Tabella 4.6. Riassunto delle varie miscele ACN:iPrOH:TF-50

Prove	Composizione (% v/v)			Fase Mobile	
	ACN	iPrOH	TF-50	Flusso	Acronimo*
1	26,5	0,5	73	1	13
2	27	1	72	1	8
3	27	2	71	1	9
4	27	3	70	1	10
5	27	5	68	1	11
6	27	8	65	1	12

* vedi Tab. 4.1

4. Variatione del flusso di eluizione

Le variazioni apportate al protocollo di riferimento, non hanno riguardato solo le percentuali dei solventi ma si sono allargate anche al flusso di eluizione. La quantificazione dell'IbuNa è stata sperimentata con la fase mobile ACN:TF-50 (26:74) e ACN:TF-50 (27:73) rispettivamente FM-4 e FM-2 in Tabella 4.1. Nel primo caso la velocità di flusso ha variato tra 1, 1,2 e 1,3 mL/min, e nel secondo caso il flusso è stato di 0,7 e 1,3 mL/min.

5. Variatione della lunghezza d'onda di rilevamento

Le lunghezze d'onda prese in considerazione sono state 254 e 265 nm.

6. Variatione della temperatura del campione

I campioni da iniettare non sono stati mai termostatati. Si è però cercato di mantenere la temperatura del laboratorio a 25°C mediante condizionamento dell'aria.

4.6.6.3 Metodica finale

In seguito alle prove fatte si è arrivati ad una metodica finale per la quantificazione dell'IbuNa, i cui parametri sono qui riassunti. (i) Fase mobile: ACN:TF-25 in rapporto 27:73 (i.e., FM-17); (ii) flusso della fase eluente: 1 mL/min; (iii) durata dell'analisi: 20 minuti; (iv) termostatazione della colonna: 25°C; (v) termostatazione dei campioni da iniettare: nessuna (lo strumento indicherà valori di 27 - 28°C per una temperatura del laboratorio di ca. 22°C); (vi) volume di iniezione: 20 µL; (vii) lunghezza d'onda di rilevamento: 254 e 265 nm; (viii) temperatura del laboratorio: 22 ± 2°C. Inoltre, si riassume qui come vengono preparati i campioni a concentrazione nota o incognita destinati all'analisi.

Preparazione dei campioni a concentrazione nota

Tutte le soluzioni di IbuNa (in fase mobile) da analizzare in HPLC, sono state preparate in una microprovetta per un volume pari a 1 mL, al quale sono stati aggiunti 16 µL di DicloNa (in fase mobile; 62,5 µg/mL) in qualità di standard interno (SI) e preparato come descritto

nel Paragrafo 4.6.7. La soluzione così ottenuta è stata aspirata con una siringa munita di ago metallico, e filtrata direttamente in vial attraverso un filtro Acrodisc o Whatman™.

4.6.7 Curva di calibrazione

Per la quantificazione dei campioni incogniti, è stata allestita una curva di calibrazione dove è stato messo in relazione la concentrazione dell'IbuNa vs il rapporto delle aree (IbuNa/SI) dei picchi eluiti. L'allestimento della suddetta curva consta dei seguenti punti.

4.6.7.1 Preparazione delle soluzioni madre di IbuNa e DicloNa

Le soluzioni madre di IbuNa, conservato come descritto nel Paragrafo 4.5.1.1, e DicloNa (1 mg/mL ciascuna) sono state preparate pesando, su carta da pesata, 10 mg di ciascuna sostanza con una bilancia analitica precedentemente calibrata. Successivamente, le due sostanze sono state versate ciascuna nel proprio matraccio in vetro (10 mL), nei quali è stata aggiunta la fase mobile (metodica finale) quasi sino al livello del menisco. La dissoluzione del contenuto è stata favorita mediante agitazione magnetica (5 - 10 minuti). A dissoluzione avvenuta, è stato spento l'agitatore, tolto il magnetino attraverso l'utilizzo di una calamita, e le soluzioni sono state portate a volume. Le soluzioni così ottenute, si sono ulteriormente agitate manualmente, capovolgendo 2 - 3 volte il matraccio tappato con del parafilm.

4.6.7.2 Curva di calibrazione di IbuNa

Per individuare il range di aree corrispondenti alle diverse concentrazioni di IbuNa (lotto 1), si è proceduto in questo modo, in triplo, e da tre madri a concentrazione 1 mg/mL in fase mobile.

Quindici microprovette sono state posizionate in una scarabattola, numerandole dalla concentrazione più alta a quella più bassa. Nelle microprovette sono stati pipettati 1 mL di FM-2 (ACN:TF-50, 27:73). Successivamente, nella prima microprovetta sono stati pipettati 1 mL della soluzione madre di IbuNa (1 mg/mL in FM-2). Dopo accurata miscelazione, sono stati prelevati 1 mL dalla prima provetta e sono stati pipettati nella seconda. E così di seguito fino alla 15^{ma} microprovetta. Alla fine di questa procedura, si ottengono 14 microprovette che contengono 1 mL ciascuna, tranne l'ultima che contiene 2 mL. Il range di concentrazioni varia da 500 a 0,03 µg/mL (500.000 - 30,52 ng/mL), ed ognuna è la metà di quella precedente. Il contenuto delle microprovette è stato aspirato con una siringa da 10 mL, e filtrato (Acrodisc) nelle vial (Par. 4.4.7). I campioni, così ottenuti, sono stati subito posizionati nel vassoio porta-campioni dell'HPLC ed analizzati secondo la metodica descritta nel Paragrafo 4.6.6.3. L'analisi dei cromatogrammi ha permesso di

ottenere le aree corrispondenti alle concentrazioni analizzate. I dati sono stati infine, graficati e modellizzati utilizzando Origin 6.0.

Si fa presente che i solventi sono stati filtrati con filtri in microfibra di vetro (Whatman™). La colonna era accessoriata con colonna di guardia (tipo CC). La lunghezza d'onda era settata a 254 nm.

4.6.7.3 *Curva di calibrazione di DicloNa*

Per individuare il range di aree corrispondenti alle diverse concentrazioni di DicloNa, si è proceduto in questo modo, in triplo, e da tre madri a concentrazione 1 mg/mL in FM-2.

Quindici microprovette sono state posizionate in una scarabattola, numerandole dalla concentrazione più alta a quella più bassa. Nelle microprovette sono stati pipettati 1 mL di FM-2 (ACN:TF-50, 27:73). Successivamente, nella prima microprovetta sono stati pipettati 1 mL della soluzione madre di DicloNa (1 mg/mL, in FM-2). Dopo accurata miscelazione, sono stati prelevati 1 mL dalla prima microprovetta e sono stati pipettati nella seconda. E così di seguito fino alla 15^{ma} microprovetta. Alla fine di questa procedura, si ottengono 14 microprovette che contengono 1 mL ciascuna, tranne la ultima che contiene 2 mL. Il range di concentrazioni varia da 500 a 0,03 µg/mL (500.000 - 30,52 ng/mL), ed ognuna è la metà di quella precedente. Il contenuto delle microprovette è stato aspirato con una siringa da 10 mL, e filtrato (Acrodisc) nelle vial (Par. 4.4.7). I campioni, così ottenuti, sono stati subito posizionati nel vassoio porta-campioni dell'HPLC ed analizzati secondo la metodica descritta nel Paragrafo 4.6.6.3. L'analisi dei cromatogrammi ha permesso di ottenere le aree corrispondenti alle concentrazioni analizzate. I dati sono stati infine, graficati e modellizzati utilizzando Origin 6.0.

Si fa presente che i solventi sono stati filtrati con filtri in microfibra di vetro (Whatman™). La colonna era accessoriata con una colonna di guardia tipo CC. La lunghezza d'onda era settata a 254 nm.

4.6.7.4 *Curva di calibrazione di IbuNa in presenza di DicloNa*

La curva di calibrazione è stata ottenuta in triplo, utilizzando tre madri di IbuNa (15,6 µg/mL) ottenute per diluizione da altrettante madri di IbuNa (1 mg/mL) e tre madri di DicloNa (62,5 µg/mL) ottenute per diluizione da altrettante madri (1 mg/mL). Tutte le madri sono in FM-2 o FM-17. Si è operato come qui descritto.

Novembre microprovette sono state posizionate in una scarabattola, numerandole dalla concentrazione di IbuNa più alta a quella più bassa. Nelle microprovette sono stati pipettati 1 mL di FM-2 (ACN:TF-50, 27:73) o FM-17 (ACN:TF-25, 27:73). Successivamente, nella prima microprovetta sono stati pipettati 1 mL della soluzione madre di IbuNa (15,6 µg/mL). Dopo accurata miscelazione, sono stati prelevati 1 mL dalla prima microprovetta e sono

stati pipettati nella seconda. E così di seguito fino alla 9^a microprovetta. Alla fine di questa procedura, si ottengono 8 microprovette che contengono 1 mL ciascuna, tranne l'ultima che ne contiene 2. Dall'ultima si prelevano 1 mL e si posizionano in una nuova microprovetta, per uniformare il volume. A questo punto si pipettano 16 μL di DicloNa (62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in ciascuna microprovetta. Pertanto, il range di concentrazioni in IbuNa varia da 7,69 a 0,03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (7.689,47 - 30,04 ng/mL), ed ognuna è la metà di quella precedente. La concentrazione di DicloNa sarà pertanto di 0,98 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in ogni microprovetta (1.016 μL totali). I campioni così ottenuti sono stati aspirati, uno per volta, con una siringa munita di ago metallico, e filtrati direttamente in vial attraverso un filtro Acrodisc o WhatmanTM. I campioni filtrati sono stati subito posizionati nel vassoio porta-campioni dell'HPLC ed analizzati secondo la metodica descritta nel Paragrafo 4.6.6.3. L'analisi dei cromatogrammi ha permesso di ottenere le aree corrispondenti alle concentrazioni analizzate. I dati sono stati infine graficati e modellizzati utilizzando Origin 6.0.

Infine, si fa presente che questa curva di calibrazione è stata allestita in varie fasi temporali usando il TF-50 o il TF-25, utilizzando due lunghezze d'onda: 254 e/o 265 nm, vari accessori per la colonna, i solventi filtrati con filtri i fibra di vetro o nylon, ed infine due lotti differenti di IbuNa, conservato in maniera differente.

4.7. Presentazione e Discussione Dei Risultati

Nel seguente Paragrafo saranno descritti e discussi i risultati degli esperimenti effettuati. In alcuni casi, non si seguirà l'ordine cronologico con cui sono stati ottenuti, ma nell'insieme si cercherà di dare al lettore un testo chiaro nelle sue motivazioni e conclusioni.

4.7.1 Caratterizzazione delle soluzioni

Partendo dal presupposto che quanto pubblicato in letteratura fosse riproducibile, queste analisi si resero necessarie per capire quale fosse l'elemento disturbante quando si sono avuti diversi problemi con l'HPLC.

4.7.1.1 Acqua Milli-Q

Inizialmente, non ci siamo preoccupati che l'acqua prodotta in laboratorio potesse creare qualche problema in quanto lo strumento era nuovo quanto l'HPLC, ed era stato proprio comprato con delle caratteristiche che dovevano assicurare la produzione di WMQ anche adatta per le colture cellulari ed avente le seguenti caratteristiche: resistività a 25°C: 18,2 MOhm/cm; conducibilità a 25°C: 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$; TOC: 1-5 ppb; batteri: < 1CFU/mL; endotossine: 0,001 EU/mL. Tuttavia, un commento di un tecnico ci fece dubitare della sua qualità e decidemmo di fare alcune analisi. Si evidenzia che, a parte le analisi descritte nei prossimi sotto-paragrafi, abbiamo anche lasciato evaporare durante la notte le due acque su dei grandi vetrini da orologio (\varnothing : 15 cm), per ritrovare praticamente niente la mattina seguente. Anche guardando in controluce i vetrini non è stato possibile notare la presenza di depositi; questo è il motivo per cui non si riportano delle fotografie.

Pertanto, l'acqua prodotta in laboratorio (WMQ) è stata confrontata con un'acqua che viene venduta appositamente per le separazioni in HPLC (c-WMQ) con due metodiche più risolutive.

Inizialmente, sono stati registrati e confrontati gli spettri di assorbimento UV-Vis nel range di lunghezze d'onda 190 - 1100 nm (Fig. 4.4). Pur essendo gli spettri non azzerati, si può notare che gli stessi sono perfettamente sovrapposti e non parallelamente sfalzati (*problematica tecnica dello strumento*). Osservando attentamente gli spettri, si può notare che alla lunghezza d'onda di 190 nm gli spettri di WMQ (in rosso) e c-WMQ (in nero) presentano rispettivamente un assorbimento di 0,42344 e di 0,49187 (u.a.), e quindi una differenza relativa (*più importante*) di 0,068 unità di assorbimento. Il picco presente intorno a 1000 nm è caratteristico dell'acqua. Pertanto, si potrebbe concludere che le due acque non sono molto diverse dal punto di vista della presenza di sostanze che assorbono in questa regione spettrale. Inoltre, sempre per lo stesso ragionamento, l'acqua prodotta in laboratorio (WMQ) dovrebbe essere leggermente più pura.

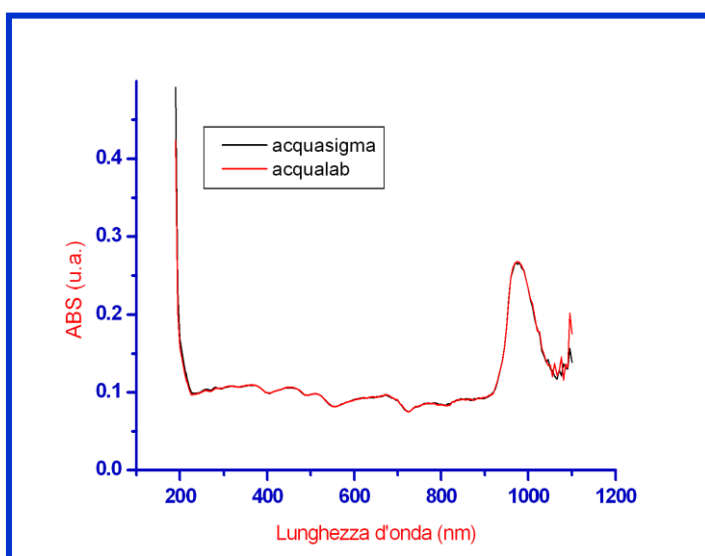


Figura 4.4. Confronto degli spettri di assorbimento UV-Vis dell'acqua prodotta in laboratorio (acqualab = WMQ, in rosso) e di quella comprata (acquasigma = c-WMQ, in nero).

Successivamente, è stato confrontato l'indice di rifrazione delle due acque. Questo parametro rappresenta un fattore molto importante sia nell'identificazione di molecole organiche, sia nella valutazione del loro grado di purezza. Esso viene valutato facendo attraversare una determinata molecola o soluzione, da un fascio di raggi provenienti da una sorgente luminosa che passando da un mezzo ad un altro diversamente rifrangente, modificherà la sua velocità e la sua direzione [31]. L'indice di rifrazione rappresenta, pertanto, per le sostanze solide o liquide o per le soluzioni, il rapporto tra la velocità della luce nell'aria e quella nella sostanza in esame [31]. "Si tratta di una grandezza utilizzata in svariati ambiti della scienza, e la sua misura può essere usata per identificare la natura del materiale in cui si propaga la radiazione. Ad esempio, in chimica vengono comunemente effettuate misure dell'indice di rifrazione con lo scopo di trarne indicazioni analitiche. In funzione dei parametri solvente, lunghezza d'onda incidente e temperatura,

si effettua la misura del parametro utilizzando un rifrattometro. Questa metodica analitica viene utilizzata in vari campi: in campo medico per analisi del sangue e delle urine, in ambito industriale nella analisi dei materiali, per determinare la concentrazione zuccherina in succhi di frutta o il grado alcolico di bevande, per certificare il livello qualitativo o evidenziare sofisticazioni di alimenti quali l'olio, il latte ed il burro"[31]. Dalla misurazione dell'indice di rifrazione è risultato che le due acque, c-WMQ e WMQ, presentano lo stesso valore pari a 1,3334.

Pertanto, si è concluso che l'acqua non sembra essere un parametro che possa aver causato problemi nelle separazioni in HPLC.

4.7.1.2 Stabilità fisica delle soluzioni

Ci si è domandati anche se le soluzioni preparate per l'HPLC e/o le loro miscele fossero stabili fisicamente, cioè se una volta preparate fossero in grado di non precipitare nei loro contenitori nel tempo o a causa della filtrazione. Le soluzioni prese in esame sono: soluzioni madri con e senza IbuNa, DicloNa, o IbuNa e DicloNa, fase mobile completa (FM-2 e FM-17, Par. 4.4.6) miscelata in bottiglia da un operatore. Non sono state prese in esame le fasi mobili create dallo strumento.

È stato possibile osservare che il sale KH_2PO_4 , usato per preparare la soluzione madre 1M (Par. 4.4.2), si scioglie lentamente e questo processo può essere facilitato per agitazione magnetica. La stessa soluzione, lasciata a riposo nelle bottiglie Duran per un tempo che non è stato mai quantificato, floccula. Tuttavia, è possibile ottenere nuovamente una soluzione limpida per agitazione magnetica vigorosa di alcune ore, che contemporaneamente la rende anche tiepida. Questo fenomeno non è mai stato osservato utilizzando il sale c- KH_2PO_4 , il quale non ha mai richiesto l'ausilio dell'agitatore magnetico per poterlo disciogliere. Tutte le altre soluzioni o miscele sono risultate essere stabili. Si riporta che una sola volta il c-TF-50 è precipitato (i.e., soluzione con abbondante polvere bianca in sospensione) nella bottiglia dedicata con pescanti dell'HPLC. In questo caso, la bottiglia dedicata (pulita) era stata riempita con il c-TF-50, preparato il giorno stesso del riempimento e filtrato con filtri in fibra di vetro, nove giorni prima di constatare che fosse precipitato. È molto probabile che la precipitazione sia iniziata già il giorno stesso in quanto furono iniettati solo tre campioni e si ebbero problemi di deriva e di aumento pressorio. Non si è mai trovata la causa di ciò, né questo evento si è manifestato altre volte.

Relativamente alla ricostituzione, per miscelazione manuale in bottiglia Duran, delle miscele passate in HPLC (poche peraltro), si riporta che a parte le normali bollicine che si creano per scuotimento vigoroso, non è stata notata la formazione né di precipitati né di opalescenze fino ad un massimo di 7 giorni (per le soluzioni usate meno) di osservazione.

Questo breve periodo tiene in considerazione il tempo massimo di permanenza nelle bottiglie dedicate durante una settimana di intenso lavoro.

Relativamente al parametro "filtrazione" verrebbe da pensare che questo processo non dovrebbe portare alla formazione di precipitati, visto che il suo scopo è quello di allontanare impurezze le cui dimensioni siano più grandi dei pori del filtro utilizzato. Ciononostante, e sebbene la prima porzione di filtrato è stata sempre scartata, si è pensato che se il filtro, per qualsiasi ragione a noi sconosciuta, rilasciasse delle sostanze o fibre macroscopicamente invisibili, le stesse avrebbero potuto essere fonte di reazioni chimiche e/o fenomeni di nucleazione. Pertanto, si è allestito l'esperimento descritto al Paragrafo 4.4.3 i cui risultati, nessun precipitato visibile prima e dopo centrifugazione, erano aspettati perché i filtri utilizzati non erano stati scelti a caso.

Infatti, nel catalogo della Whatman™ [32] viene riportato che i filtri in microfibra di vetro sono prodotti solo con vetri borosilicati, sono chimicamente inerti, e non possiedono siti d'interazione di tipo "binding". Pertanto, possono essere considerati dei filtri di profondità composti da una rete di microfibre capillari, che combinano alte velocità filtranti con un'alta capacità ritentiva di particolato molto fine, anche appartenente al range sub-micrometrico. Infine, tra le applicazioni suggerite dalla casa madre per quelli da noi scelti (i.e., GF/F, cut-off: 0,7 μm) viene riportata la filtrazione di campioni e solventi prima dell'analisi in HPLC. Gli stessi vengono anche usati per un test dell'EPA [33] relativo a sostanze tossiche presenti in liquidi a basse concentrazioni.

I filtri Corning® in acetato di cellulosa, sebbene non siano prodotti per applicazioni in HPLC, furono usati solo due volte in quanto sterili e dotati di pori più piccoli (cut-off: 0,22 μm) e solo per filtrare il c-TF-50 (Par. 4.4.3). Questi filtri vengono comunemente usati per filtrare tamponi e terreni di coltura. Si evidenzia che questi filtri contengono una quantità (< 1%) di un non-esplicitato ma non tossico agente umettante che sarebbe stato possibile togliere lavando preventivamente il filtro con acqua ultrapura e calda [34]. Sebbene noi non abbiamo osservato nessun precipitato (Par. 4.4.3) nei campioni lasciati a riposo per 63 giorni, è necessario indicare che la filtrazione è risultata stranamente lenta.

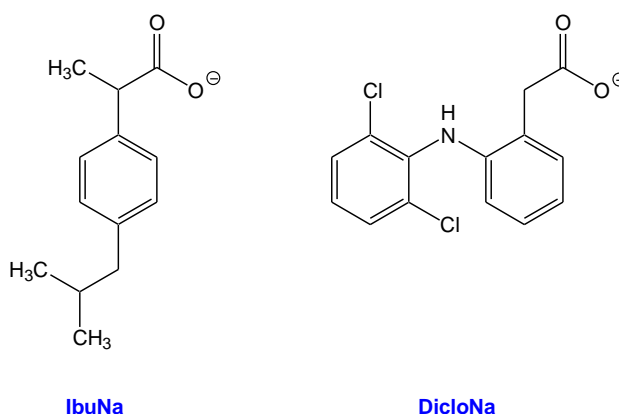
Infine, le provette in polipropilene dove furono conservati i tamponi filtrati sono chimicamente inerti alla maggior parte di sostanze/solventi organici [34], e pertanto non sono state considerate come possibili fonti di nucleazione.

Relativamente ai filtri a siringa in Nylon con i quali sono stati filtrati i campioni prima di essere iniettati in HPLC (Par. 4.4.7), si ricorda che i filtri in Nylon sono idrofilici di natura e quindi non sono presenti tensioattivi o umettanti. Inoltre, sia il filtro (nylon appunto) che il contenitore (polipropilene) sono resistenti alla maggior parte delle sostanze chimiche [35]. Si riporta, inoltre, che la filtrazione non ha mai richiesto forze eccessive, né sono stati riscontrati salti pressori, pertanto si esclude che la membrana di nylon possa essersi rotta durante la filtrazione [35].

Conclusioni: Queste osservazioni inducono a ritenere che le soluzioni possedessero una stabilità fisica adeguata; la precipitazione di sali in colonna o in altra parte dello strumento per ragioni strettamente correlate alla stabilità fisica delle soluzioni è stata esclusa.

4.8 Caratterizzazione delle molecole modello

Le due molecole utilizzate in questo studio sono l'ibuprofene sale sodico (IbuNa) ed il diclofenac sale sodico (DicloNa). Sebbene, entrambe appartengano alla classe dei farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS), la prima (IbuNa) rappresenta la vera molecola modello che sarà utilizzata negli studi futuri, mentre il DicloNa è stato usato come standard interno (SI) per la metodica di separazione in HPLC (vedi oltre).



Proprietà chimico-fisiche		Molecola		
		IbuNa (L1)	IbuNa (L2)	DicloNa
Peso molecolare *	(Da)	228,26	228,26	318,13
Punto di fusione †	(°C)	199,6 / 199,8	199,6 / 199,8	--
Punto di fusione sperimentale	(°C)	193,67 / 195	195,33 / 197,33	--
Purezza confezione comprata	(%) */**	≥ 98 / 100	≥ 98 / 99,5	≥ 98 / 99
Contenuto in acqua	(%) */**	-- / 14	≤ 15 / 13,2	--
Solubilità in acqua	(mg/mL) */**	100 / --	100 / --	50 / 50
Solubilità in etanolo	(mg/mL) */**	50 / 50	50 / 50	--
CLogP §		-0,161	-0,161	0,8862
pKa (forma acida) ††		4,5 o 5,2	4,5 o 5,2	4

* Dati forniti dalla Sigma-Aldrich, vedi ref. [36, 37] per IbuNa e [38] per DicloNa.

** Dati forniti dalla Sigma-Aldrich nei certificati di analisi dei vari lotti, vedi ref. [36] per IbuNa (L1), [37] per IbuNa (L2) e [38] per DicloNa † [41] e [42].

†† Dati derivanti dalla seguente nota bibliografica [39] per Ibu forma acida e [40] per DicloNa.

§ Calcolato con il software ChemDraw Ultra 6.0.

Figura 4.5. Confronto della struttura chimica e dei parametri chimico-fisici delle molecole IbuNa (lotto 1 e 2) e DicloNa. Le concentrazioni relative alle solubilità sono indicate come range, in cui il primo valore in nero è l'ultima concentrazione solubile, mentre il secondo valore in rosso è la concentrazione alla quale si ha la precipitazione.

4.8.1 Ibuprofene sale sodico

La maggior parte delle caratterizzazioni si è concentrata sulla molecola IbuNa perché i due lotti hanno mostrato delle differenze.

4.8.1.1 Aspetto e odore

Entrambi i lotti appaiono come una polvere bianca. Tuttavia, il primo lotto, nel tempo, ha manifestato un odore acre quasi sgradevole, e la polvere ha formato dei grumi molto grossi (Fig. 4.6, sinistra). Nel caso del lotto 2, la polvere presenta solo dei piccoli grumi ed ha un odore particolare ma non sgradevole (Fig. 4.6, destra). È riportato in letteratura, che la forma acida ha in effetti un odore particolare [39]. Analisi successive sono state fatte per confermare la presenza della forma acida (vedi oltre).

Sebbene i due lotti contenevano una certa quantità di acqua già in origine (vedi tabella in Fig. 4.5), si ipotizza, anche in base ad alcuni risultati ottenuti in analisi discusse in seguito, che il primo lotto abbia aumentato il suo contenuto di acqua nel tempo. Pertanto, si può concludere che la conservazione in armadio semplice (*suggerita dalla casa madre*) non sia adeguata.



Figura 4.6. Aspetto macroscopico dell'IbuNa, lotto 1 a sinistra e lotto 2 a destra.

4.8.1.2 pH

In Tabella 4.7 vengono riportati i valori di acidità delle soluzioni maggiormente utilizzate con e senza IbuNa (entrambi i lotti). Prima di qualsiasi analisi dei dati, si vuole precisare che tutti i solventi, ad eccezione dell'WMQ, erano stati preparati prima delle misure; inoltre, i tamponi TF-50 e TF-25 come le FM derivanti contengono fosfati per HPLC, il PBS non è

filtrato, mentre l'WMQ è stata acquisita il giorno in cui si sono preparate le soluzioni supplementate con IbuNa.

I dati rivelano che (i) l'aggiunta dell'ACN al tampone fosfato fa aumentare il pH proporzionalmente alla quantità di sali fosfato presenti nel tampone. L'aggiunta di IbuNa, ad una quantità molto alta per l'HPLC (1 mg/mL), alle FM-2 e FM-17 non varia di molto il pH. È sembrato invece, curioso la modificazione dei millivolt registrati insieme al pH per i campioni in TF-25 e FM-17 (vedi confronto delle due serie), e per la quale non abbiamo una spiegazione.

Tabella 4.7. Acidità di alcune soluzioni di IbuNa

IbuNa		Valori di pH					
Lotto	Concentrazione (mg/mL)	WMQ	PBS	TF-50	FM-2	TF-25	FM-17
/	0,00	6,77	7,42	6,84/7,00*	7,60*	7,00	7,39
1	1,00	6,78	7,43	6,86	7,58*	6,94	7,38
2	1,00	6,86	7,38	6,86	7,61*	6,87	7,38
IbuNa		Valori di mV					
Lotto	Concentrazione (mg/mL)	WMQ	PBS	TF-50	FM-2	TF-25	FM-17
/	0,000	21	- 6	26/17*	- 15*	- 5	6
1	1,000	22	- 6	25	- 14*	21	-4
2	1,000	22	- 6	26	- 16*	25	-4
IbuNa		Valori di Temperatura (°C)					
Lotto	Concentrazione (mg/mL)	WMQ	PBS	TF-50	FM-2	TF-25	FM-17
/	0,000	25,2	25,0	25,1/23,6*	23,5*	23,7	25,0
1	1,000	23,4	23,7	23,5	23,6*	23,5	23,4
2	1,000	23,4	23,4	23,2	23,4*	23,4	23,5

4.8.1.3 Punto di fusione

Il punto di fusione di una sostanza rappresenta la temperatura, alla pressione atmosferica, nella quale si ha contemporaneamente la presenza della fase liquida e di quella solida, ed è una costante per ogni composto. Esso risulta essere anche un metodo sperimentale per ottenere utili informazioni sulla identità, purezza e stabilità al calore di una sostanza [41]. Infatti, piccole quantità di impurezze eventualmente presenti, determinano un abbassamento del punto di fusione oppure un incremento del range di temperatura di fusione, 0,5 - 1 °C, che rappresenta invece, l'intervallo di fusione per le sostanze pure. Ad ogni modo, si può affermare che più il punto di fusione si avvicina al valore tabulato riferito ad una determinata sostanza, e più essa è pura [41].

Inoltre, l'identificazione di una sostanza, può essere eseguita attraverso la determinazione del "punto di fusione in miscela". In questo caso, per verificare che due

sostanze siano identiche, una piccola quantità della sostanza incognita (A) viene miscelata con un adeguata quantità di quella nota (B), e si determinano i tre punti di fusione (i.e., A, B, e miscela). Se il punto di fusione di A si abbassa con la miscelazione, significa che A e B sono due sostanze differenti, mentre se il punto di fusione resta lo stesso sono uguali. [41].

Pertanto, nel nostro caso, la misurazione del punto di fusione è stata effettuata per verificare le differenze tra i due lotti di IbuNa (Par. 4.5.1.2). I dati sono mostrati in Tabella 4.8, dove è possibile identificare la temperatura di fusione iniziale "i" (i.e., la temperatura in cui il primo cristallo fonde, la temperatura di fusione finale "f" (i.e., la temperatura in cui tutta la polvere ha fuso), e quanto è grande l'intervallo di fusione (i.e., valore "f - i").

Tabella 4.8. Temperature di fusione dell'IbuNa

Replica	Temperatura (°C)								
	IbuNa (L1)			IbuNa (L2)			Miscela (L1+L2)		
	i	f	f-i	i	f	f-i	i	f	f-i
1	193	195	2	195	197	2	191	193	2
2	194	195	1	196	198	2	192	195	3
3	194	195	1	195	197	2	192	195	3
Media	193,67	195,00	1,33	195,33	197,33	2,00	191,67	194,33	2,67
SD	0,58	0,00	0,58	0,58	0,58	0,00	0,58	1,15	0,58

I dati presentati mostrano che le temperature di fusione (i ed f) di IbuNa-L2 sono maggiori di circa 2°C rispetto a quelle osservate per il IbuNa-L1. Inoltre, quando le due sostanze si trovano in miscela, la temperatura di fusione iniziale si abbassa di 2°C e di 3,7°C rispetto a quelle di IbuNa-L1 e IbuNa-L2, mentre la temperatura di fusione finale si abbassa di 0,7°C e di 3°C rispetto a quelle di IbuNa-L1 e IbuNa-L2. Le deviazioni standard sono così piccole che trasformando questi dati in un grafico (Fig. 3.4) si nota come dal punto di vista matematico, questi valori siano diversi fra loro.

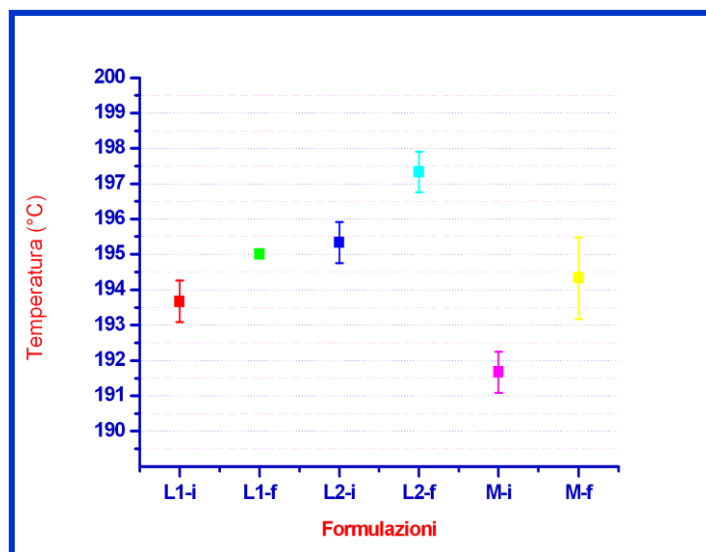


Figura 4.7. Temperature iniziali e finali di fusione dei diversi lotti di IbuNa e della loro miscela

In letteratura si è trovato che il punto di fusione del sale sodico dell'ibuprofene nella sua forma racemica è di 199,6°C [42] e di 199,8°C [43]. Il valore dato in questo ultimo caso è la media dei valori di un range compreso tra 198,56° - 201,04°C [43]. In entrambi i casi, non viene specificato l'intervallo di fusione. Inoltre, gli autori delle due pubblicazioni specificano che l'IbuNa ha due molecole di acqua di cristallizzazione [42,43], quindi è diidrato, anche se è venduto come se ne fosse privo.

Conclusioni: i punti di fusione dei nostri lotti sono abbastanza vicini ai valori di fusione riportati in letteratura. Sembrerebbe che tra i due, il secondo lotto è più puro o contiene una quantità di umidità inferiore. Ciò concorda con l'aspetto macroscopico delle polveri nei loro contenitori originali (Fig. 3.3).

4.8.1.4 Spettroscopia IR

Il sale dell'Ibu è stato sottoposto anche ad analisi IR (Par. 4.5.1.5). Si ricorda che sono stati analizzati i due lotti di IbuNa (non trattati né manipolati) ed inoltre, un terzo lotto ottenuto solubilizzando una piccola porzione di IbuNa-L2 in EtOH prima di essicarla a 135°C. Nelle Figure 4.8 – 4.10 sono presentati i relativi spettri, dove i valori presenti nelle ascisse rappresentano le frequenze espresse come numero d'onda (cm^{-1}), mentre nelle ordinate troviamo la trasmittanza (%). Inoltre, i dati relativi ai segnali (stiramenti ed armoniche) dei principali gruppi funzionali che dovrebbero essere (giaciture teoriche [44]) e che sono (giaciture sperimentali) presenti negli spettri sono riportati in Tabella 4.9. Nella stessa tabella sono riportate anche le giaciture (colonna Sigma in Tab. 4.9) di uno spettro IR, acquisito in

modalità ATR, inviatici dai fornitori (non mostrato) dopo aver acquisito i nostri spettri, e relativo alla molecola IbuNa-L2.

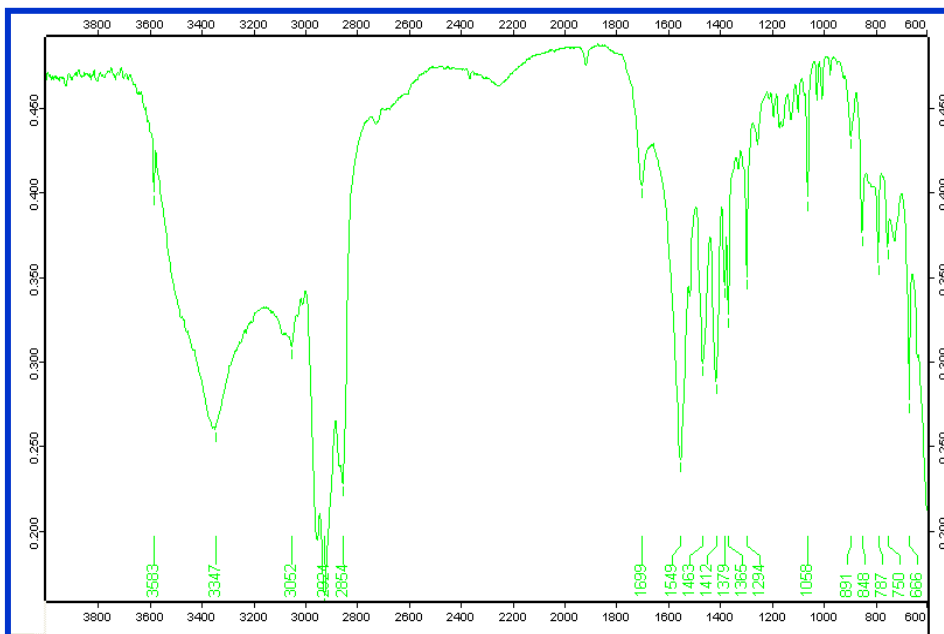


Figura 4.8. Spettro IR dell'IbuNa-L1



Figura 4.9. Spettro IR IbuNa-L2

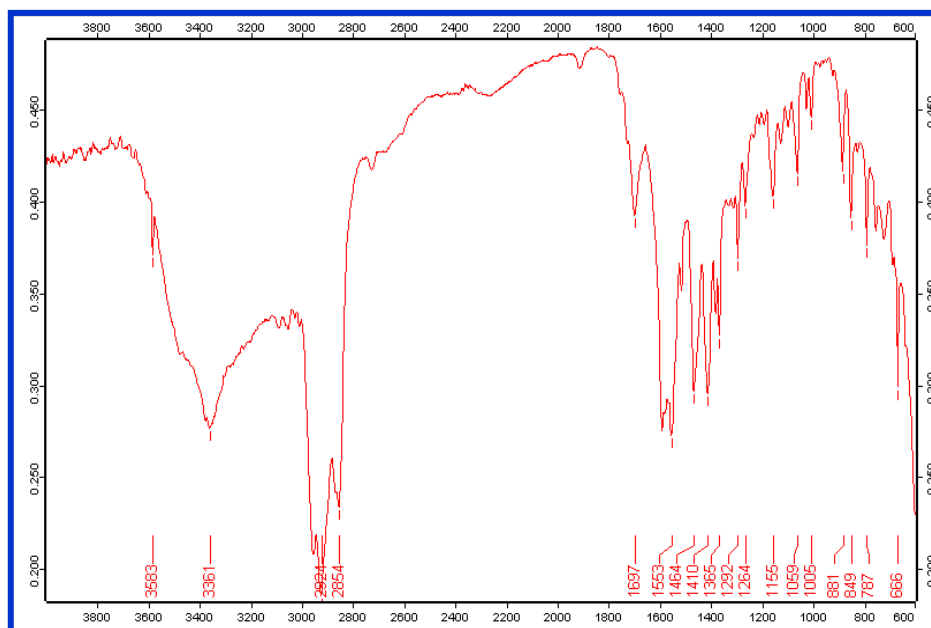


Figura 4.10. Spettro IR dell'IbuNa-L2 sciolto in EtOH ed essiccato a 135°C

Tabella 4.9. Segnali osservati negli spettri IR e gruppi funzionali corrispondenti

Legame	Frequenza (cm ⁻¹)				
	Teorico	Sigma	IbuNa-L1	IbuNa-L2	IbuNa-L2-135°
O-H (ass)	--	3.303	3.357	3.347	3.361
O-H (lib)	--		3.583	3.583	3.583
C=O	< 1.700	1.696	1.698	1.699	1.697
C=C (Ar)	1.420 - 1.600		1.549	1.549	1.553
C-H (Ar)	3.030	3.045, 3.027*	3.051	3.062	3.050, 3.106 *
Armoniche (Ar)	2.000 - 1.600	1.910	1.912,5	1.912,5	1.925
CO-O ^(l) (asim)	1.550 - 1.650	1.535	1.549	1.549	1.553
CO-O ^(l) (sim)	1.400	1.401	1.412	1.412	1.410

* Banda sdoppiata. NB: giaciture in corsivo per segnali deboli. "ass": associato, "lib": libero, "Ar": arile, "asim": asimmetrico, "sim": simmetrico.

Osservando gli spettri IR (Fig. 4.8 - 4.10) la prima impressione è che siano molto simili fra loro, forse con qualche giacitura più definita in alcuni casi, ma presenti nelle stesse posizioni. L'osservazione congiunta di spettri (Fig. 4.8 - 4.10) e dati tabulati (Tab. 4.9) ha fatto emergere i seguenti commenti che si basano sull'ipotesi di aver comprato un sale anidro. (i) Nella regione delle frequenze superiori a 3.100 cm⁻¹, si possono osservare due picchi, uno stretto e poco intenso (3.583 cm⁻¹, stessa giacitura per i nostri spettri) ed uno allargato ed intenso (> 3.347 cm⁻¹, diversa giacitura per i nostri spettri). Questi due segnali si riferiscono, nel caso del picco più stretto, allo stiramento dell'OH libero, mentre nel caso del picco allargato, allo stiramento dell'OH associato, probabilmente coinvolto in un legame idrogeno [44]. Partendo dal presupposto che il sale non doveva contenere

acqua, questi due segnali non ci sarebbero dovuti essere. Tuttavia, il fatto che si tratti di una molecola di-idrata è evidenziato dalla presenza del segnale dell'OH associato, presente anche nello spettro della Sigma (seppur a giaciture più basse). Inoltre, la presenza del segnale dell'OH libero fa pensare alla presenza di umidità.

Ci si potrebbe domandare se sia presente anche la forma acida. In questo caso si dovrebbero vedere i segnali del dimero che si formerebbe tra due molecole di acido (i.e., OH libero: 3.520 cm^{-1} ed OH associato: banda larga nella regione $2.700 - 3.300\text{ cm}^{-1}$ [44]) ed il segnale del carbonile di un acido che cade normalmente nel range di frequenze superiore ai 1.700 cm^{-1} (i.e., ca. 1760 cm^{-1} per la forma monomera, $1.705 - 1.720\text{ cm}^{-1}$ per la forma dimera [44]). Oberoi *et al.* hanno evidenziato che il carbonile dell'ibuprofene (forma acida) cade a 1.740 cm^{-1} [45]. Pertanto, considerando che i nostri segnali dell'OH sono più alti e che mancherebbe il segnale del carbonile dell'acido (Fig. 4.8 - 4.10) si può concludere che se l'acido è presente, lo è ad una concentrazione insignificante rispetto alla forma salificata.

La presenza del sale è ancora identificabile attraverso il segnale del carbonile (nei tre casi $1.697 - 1.699\text{ cm}^{-1}$) ed i segnali di stiramento simmetrico (1.412 cm^{-1}) ed asimmetrico (1.549 e 1.553 cm^{-1}) dello ione carbossilato (Tab. 4.9). I nostri valori sperimentali sono abbastanza vicini fra loro nei tre casi, mentre sono un po' più lontani da quelli dello spettro della Sigma (Tab. 4.9). Altri autori riportano per il sale di-idrato uno stiramento asimmetrico con giaciture comprese nel range $1.540 - 1.650\text{ cm}^{-1}$ [42, 46].

I segnali dell'anello aromatico non vengono commentati sebbene presenti (vedi Tab. 4.9).

Conclusioni: Dal confronto tra gli spettri, e tra i valori delle frequenze dei vari picchi, si evince che il primo ed il secondo lotto non presentano palesi differenze tra loro, mentre queste si osservano per il lotto 135°C . Infatti, osservando le frequenze (Tab. 4.9) si notano dei valori più alti per il segnale dell'OH associato, dello ione carbossilato, e per il segnale del doppio legame $\text{C}=\text{C}$ aromatico; mentre valori più bassi per il segnale del carbonile e per lo stiramento simmetrico dello ione carbossilato. È probabile che il trattamento termico post-dissoluzione in etanolo, possa aver degradato in parte il composto.

Confrontando inoltre, le giaciture dei tre spettri con quelle presenti nello spettro fornito dalla casa produttrice Sigma, si nota che in quest'ultimo è presente il picco relativo all'OH associato a 3.303 cm^{-1} mentre non si nota il picco più sottile dell'OH libero; si potrebbe dunque ipotizzare che l'IbuNa sia per sua natura una sostanza igroscopica e che tenda ad assorbire umidità.

4.8.1.5 Spettroscopia NMR

I campioni analizzati all'IR, sono stati studiati anche all'NMR. Nelle Figure 4.11 - 4.13 si riportano rispettivamente gli spettri $^1\text{H-NMR}$ di IbuNa-L1, IbuNa-L2, e IbuNa-L2-135°.

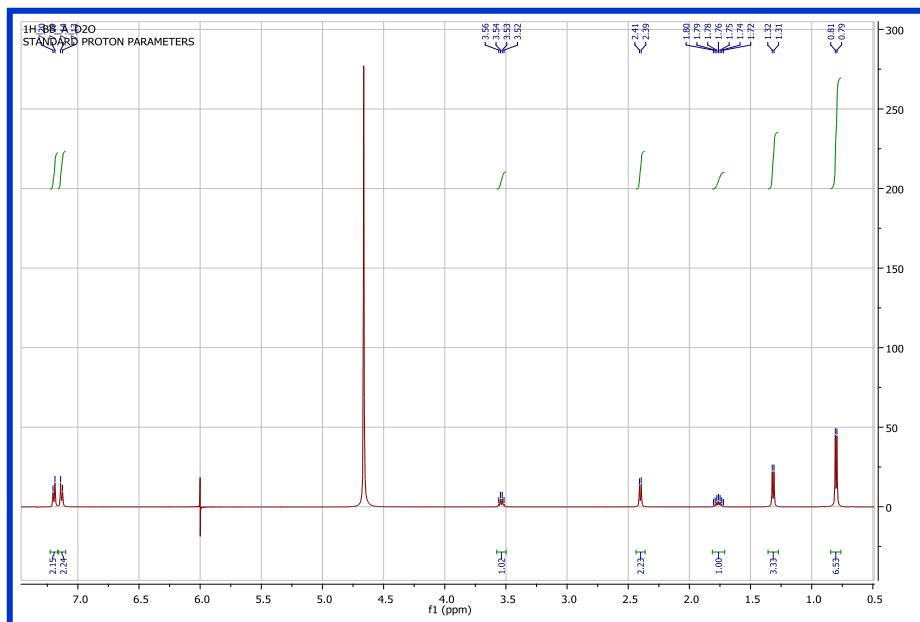


Figura 4.11. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di IbuNa secondo lotto in D_2O

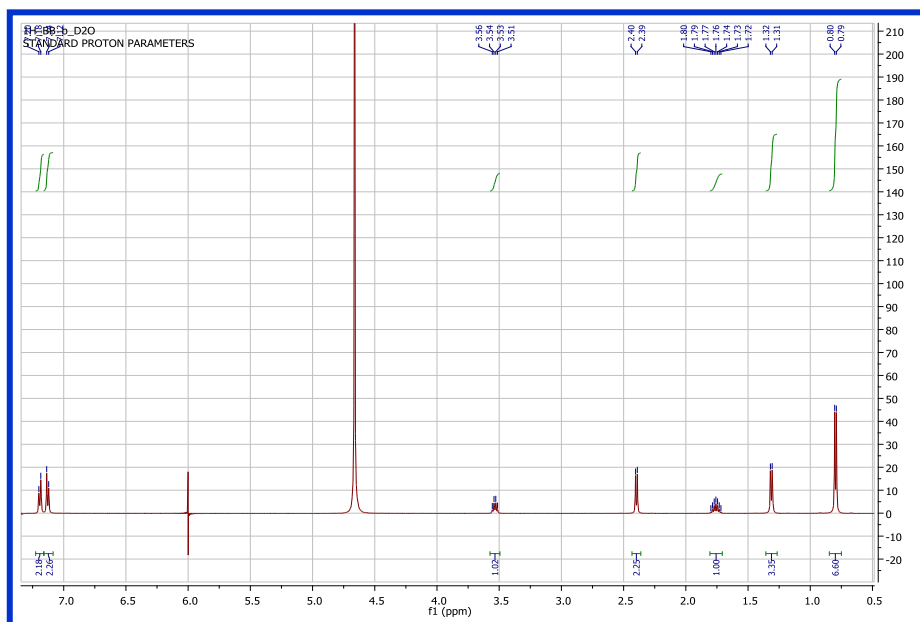


Figura 4.12. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di IbuNa primo lotto in D_2O

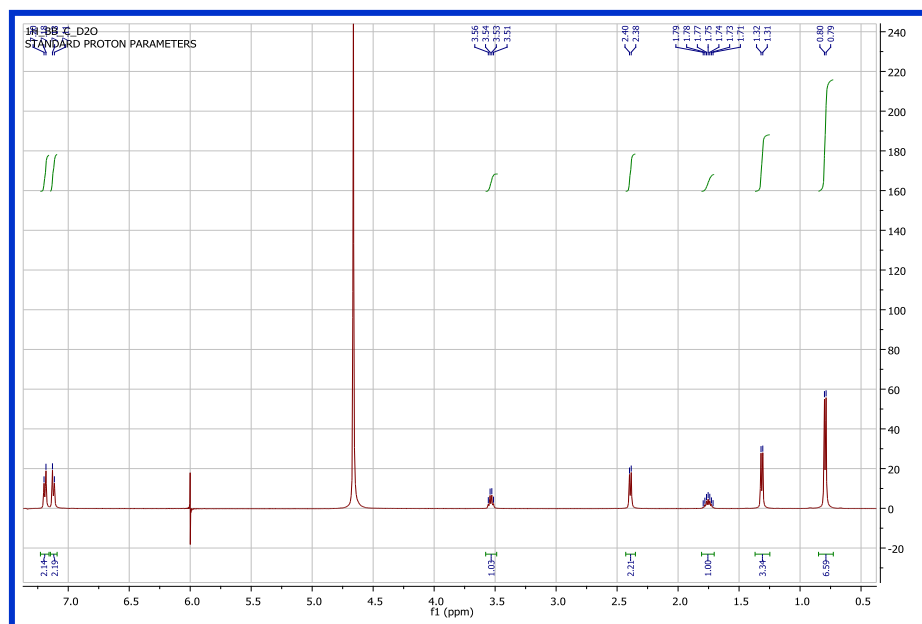


Figura 4.13. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di IbuNa, secondo lotto 135°C in D_2O

In ognuno di questi spettri possiamo individuare: lo spettro in bordeaux; un asse delle X che rappresenta lo spostamento chimico o *chemical shift* " δ " indicato con "f1" negli spettri (ppm); un asse delle Y che rappresenta l'intensità (Hz); i valori numerici sotto allo spettro in bordeaux sono le aree (in cm); i valori numerici nella parte più alta dello spettro rappresentano gli spostamenti chimici dei picchi presenti (ppm; in caso di molteplicità si prende il valore medio). Si ricorda inoltre, che per lo spettro $^1\text{H-NMR}$, le aree sono direttamente proporzionali al numero dei protoni. Inoltre, per agevolare l'interpretazione dei dati presenti nelle Figure 4.11 - 4.13, gli stessi sono stati tabulati in Tabella 4.10.

Da una prima osservazione degli spettri, si nota che sono presenti 7 segnali, sebbene il numero complessivo dei protoni della molecola sia 17. Ciò può essere spiegato dai fenomeni di equivalenza tra i diversi protoni, dati dalla presenza di simmetrie nella molecola, che in ultimo determina che molti di questi vengano rappresentati contemporaneamente dallo stesso segnale [47].

Un esempio può essere fatto considerando i protoni dell'anello aromatico che complessivamente danno origine a due segnali, che cadono rispettivamente a circa 7,19 e 7,13 ppm. L'IbuNa è infatti, chimicamente un benzene para-disostituito e presenta un asse di simmetria attraverso i sostituenti dell'anello (linea tratteggiata nella figura della Tab. 4.10). In questo modo, i due protoni aromatici in posizione orto rispetto al sostituito che presenta il gruppo carbonilico (sopra la linea tratteggiata) possono essere inter-scambiati l'uno con l'altro senza che si modifichi la molecola, e per questo motivo sono detti "equivalenti" e vengono rappresentati dallo stesso segnale [47]. Lo stesso accade per gli altri due protoni aromatici legati ai carboni in orto alla catena alchilica (sotto la linea tratteggiata), che daranno origine all'altro segnale. La presenza di questi due segnali è

molto semplice da individuare ed è sempre indicativa del fatto che la molecola possiede un benzene con due sostituenti legati in posizione para tra loro [47], come nel nostro caso.

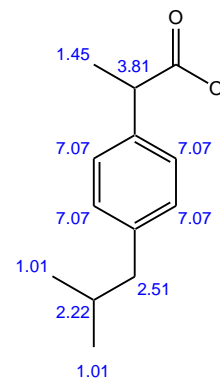
Tabella 4.10. Interpretazione degli Spettri NMR

Attribuzione	Molteplicità	Teorico*	Chemical Shift (ppm)		
			IbuNa-L1	IbuNa-L2	IbuNa-L2-135°
H Ar	<i>d</i>	7,07	7,19	7,195	7,19
H Ar	<i>d</i>	7,07	7,13	7,135	7,12
CH	<i>q</i>	3,81	3,54	3,54	3,54
CH ₂	<i>d</i>	2,51	2,40	2,40	2,39
CH	<i>s</i>	2,22	1,76	1,76	1,75
CH ₃	<i>d</i>	1,45	1,30	1,30	1,30
CH ₃	<i>d</i>	1,01	0,80	0,80	0,80

Attribuzione	Molteplicità	Teorico	Aree (cm)		
			IbuNa-L1	IbuNa-L2	IbuNa-L2-135°
H Ar	<i>d</i>	2	2,15	2,18	2,14
H Ar	<i>d</i>	2	2,24	2,26	2,19
CH	<i>q</i>	1	1,02	1,02	1,03
CH ₂	<i>d</i>	2	2,25	2,23	2,21
CH	<i>s</i>	1	1,00	1,00	1,00
CH ₃	<i>d</i>	3	3,35	3,33	3,34
CH ₃	<i>d</i>	6	6,60	6,53	6,59

* Calcolato con Chemdraw. Molteplicità osservata e teorica.: *d*: doppietto, *q*: quadrupletto, *s*: singoletto

Molteplicità osservata e teorica. *d*: doppietto, *q*: quadrupletto, *s*: singoletto



Per quanto riguarda le molteplicità, queste sono date dai fenomeni di accoppiamento che avvengono tra i protoni separati tra loro da non più di 3 legami. La molteplicità è data in tutti questi casi dal numero dei protoni con il quale accoppia il protone in esame più uno; questo non viene rispettato per i protoni dell'anello aromatico in quanto le costanti di accoppiamento sono differenti. Pertanto, nel caso in cui un protone sia accoppiato con 3 protoni vicini (nella catena alchilica), si avrà un quadrupletto, come nel caso del CH prossimale al gruppo carbossilico (chemical shift teorico: 3,81 ppm) che accoppia con i 3 protoni del CH₃ (chemical shift teorico: 1,45 ppm).

Si potrebbe anche discutere sulla molteplicità dei protoni aromatici, ma non ci dilungheremo a riguardo.

In conclusione, dall'osservazione degli spettri, non si possono dare informazioni relative alla presenza di umidità nel campione in quanto sono stati tutti registrati utilizzando come solvente acqua deuterata. Pertanto, l'umidità, se presente, verrebbe coperta dal solvente, ed il segnale del protone dell'OH, se eventualmente fosse presente la forma libera dell'acido, scomparirebbe a causa del rapido scambio con il deuterio.

L'unica osservazione che può essere fatta è che i picchi presenti confermano l'effettiva struttura dell'Ibuprofene, e che non esistono particolari differenze riscontrabili tra i tre diversi spettri.

4.7.1.6 Assorbimento UV-Vis e curve di calibrazione

Questo paragrafo consta di una parte di analisi di tipo semi-qualitativo e di un'altra di tipo quantitativo.

Analisi semi-qualitativa

Si ricorda che tutti gli spettri presentati in questa sezione sono azzerati a 350 nm e normalizzati rispetto alla soluzione in cui l'IbuNa si trova disciolto, che viene presa come bianco (anch'essa azzerata).

Nelle Figure 4.14 - 4.16 è possibile confrontare l'aspetto degli spettri UV-Vis di una soluzione di IbuNa (lotto 1 e 2) in WMQ, PBS e TF-25.

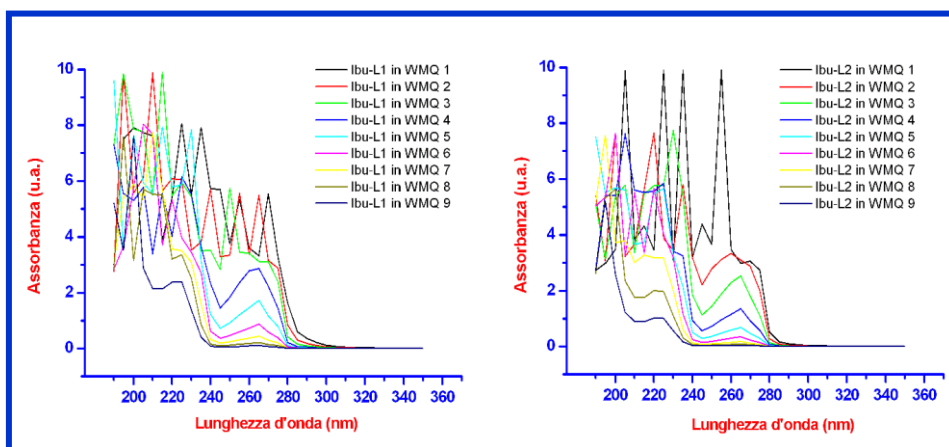


Figura 4.14. Spettro UV-Vis di IbuNa-L1 (sinistra) e IbuNa-L2 (destra) in WMQ. In questa figura sono mostrati gli spettri di nove soluzioni acquose (1 - 9 nella legenda) le cui concentrazioni sono seriali a partire dalla madre (1) 1 mg/mL.

Dalla Figura 4.14 emerge un differente assorbimento dei due lotti di IbuNa nonostante le soluzioni madri abbiano la stessa concentrazione di partenza (1 mg/mL). Infatti, mentre per l'IbuNa-L1 le prime tre diluizioni risultano essere troppo concentrate da non presentare un picco definito, nel caso dell'IbuNa-L2, il picco inizia a definirsi dalla diluizione 2. Questo potrebbe far ipotizzare che nonostante la pesata sia stata la medesima, in realtà siano state pesate quantità differenti a causa della presenza di acqua superflua nella polvere.

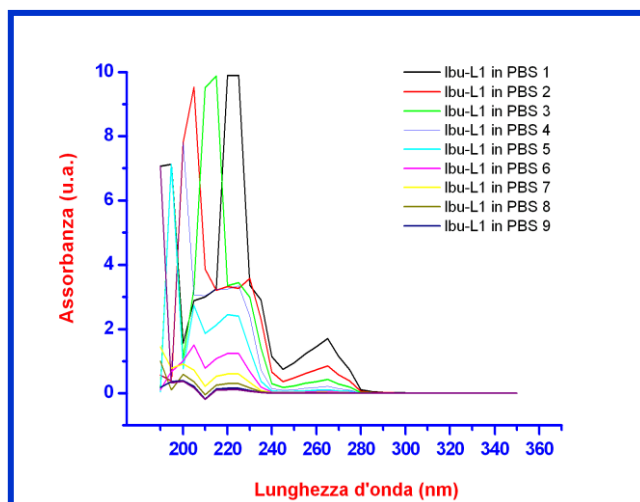


Figura 4.15. Spettro UV-Vis di IbuNa (L1) in PBS. In questa figura sono mostrati gli spettri di una soluzione 1 (madre 1 mg/mL) e di otto soluzioni ottenute per diluizione seriale dalla madre

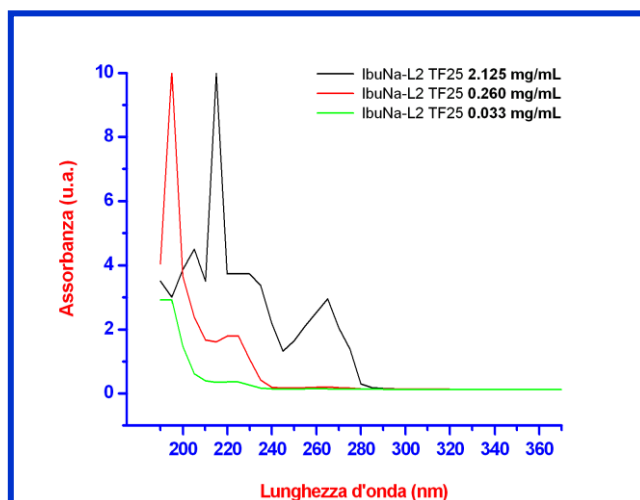


Figura 4.16. Spettro UV-Vis di IbuNa (L2) in TF-25. In questa figura sono mostrati gli spettri di tre soluzioni acquose le cui concentrazioni sono rispettivamente 2,125, 0,26, e 0,033 mg/mL

Dalle Figure 4.14 - 4.16 si può notare che nei tre solventi il massimo di assorbimento dell'IbuNa è sempre posizionato a 265 nm, e non varia con la diluizione. Il picco di assorbimento non è simmetrico ma presenta una spalla a destra (ca. 275 nm) forse un po' più evidente in TF-25.

Nella Tabella 4.11 sono riassunte le intensità di assorbimento in funzione della concentrazione di IbuNa a 265 nm.

Tabella 4.11. Assorbanza a 265 nm dell'IbuNa in condizioni differenti

Fig.	Lotto	Solv.	Concentrazioni (mg/mL)							
			2,125	1,000	0,500	0,265	0,250	0,125	0,063	0,033
4.14	1	WMQ		1,764	0,897		0,514	0,302		
4.15	1	PBS		1,700	0,856		0,431	0,214	0,108	0,054
4.16	2	TF-25	2,829			0,207				0,141

Osservando i valori appena proposti (e creando un grafico che non si mostra) si può concludere che i valori decrescono proporzionalmente con le concentrazioni. Inoltre, le assorbanze in TF-25 (a parte 0,207 u.a. di ABS) seguono l'andamento degli altri valori. Se non si fosse a conoscenza del fatto che sono tre soluzioni differenti e che sono stati usati due lotti differenti, si potrebbe dire che stiamo guardando un triplicato di una stessa soluzione.

Nella Figura 4.17 si mostra un confronto degli spettri di assorbimento UV-Vis del primo (Fig. 4.17 sinistra) e secondo (Fig. 4.17 destra) lotto di IbuNa, disciolto in WMQ, prima (0 h) e dopo conservazione in stufa a 100°C per un tempo variabile dalle 24 alle 168 ore. In entrambi i casi si nota che l'assorbimento a 265 nm del sale mantenuto a temperatura ambiente (linea nera, 0 h in Fig. 4.17, destra e sinistra) è inferiore agli altri picchi. Si osserva inoltre, che la *forma del picco* non è sempre identica nei vari campioni appartenenti ad un medesimo lotto, ed inoltre solo alcuni sono simili a quelli mostrati in Figura 4.14.

Tabulando gli assorbimenti degli spettri appena mostrati (Tab. 4.12) si può notare che i due lotti si comportano similmente nelle prime 72 ore.

Infatti, nelle prime 24 ore le assorbanze crescono, per poi lentamente diminuire nelle successive 72 ore. A questo punto, il comportamento diverge, in quanto il lotto 1 sembra non gradire la permanenza a 100°C oltre le 96 ore, mentre ciò non capita al lotto 2.

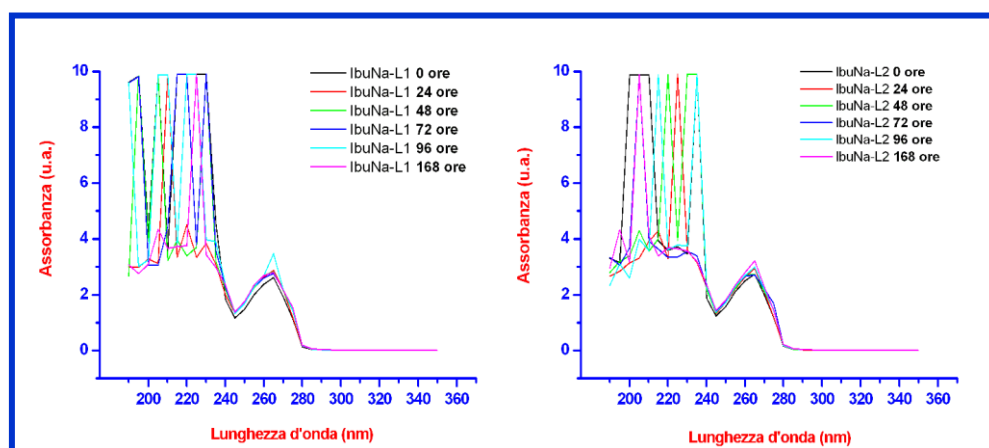


Figura 4.17. Spettri UV-Vis di IbuNa (L1 a sinistra, L2 a destra) dopo esposizione a 100°C per il tempo indicato e solubilizzati in WMQ

Tabella 4.12. Assorbimento a 265 nm in funzione del tempo di esposizione a 100°C

IbuNa		Tempo (h) a 100°C					
Lotto	Conc.* (mg/mL)	0	24	48	72	96	168
1	2,125	2,619	2,876	2,829	2,768	3,475	2,801
2	2,125	2,742	2,943	2,726	2,718	2,995	3,216

* ottenuta per diluizione dalla soluzione madre 4,25 mg/mL

In Figura 4.18 viene mostrato il confronto tra gli spettri UV-Vis (in WMQ) di tre soluzioni di IbuNa-L2 conservato nel contenitore originale in un armadio (A nella Fig. 4.18) e conservato per 48 giorni all'interno di un essiccatore di vetro non ambrato (B nella Fig. 4.18) contenente nel suo fondo del gel di silice ed un becker con PoFosf (Par. 4.5.1.1): entrambi con lo scopo di eliminare l'umidità. Le concentrazioni messe a confronto sono: 2,125, 1,062, e 0,531 mg/mL.

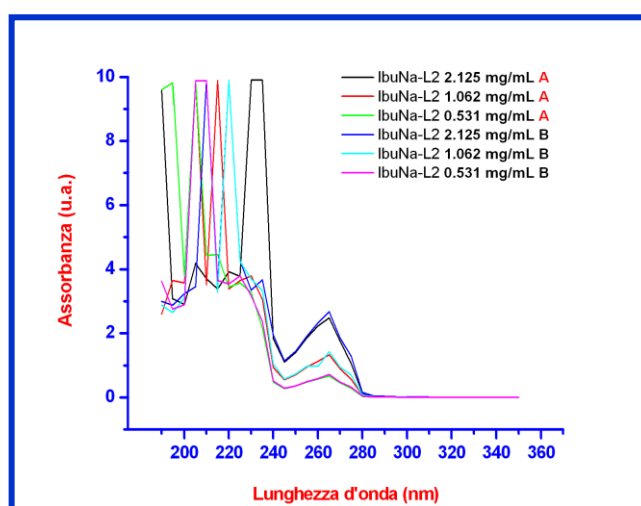


Figura 4.18. Confronto tra spettri relativi a diverse conservazioni di IbuNa-L2. Sono messi a confronto gli spettri delle soluzioni in WMQ in un caso conservato nel contenitore originale (A) nell'altro in una campana di vetro contenente gel di silice e PoFosf (B). In entrambi i casi le concentrazioni sono rispettivamente: 2,125, 1,062 e 0,531 mg/mL.

Osservando la Figura 4.18 si può notare che il picco di assorbimento massimo si mantiene in tutti i casi a 265 nm, la forma del picco non sempre presenta la spalla a destra (275 nm) come precedentemente osservato per il lotto 1 (vedi Fig. 4.14), e che la variazione in unità di assorbimento è minima e maggiormente visibile alle concentrazioni più alte. Per esempio, le assorbanze registrate a 265 nm, per i campioni 1A e 1B (2,125 mg/mL) sono rispettivamente di 2,483 u.a. e di 2,676 u.a.. Anche questo risultato conferma che il sale IbuNa è in grado di assorbire un po' di umidità, pertanto necessita di una conservazione e di una manipolazione adeguate. Ad ogni modo, non sembra che l'anidrificante abbia lo stesso effetto della stufa.

Curve di calibrazione

Come descritto precedentemente (Par. 4.5.1.4), sono state allestite sette diverse curve di calibrazione (Tab. 4.2) utilizzando i due lotti di IbuNa. Le curve di calibrazione in acqua (C. Calib. 1-5 in Tab. 4.2) avevano lo scopo di verificare il contenuto di umidità del sale, e se il mantenimento a 100°C per alcune ore potesse essere un buon metodo per eliminarla. Le curve di calibrazione in acido formico (C. Calib. 6-7 in Tab. 4.2) sono state invece prodotte come primo passo per delle analisi di deproteinizzazione (separazione in SPE), ma vengono riportate ugualmente per i motivi più sotto indicati.

In tutti i casi (C. Calib 1-7 in Tab. 4.2), non sono stati presi in considerazione i punti relativi alla concentrazione della soluzione madre e delle due diluizioni seriali successive. Infatti, a quelle concentrazioni l'andamento lineare o polinomiale si perdeva. Tuttavia, come si osserverà nelle prossime figure, a dispetto di ciò, le diluizioni successive hanno sempre mostrato un andamento ripetitivo e modellizzabile. Pertanto, per tutte le curve di calibrazione sono stati preparati dei campioni dove la concentrazione più alta e quella più bassa hanno rispettivamente il valore di 2.125 µg/mL e di 33,20 µg/mL. Si ricorda infine, che tutte le curve sono state allestite in triplo (n = 3) e le concentrazioni note messe in relazione con le relative assorbanze alle lunghezze d'onda di 265 e 255 nm. La prima lunghezza d'onda rappresenta il picco massimo di assorbimento dell'IbuNa, mentre la seconda (255 nm) è stata scelta per confronto con esperimenti precedenti che non riguardano questo studio.

Le prime due curve di calibrazione che vengono presentate sono la 1 (Fig. 4.20, Tab. 4.2) e la 2 (Fig. 4.21, Tab. 4.2) che sono state rispettivamente ottenute dal primo e secondo lotto del IbuNa, mantenuto a 100°C per un tempo non registrato.

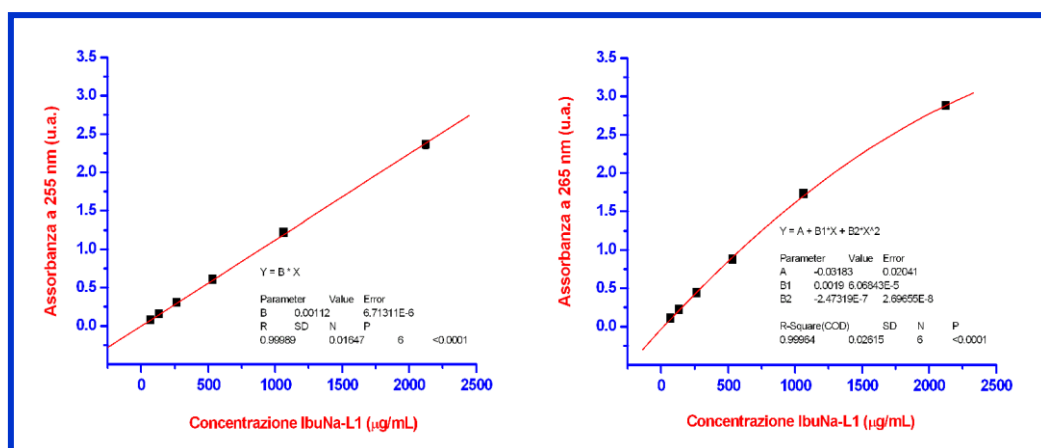


Figura 4.19. Curve di calibrazione 1. IbuNa (L1) in WMQ. Il sale è stato preventivamente mantenuto a 100°C per un tempo non registrato.

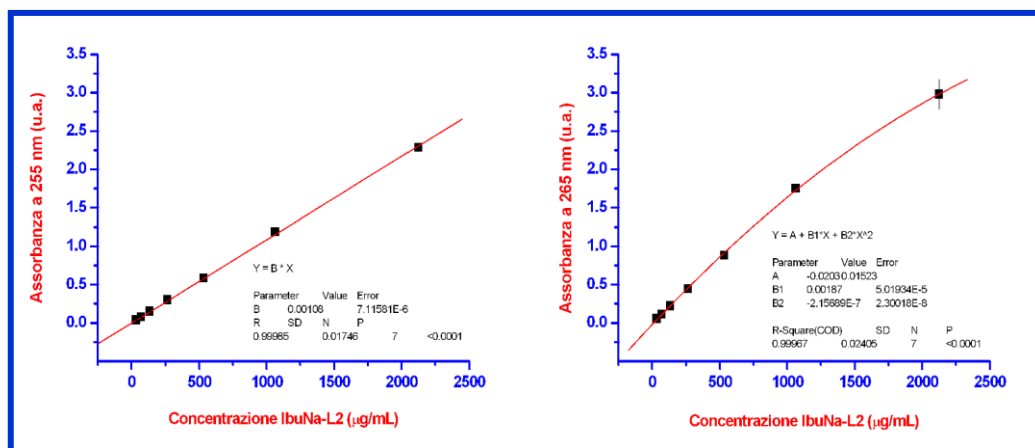


Figura 4.20. Curve di calibrazione 2. IbuNa (L2) in WMQ. Il sale è stato preventivamente mantenuto a 100°C per un tempo non registrato.

Dal confronto delle due figure, si può inizialmente notare che, in entrambi i casi, quando le assorbanze sono misurate a 255 nm, i dati mostrano un andamento lineare, con una R di 0,99989 e di 0,99985 rispettivamente per la curva di calibrazione 1 (Fig. 4.19, sinistra) e 2 (Fig. 4.20, sinistra). Per contro, a 265 nm i dati mostrano un andamento polinomiale, con una R-Square di 0,99964 e di 0,99967 rispettivamente per la curva di calibrazione 1 (Fig. 4.19, destra) e 2 (Fig. 4.20, destra).

Nell'insieme, le deviazioni standard sono molto contenute, quasi non osservabili, a parte quella relativa al campione con concentrazione maggiore nella curva di calibrazione 2 (6,62 % rispetto alla media del valore). Osservando le Figure 4.19 e 4.20 non sembrano notarsi grandi differenze, pertanto per essere sicuri delle conclusioni si è voluto riportare i dati delle assorbanze alle concentrazioni minime e massime in Tabella 4.13.

Tabella 4.13. Confronto delle assorbanze delle curve di calibrazione 1 e 2

C. Cal.	Modello	λ (nm)	Conc. min. ($\mu\text{g/mL}$)	Conc. max. ($\mu\text{g/mL}$)	ABS (u.a.)	
					Conc. min.	Conc. max.
1	lineare	255	66,406	2.125	$0,078 \pm 8,33 \times 10^{-4}$	$2,363 \pm 0,058$
2	lineare	255	33,203	2.125	$0,038 \pm 17,0 \times 10^{-4}$	$2,284 \pm 0,024$
1	polinomiale	265	66,406	2.125	$0,110 \pm 4,11 \times 10^{-4}$	$2,876 \pm 0,049$
2	polinomiale	265	33,203	2.125	$0,056 \pm 18,0 \times 10^{-4}$	$2,977 \pm 0,197$

Si può pertanto concludere che dai valori di assorbimento non si riscontrano grandi differenze tra i due lotti, e che questi valori sono anche in linea con quelli presenti in Tabella 4.11. Inoltre, il limite di rivelabilità può essere identificato nei 33 $\mu\text{g/mL}$.

In un secondo esperimento, si è voluto comprovare quanto precedentemente osservato. Pertanto, si è utilizzato il secondo lotto dell'IbuNa, e questa volta si sono controllati i tempi di permanenza a 100°C. I risultati sono mostrati in Figura 4.21.

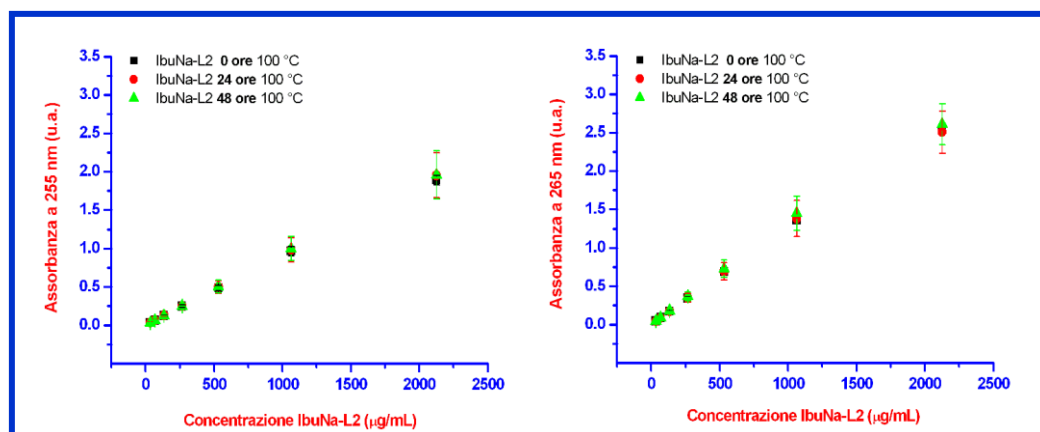


Figura 4.21. Curve di calibrazione 3 - 5. IbuNa (L2) in WMQ. Il sale è stato preventivamente mantenuto a 100°C per 0 (in nero; C. Cal. n. 3), 24 (in rosso; C. Cal. n. 4) e 48 (in verde; C. Cal. n. 5) ore.

Osservando la Figura 4.21, la prima impressione è che le tre curve di calibrazione siano simili dal punto di vista statistico, anche perché mostrano delle deviazioni standard meno contenute di quelle presenti nelle Figure 4.19 e 4.20. In questo caso, le deviazioni standard per i punti a concentrazione più alta (i.e., 2,125, 1,063, e 0,531 mg/mL) sono sempre superiori al 5% della media del valore di assorbanza preso in esame.

Inoltre, si è potuto osservare che: (i) le curve a 255 nm possono essere modellizzate con un'equazione di primo grado come precedentemente osservato, (ii) le curve a 265 nm possono essere modellizzate con un'equazione di secondo grado come precedentemente osservato, (iii) il limite di rivelabilità è di ca. 33 µg/mL. (iv) Tuttavia, se si confrontano i dati delle curve di calibrazione 2 e 3, i valori di quest'ultima sono più alti. Il motivo rimane incognito.

In conclusione, 48 ore non sembrano sufficienti per perdere tutta l'acqua presente, oppure la spettroscopia UV-Vis non è un metodo abbastanza sensibile per piccole variazioni.

Infine, come descritto nel Paragrafo 4.5.1.4, è stata anche allestita una curva di calibrazione ($n = 1$) utilizzando IbuNa-L2 in AcForm/ACN (Fig. 4.22, A - B) ed in AcForm/MeOH (Fig. 4.22, C - D).

Come si può notare tutte e quattro le curve sono lineari con una R di 0,99934 (A), 0,99995 (B), 0,99996 (C), e 0,99999 (D). Il limite di rivelabilità è per entrambe le curve pari a 16,601 µg/mL.

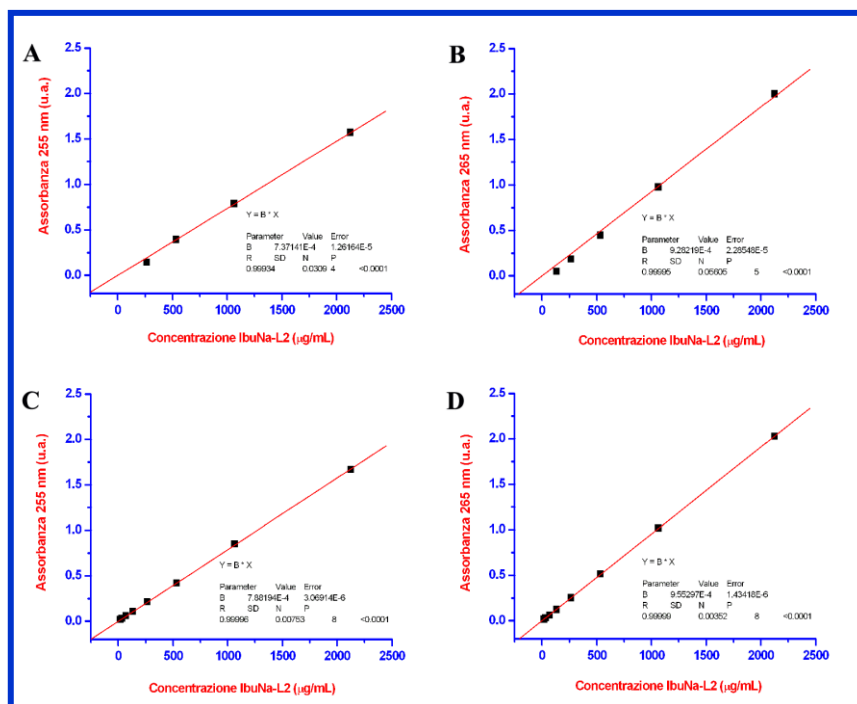


Figura 4.22. Curve di calibrazione 6 e 7. Nella figura troviamo: IbuNa-L2 in AcForm/ACN (97:3) alle lunghezze d'onda di 255 nm (A) e 265 nm (B), e IbuNa-L2 in AcForm/MeOH (99:1) alle lunghezze d'onda di 255 nm (C) e 265 nm (D).

4.8.2 Diclofenac sale sodico.

Il DicloNa, a differenza dell'altro sale, non è stato oggetto di molteplici caratterizzazioni chimico-fisiche, semplicemente per il fatto che ha mantenuto invariato nel tempo il suo aspetto ed odore (i.e. nessuno odore).

4.8.2.1 pH

I valori di pH relativi nelle soluzioni WMQ, PBS, TF-50, FM-2, TF-25 e FM-17 sono rappresentati nella Tabella 4.14.

Tabella 4.14. Confronto dei pH relativi al DicloNa nelle diverse soluzioni

DicloNa		Valori di pH					
Lotto	Concentrazione (mg/mL)	WMQ	PBS	TF-50	FM-2	TF-25	FM-17
/	0,00	6,77	7,42	7,00*	7,60	7,00	7,39
1	1,00	6,72	7,40	6,98*	7,60	6,93	7,37

DicloNa		Valori di mV					
Lotto	Concentrazione (mg/mL)	WMQ	PBS	TF-50	FM-2	TF-25	FM-17
/	0,000	21	- 6	17*	- 15	6	- 5
1	1,000	23	- 6	18*	- 16	21	- 4

DicloNa		Valori di Temperatura (°C)					
Lotto	Concentrazione (mg/mL)	WMQ	PBS	TF-50	FM-2	TF-25	FM-17
/	0,000	25,2	25	23,6*	23,5	23,7	25
1	1,000	23,4	23,4	23,4	23,4	23,6	23,2

4.8.2.2 Assorbimento UV-Vis

Per il DicloNa sono state effettuate solo delle analisi qualitative, che sono state utili per osservare il comportamento della molecola in alcuni solventi ed a diverse concentrazioni. Si è voluto pertanto osservare il comportamento del DicloNa in WMQ e in TF-50 alle concentrazioni 0,0625, 0,125, 0,25 e 0,5 mg/mL, ed in PBS (i.e., 15 diluizioni seriali ottenute a partire da una soluzione madre (1 mg/mL) di DicloNa in PBS). Si ricorda che tutti gli spettri presenti in questo paragrafo sono stati azzerati a 350 nm e normalizzati rispetto al bianco.

In Figura 4.23 sono mostrati gli spettri di assorbimento UV-Vis del DicloNa in WMQ (Fig. 4.23, sinistra) ed in TF-50 (Fig. 4.23, destra) alle concentrazioni prima menzionate.

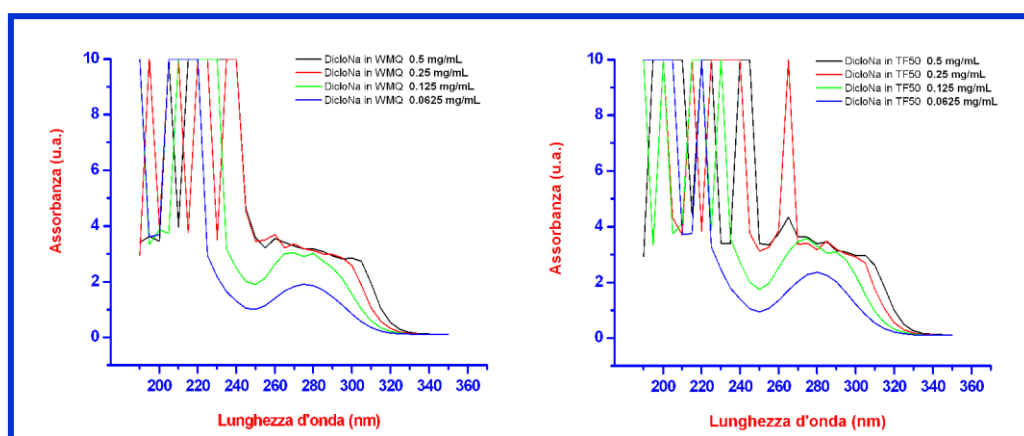


Figura 4.23. Spettri di assorbimento UV-Vis del DicloNa in WMQ (sinistra) e TF-50 (destra). In entrambi i casi le concentrazioni scelte sono rispettivamente: 0,5; 0,25; 0,125 e 0,0625 mg/mL.

Osservando la Figura 4.23, si nota che, sebbene sia presente un picco massimo di assorbimento a 275 nm, questo si manifesta nella sua interezza a partire dalla

concentrazione di 62,5 $\mu\text{g/mL}$. A concentrazioni più alte, non viene mantenuta nessuna proporzionalità di crescita dell'assorbimento in funzione della concentrazione. Inoltre, a parità di concentrazione (62,5 $\mu\text{g/mL}$; diluizione 4), l'assorbimento in TF-50 è leggermente superiore (1,715 u.a.) a quello in WMQ (1,669 u.a.).

Questo comportamento non varia utilizzando PBS come solvente (Fig. 4.24). Infatti, come si può osservare dalla Figura 4.24, il picco di massimo assorbimento è facilmente individuabile solo a partire dalla diluizione 4; non sapendo la lunghezza d'onda di massimo assorbimento, dedurla dallo spettro della diluizione 3 sarebbe approssimativo.

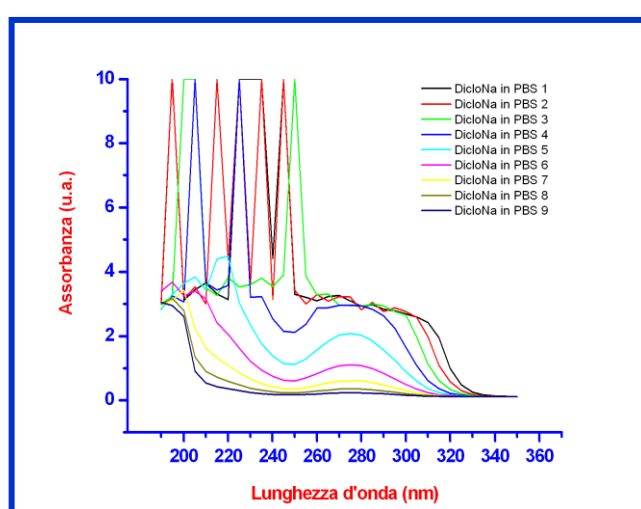


Figura 4.24. Spettri di assorbimento UV-Vis del DicloNa in PBS. Sono rappresentati gli spettri della soluzione madre (1) con concentrazione pari a 1 mg/mL dalla quale si sono ottenute le diluizioni seriali 2 - 9, (500 - 3,906 $\mu\text{g/mL}$).

Confrontando l'assorbimento a 275 nm del DicloNa in PBS (diluizione 4 = 62,5 $\mu\text{g/mL}$) con quelle precedenti in WMQ e TF-50 (stessa concentrazione) si è osservato che risulta essere superiore (1,833 u.a.).

4.9 Separazione cromatografica in HPLC

Questo paragrafo consta di diverse sezioni. In particolare, le informazioni presenti nei primi paragrafi sono state acquisite nel tempo, man mano che si utilizzava lo strumento e si sono rivelate particolarmente importanti per diversi motivi. Successivamente, vengono riportati gli esperimenti effettuati per ottenere il protocollo della metodica finale di separazione e quantificazione.

4.9.1 Determinazione dei parametri basali dello strumento

Nel tentativo di effettuare delle analisi sempre con le stesse condizioni basali, in modo da poter escludere malfunzionamenti o altri parametri relazionati direttamente con lo strumento, sono state monitorate le pressioni in diverse condizioni dopo un lavaggio esaustivo e completo dello stesso. Le varie condizioni precedentemente indicate (Tab. 4.4) sono completate in Tabella 4.15.

Osservando i dati elencati, iniziamo soffermandoci sulla condizione che esclude la colonna ed i suoi accessori (condizione U). Si può notare quanto segue: (i) le pressioni sono ragionevolmente basse in tutti i sei casi in quanto il circuito è libero da ostacoli, (ii) aumentando il flusso di una delle tre fasi mobili investigate, la pressione aumenta di alcuni bar (i.e., 3 - 7 bar), ma questo aumento pressorio non è costante e varia in funzione della fase mobile e della sua viscosità. È ragionevole, infatti, pensare che maggiore sarà la viscosità del mezzo che fluisce nel circuito dello strumento, maggiore sarà la resistenza al flusso, e quindi maggiore sarà la pressione registrata. Nel manuale della colonna [48], i valori di viscosità indicati per i tre solventi, a 20°C, sono: WMQ = 1 cP; ACN = 0,37 cP; MeOH = 0,60 cP; ACN:WMQ 80:20 = 0,48 cP; MeOH:WMQ 80:20 = 1,11 cP, di cui le ultime due sono calcolate dal grafico presente nel manuale. Si ricorda che variando i volumi in una miscela di due solventi, la viscosità non si modifica linearmente in funzione dei loro rapporti volumetrici [48]. Ad ogni modo, le viscosità riportate sono in accordo con le pressioni registrate dallo strumento (Tab. 4.15). Un rialzo pressorio importante in queste condizioni può significare la presenza di sporcizia o cristalli in qualche parte del circuito metallico, oppure l'intasamento progressivo del FRIT (i.e., un filtro che viene attraversato dalla fase mobile in uscita dalla camera di miscelazione. Noi ad ogni modo, nel periodo di monitoraggio, non abbiamo osservato rialzi in queste condizioni.

La seconda condizione monitorata controlla la rispondenza dell'accessorio "pre-colonna" (condizione "P + U", in Tab. 4.15).

Dai valori tabulati, si può concludere che la precolonna non ostacola il flusso nel circuito (condizione "P + U" vs. "U") grazie alla sua struttura in acciaio sinterizzato caratterizzata da una porosità di 2 μm [49]. In effetti, la funzione della precolonna è quella di rimuovere l'eventuale particolato grossolano, se si osservano le pressioni generate dalle altre condizioni, la precolonna non le ha mai incrementate (i.e., "P + CG + U" vs. "CG + U", "P + C" vs. "C", e "P + CG + C" vs. "CG + C"), tanto da far pensare che se è passato del particolato nel circuito questo doveva essere inferiore a 2 μm .

Osserviamo adesso i dati pressori relativi alla condizione "CG + U". Si precisa che la CG utilizzata per queste misurazioni è quella di tipo "ec" ed al suo interno è presente una silice analoga a quella della colonna (C18, ODS, dimensioni delle particelle: 5 μm , dimensioni dei pori: 100 Å) [50].

Pertanto, è normale supporre che la CG aumenti le pressioni in funzione del flusso e della viscosità della fase mobile, così come è stato osservato. Essendo la sua funzione

quella di proteggere la colonna da sostanze che potrebbero rimanere intrappolate al suo interno per dimensioni e/o interazioni chimico-fisiche, le pressioni generate possono variare enormemente. Per esempio, la pressione più alta osservata nella condizione "P + CG + C" è di 143 bar con MeOH:WMQ 80:20 a 1 mL/min che corrisponde ad un incremento pressorio di 17 bar. In letteratura è stato visto che, il rialzo pressorio dovuto alle colonne di guardia dovrebbe essere compreso tra 1,7 ed 8,6 bar, mentre un aumento di 15,5 bar dovrebbe essere indice di ostruzione [51]. Tuttavia, si ritiene che l'aumento osservato con la fase MeOH:WMQ 80:20 sia dovuto alla viscosità della stessa, quindi è da considerarsi normale con le nostre condizioni.

La colonna, essendo più lunga della CG (i.e., 150 mm vs. 4 mm), offre una resistenza superiore al flusso, e pertanto, si sono registrate delle pressioni superiori (condizione "C") a quelle osservate solo in presenza della colonna di guardia (condizione "CG + C"). Questa condizione è stata monitorata solo due volte: a circuito completamente pulito e con fase mobile di conservazione della colonna, per evitare possibili danni. Tuttavia, nella condizione "P + C" è possibile osservare quale sarebbe potuta essere la pressione generata dalla fase mobile MeOH:WMQ.

Il risultato è in linea con quanto osservato già nella condizione più semplice (condizione "U") dove la miscela metanolica dava pressioni doppie rispetto a quelle fornite dalla miscela con ACN.

Infine, nell'ultima condizione (P + CG + C) dove è presente la colonna con i suoi accessori, si nota che le pressioni sono le più alte, e che la CG è responsabile di un aumento di ca. 5, n.d., 10, e 20 bar rispettivamente negli ultimi quattro casi. Questi rialzi sono molto simili a quelli causati dalla CG alle pressioni della union, dove per gli stessi casi si avevano rialzi di ca. 4, 9, 9, e 19 bar. Pertanto, nel caso non determinato (i.e., n.d.) si dovrebbero avere circa 73 bar.

Come nota conclusiva, si riporta che la condizione più monitorata è stata proprio quest'ultima e con fase mobile acetonitrilica (entrambi i flussi) in quanto lo si è fatto ogni volta che si è acceso lo strumento. Valori pressori di 40 e 70 bar osservati rispettivamente con dei flussi di 0,5 e 1 mL/min sono stati considerati ottimali.

Tabella 4.15. Parametri pressori basali dello strumento in varie condizioni

Condizione	Fase mobile			Pressione (bar)
	Composizione	Concentrazione (v/v)	Flusso (mL/min)	
U	ACN:WMQ	80:20	0,5	10
U	WMQ	100	0,5	12
U	MeOH:WMQ	80:20	0,5	14
U	ACN:WMQ	80:20	1,0	13
U	WMQ	100	1,0	17
U	MeOH:WMQ	80:20	1,0	20
P + U	ACN:WMQ	80:20	0,5	11
P + U	MeOH:WMQ	80:20	0,5	14
P + U	ACN:WMQ	80:20	1	14
P + U	MeOH:WMQ	80:20	1	20
CG + U	ACN:WMQ	80:20	0,5	15
CG + U	MeOH:WMQ	80:20	0,5	23
CG + U	ACN:WMQ	80:20	1	22
CG + U	MeOH:WMQ	80:20	1	39
P + CG + U	ACN:WMQ	80:20	0,5	15
P + CG + U	MeOH:WMQ	80:20	0,5	23
P + CG + U	ACN:WMQ	80:20	1	22
P + CG + U	MeOH:WMQ	80:20	1	39
C	ACN:WMQ	80:20	0,5	33 34
C	ACN:WMQ	80:20	1,0	60 61
P + C	ACN:WMQ	80:20	0,5	34
P + C	MeOH:WMQ	80:20	0,5	63
P + C	ACN:WMQ	80:20	1,0	61
P + C	MeOH:WMQ	80:20	1,0	126
CG + C	ACN:WMQ	80:20	0,5	39
CG + C	ACN:WMQ	80:20	1,0	70
P + CG + C	ACN:WMQ	80:20	0,5	36 39
P + CG + C	MeOH:WMQ	80:20	0,5	n.d.
P + CG + C	ACN:WMQ	80:20	1,0	68 70
P + CG + C	MeOH:WMQ	80:20	1,0	143

4.9.2 Metodica di lavaggio dello strumento e sue porzioni

Il lavaggio dello strumento può avvenire con o senza colonna ed accessori. Ovviamente, essendo la colonna da noi utilizzata una RP-C18, il lavaggio profondo dello strumento usando WMQ risulta essere incompatibile con la colonna, in quanto in grado di collassare le catene alchiliche non-polari presenti sulle particelle di silice [52]. Questo fenomeno che può avvenire nel tempo o istantaneamente, accade con miscele il cui contenuto in WMQ è superiore al 95%, e determina la perdita della capacità separativa [52]. Pertanto, in questo paragrafo si commenteranno separatamente i vari lavaggi.

Lavaggio profondo dello strumento

Il lavaggio profondo dello strumento prevede l'utilizzo di solventi puri, non aggressivi per le sue varie parti, e ha lo scopo di rimuovere qualsiasi sostanza che nel tempo si deposita nel circuito, o che si è depositata per una qualche incompatibilità, o a causa di una

interruzione della corrente. Questo tipo di lavaggio può durare una notte o un giorno intero, in funzione dei solventi utilizzati. Il flusso deve essere molto basso (i.e., 0,1 mL/min) in modo che il solvente abbia in tempo di dissolvere i residui e trasportarli via. Come indicato precedentemente (Par. 4.6.4), una volta al mese si deve procedere con il lavaggio profondo utilizzando WMQ [53]. Nelle condizioni utilizzate per questo studio, il lavaggio profondo in acqua permette la rimozione di eventuali residui di sali (i.e., tampone, IbuNa, DicloNa) e di ACN, che sebbene di grado gradiente con il tempo potrebbe lasciare residui nel circuito [53]. Per verificare che il lavaggio profondo sia stato effettivamente efficace, esso è seguito dai controlli delle pressioni basali in condizione U. Nella nostra esperienza si è trovato che le pressioni basali nella "condizione U" dopo lavaggio profondo (WMQ, oppure iPrOH seguito da WMQ) tornano ai valori indicati nella Tabella 4.15.

Lavaggio della colonna e dei suoi accessori

Il metodo di lavaggio è stato scelto in base alle raccomandazioni, in corsivo, presenti nel manuale della colonna [54]. Ovviamente, gli accessori (i.e., precolonna e colonna di guardia) si lavano contemporaneamente alla colonna.

Prima di tutto, si è calcolato il volume della colonna utilizzando le informazioni presenti nel Paragrafo 4.6.2, e la seguente formula:

$$V = \pi \times r^2 \times L$$

dove V è il volume della colonna (mL), r il raggio della colonna (cm), ed L la lunghezza della colonna (cm). Facendo le opportune sostituzioni, si ottiene che il volume è di 2,49 mL, che possiamo approssimare per i calcoli successivi a 2,5 mL. Conoscere il volume della colonna è importante per calcolare quanta fase mobile è necessaria per il lavaggio dell'intera colonna.

Relativamente al flusso, le istruzioni prevedono che *"deve essere mantenuto durante tutto il lavaggio ad un flusso che sia compreso tra il 25 ed il 50% del flusso usato durante le analisi"*. Pertanto, operando ad 1 mL/min il flusso dovrebbe essere compreso tra 0,5 e 0,25 mL/min. Per non avere dei tempi lunghi di lavaggio, si pensò inizialmente di utilizzare il flusso con il valore più alto.

Relativamente a quale fase mobile usare durante il lavaggio, le istruzioni prevedono, quanto segue. *"Per impurità polari. Eliminare il tampone con 80% acqua - 20% solvente organico (50 mL). Successivamente, lavare (almeno 25 mL) con una miscela acquosa che contenga una alta percentuale (70:30 - 90:10) in solvente organico (ACN o MeOH). Si noti che la maggior parte delle impurità polari viene eliminata eliminando il tampone. Per impurità non polari. Lavare la colonna con un alta frazione in acqua, (max 90%) per rimuovere il tampone. Lavare con MeOH (100%) per rimuovere i composti organici polari. Lavare con ACN (100%) per rimuovere le impurità organiche mediamente polari (se necessario, aumentare la temperatura fino a 40°C). Lavare la colonna con THF per rimuovere i composti organici non-polari. Se necessario lavare la colonna con THF"*

invertendo la direzione del flusso, che dovrebbe essere mantenuto ad 1/5 di quello iniziale.” Il protocollo di lavaggio utilizzato tiene conto di tutte queste informazioni; i lavaggi in THF sono stati esclusi perché è un solvente incompatibile con i tubi in peek [29,30]. Pertanto, nella prima fase (Tab. 4.3) a partire dalla fase mobile 2 o 17 (ACN:TF-50), il tampone viene contemporaneamente sostituito con WMQ. Il contenuto in acqua è in questa fase del 73%, percentuale leggermente inferiore a quella consigliata (80 - 90%), tuttavia i volumi di lavaggio sono da 2 a 7 volte più grandi. La seconda fase (Tab. 4.3), metanolica, pur rientrando come concentrazioni (i.e., MeOH/WMQ 73:27, vedi testo in corsivo nella pagina precedente) è molto più lunga di quanto richiesto (4 - 14 volte), mentre l'ultima fase (Tab. 4.3) serve in parte per eliminare le sostanze mediamente polari, e riportare la colonna nelle condizioni di conservazione. Pensando che i nostri campioni non erano delle miscele complesse, il protocollo ci è sembrato adeguato. Alla fine dei lavaggi sono stati controllati i cromatogrammi e/o gli andamenti pressori (Fig. 4.25.).

I dati raccolti in Figura 4.25 mostrano un andamento pressorio simile in tutti e quattro i casi (Fig. 4.25.A - D). Tuttavia, l'analisi attenta dei grafici permette di identificare alcune differenze che possono essere imputate agli accessori presenti (P + C vs. PC + CG + C).

Iniziamo ad osservare i primi due casi proposti in Figura 3.23.A e B (condizione P + C). Nei primi 10 minuti la fase eluente cambia da ACN:TF25 27:73 ad ACN:WMQ 27:73 con un contemporaneo abbassamento del flusso da 1,0 a 0,5 mL/min. La pressione si abbassa da 128 a 72 bar e da 138 a 78 bar, rispettivamente nei due lavaggi cortissimo e medio (Fig. 4.25.A e B). A parte la pressione iniziale, che varia in base alle analisi effettuate nel corso della giornata, si può notare che nei due casi, il salto pressorio è rispettivamente di -56 e -60 bar (Fig. 4.25.A e B). Questo iniziale abbassamento è giustificabile con il dimezzamento della velocità del flusso e forse, anche con il cambio della FM (i.e., il tampone viene sostituito con acqua).

Nella prima fase ACN:W 27:73 (10 - 210 min., caso A, e 10 - 410 min., caso B), si può osservare che la pressione inizialmente si alza fino a 92 e 100 bar in 10 minuti (risp. caso A e B). La pressione rimane in quell'intorno per altri 20 minuti (caso A e B) per poi iniziare gradualmente a diminuire. Infatti, alla fine di questa fase la pressione scende progressivamente sino ad arrivare a 72 e 71 bar alla fine della fase acetonitrilica (210 min., caso A, e 410 min., caso B). Pertanto, dall'inizio alla fine di questa fase si è avuto un abbassamento di 0 e 7 bar per i casi A e B rispettivamente, mentre dal picco massimo alla fine si è avuto un abbassamento di 20 e 29 bar (risp. caso A e B).

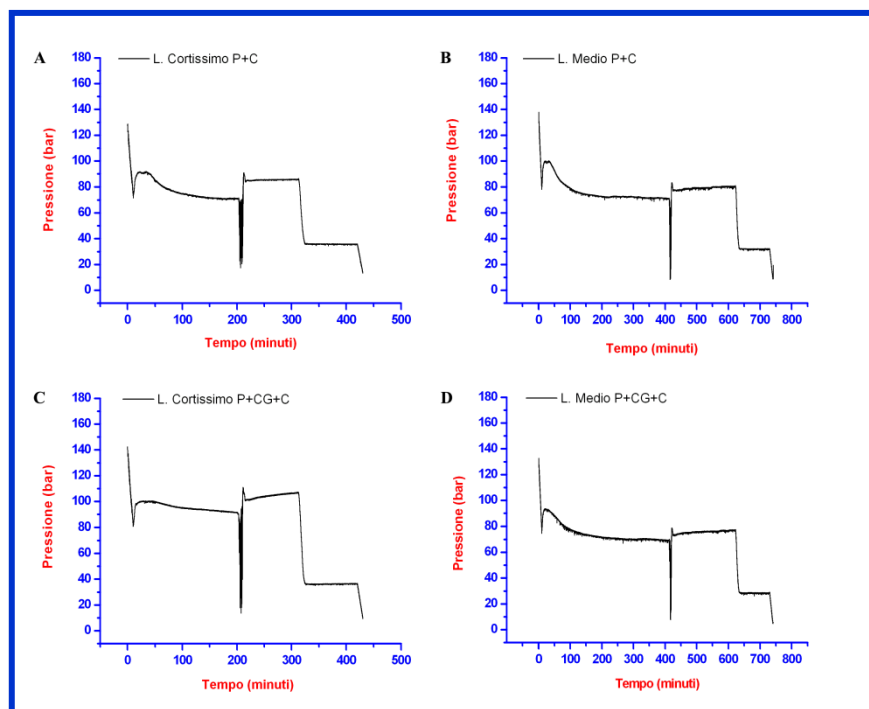


Figura 4.25. Andamenti pressori di lavaggi effettuati in diverse condizioni accessorie: lavaggio cortissimo con colonna e pre-colonna (A), lavaggio medio con colonna e pre-colonna (B), lavaggio cortissimo con colonna, pre-colonna e colonna di guardia (C), lavaggio medio con colonna, pre-colonna e colonna di guardia (D).

Nei seguenti 10 minuti (210 - 220 min, caso A, e 410 - 420 min., caso B), la fase ACN:W 27:73 viene sostituita con MeOH:W 73:27; il flusso è mantenuto a 0,5 mL/min. In questi 10 minuti la pressione aumenta repentinamente dopo essere scesa sino a 17 e 9 bar (risp. caso A e B). La rapida variazione è sicuramente da attribuire al cambio della fase mobile (i.e., graduale diminuzione della WMQ e sostituzione dell'ACN con il MeOH). Alla fine di questi 10 minuti la pressione arriva a 91 e 83 bar (risp. caso A e B), e nel giro di 2 e 4 minuti arriva a 84 e 77 bar (risp. caso A e B). Si può pertanto, notare che nei due casi la pressione crolla di 7 e 6 bar. Se prendiamo come riferimento la pressione che si ha in questo momento (220 min. caso A, e 420 min. caso B), si può notare che la differenza pressoria tra questo preciso istante e la fine della prima fase di lavaggio è nei due casi di +12 e +6 bar (risp. caso A e B). Ciò può essere il risultato di una migliore pulizia della colonna nel caso B. Proseguendo nell'osservazione dell'andamento pressorio della fase metanolica si nota, in entrambi i casi, un aumento di 1 e 4 bar tra il momento del crollo (220 min. caso A, e 420 min. caso B) e la fine di questa fase (320 min. caso A, e 620 min. caso B). L'aumento pressorio di questa fase, anche se di pochi bar, può essere dovuto alla fuoriuscita di qualche sostanza residua presente in colonna, magari facilmente solubilizzata dal MeOH (Fig. 4.25.).

Nei 10 minuti successivi, la fase MeOH:W 73:27 si trasforma in ACN:W 80:20; il flusso è mantenuto a 0,5 mL/min. Possiamo osservare che la pressione scende di 50 bar nei due

casi A e B, e che questa volta l'abbassamento è lineare ed è dovuto al cambio della fase mobile ed alla presenza della maggior percentuale di ACN.

Infine, nell'ultima fase di lavaggio (330 - 430 min., caso A, e 630 - 730 min., caso B) la pressione si mantiene costante a 36 e 32 bar (risp. caso A e B).

Pertanto, si può concludere che pur partendo da condizioni più svantaggiose, il lavaggio medio è riuscito a ripristinare le condizioni ideali di cui alla Tabella 4.15.

Procediamo ora con l'analisi della condizione rappresentata in Figura 4.25.C e D che prevede l'aggiunta della CG al sistema cromatografico d'utilizzo.

Nei primi 10 minuti la fase eluente cambia da ACN:TF25 a ACN:WMQ con un contemporaneo abbassamento del flusso da 1,0 a 0,5 mL/min. La pressione si abbassa da 142 a 81 bar e da 132 a 74 bar, rispettivamente nei due lavaggi cortissimo e medio (Fig. 4.25.C e D). A parte la pressione iniziale che dipende dalla sequenza di campioni iniettati prima del lavaggio (più elevata nel lavaggio cortissimo, caso C) e dalla presenza della CG se si confrontano i valori con i casi A e B, si può notare che, nonostante tutto, il salto pressorio è di - 61 e - 58 bar nei due casi C e D. Questo iniziale abbassamento è giustificabile col dimezzamento della velocità del flusso e forse, anche con il cambio della FM (i.e., il tampone viene sostituito con acqua).

Nella prima fase di lavaggio con ACN:W 27:73 (10 - 210 min., caso C, e 10 - 410 min., caso D), si può osservare che la pressione inizialmente si alza fino a 100 e 94 bar in 10 minuti (risp. caso C e D). Questo rialzo pressorio è attribuibile all'ingresso in colonna della nuova fase mobile nella sua totale composizione. La pressione rimane in quell'intorno per altri 50 e 30 minuti (risp. caso C e D). Dopo di che, la pressione progressivamente diminuisce per arrivare a 90 e 70 bar rispettivamente per i casi C e D (valori a 210 min., caso C, e 410 min., caso D). Pertanto, dall'inizio alla fine di questa fase si è avuto un incremento di +9 bar ed una diminuzione di 4 bar rispettivamente per i casi C e D. Inoltre, dal picco massimo alla fine si è avuto un abbassamento di 10 e 24 bar (risp. caso C e D).

Nei seguenti 10 minuti (210 - 220 min., caso C, e 410 - 420 min., caso D), la fase ACN:W 27:73 viene sostituita con MeOH:W 73:27 mantenendo il flusso a 0,5 mL/min. In questi 10 minuti la pressione aumenta repentinamente dopo essere scesa bruscamente sino a 14 e 33 bar (risp. caso C e D).

Alla fine di questi 10 minuti la pressione arriva a 110 e 78 bar (risp. caso C e D), e nel giro di ulteriori 5 minuti diminuisce a 100 e 73 bar (risp. caso C e D). Si può pertanto, notare che nei due casi la pressione si abbassa di 10 e 5 bar. Se prendiamo come riferimento la pressione che si ha in questo momento (225 min. caso C, e 425 min. caso D), si evince che la differenza pressoria tra questo preciso momento e la fine della prima fase di lavaggio è nei due casi di 10 e 3 bar (risp. caso C e D). Ciò potrebbe essere il risultato dell'ingresso graduale del metanolo che avviene contemporaneamente alla diminuzione dell'ACN e all'aumento dell'WMQ. Proseguendo nell'osservazione

dell'andamento pressorio della fase metanolica si nota, in entrambi i casi, un aumento di 7 e 4 bar tra il momento del crollo (225 min. caso C, e 425 min. caso D) e la fine di questa fase (320 min. caso C, e 620 min. caso D). L'aumento pressorio di questa fase, anche se di pochi bar, può essere dovuto alla possibile fuoriuscita/eliminazione di qualche sostanza rimasta in colonna durante le analisi effettuate, la quale è risultata maggiormente solubile in metanolo rispetto alla fase di ACN:WMQ 27:73 v/v.

Nei 10 minuti successivi, la fase MeOH:W 73:27 si trasforma in ACN:W 80:20; il flusso è mantenuto a 0,5 ml/min. Possiamo osservare che la pressione scende di 71 e 49 bar nei due casi A e B, e che questa volta l'abbassamento è lineare ed è dovuto al cambio della fase mobile ed alla presenza della maggior percentuale di ACN nella composizione.

Infine, nell'ultima fase di lavaggio (330 - 430 min, caso C, e 630 - 730 min, caso D) la pressione si mantiene costante a 36 bar.

Nell'insieme, si è potuto osservare che nonostante al termine delle analisi effettuate la pressione iniziale fosse più alta nel lavaggio medio, la pressione finale raggiunta con i due diversi lavaggi risulta essere la medesima (36 bar). Pertanto, in questo caso saremmo portati a concludere che non c'è una grande differenza tra i due lavaggi quanto a risultati finali. Tuttavia, l'esperienza ha mostrato che non sempre un lavaggio corto è stato sufficiente a ripristinare le condizioni ideali mostrate in Tabella 4.15.

Se si analizza la Figura 4.25 prendendo in considerazione il lavaggio cortissimo (Fig. 4.25 A e C), è possibile notare che si ha una pressione di partenza che risulta essere più alta nella condizione in cui è presente la CG (128 vs 142). L'aspetto interessante risulta essere il fatto che nonostante tale differenza, la pressione finale raggiunta sia la medesima (36 bar). Nel corso della prima fase di lavaggio in ACN:WMQ 27:73 (200 min.) l'abbassamento ammonta rispettivamente a 56 e 52 bar per i casi delle Figure 4.25.A e C. Tra la fine della fase acetonitrilica e la pressione finale registrata nella fase metanolica, non si nota un abbassamento della pressione, ma un aumento dei bar rispettivamente di 18 e 13, (pressione finale di 85 e 107 bar rispettivamente per i casi A e C). L'aumento della pressione è da attribuirsi alla diversa fase mobile, infatti, il metanolo crea una maggior pressione in colonna. Nonostante intercorrano 22 bar di differenza in questa fase, la pressione finale rilevata è risultata essere la stessa, tenendo anche conto dei bar iniziali differenti. Questo mette in evidenza l'efficacia del lavaggio.

Se, invece, prendiamo in considerazione i lavaggi medi (Fig. 4.25. B e D), è possibile osservare una differente pressione iniziale, che risulta essere più elevata di 6 bar nella condizione P + C (138 bar e 132 bar nel caso B e D rispettivamente). Questa differenza viene ridotta ad 1 bar alla fine della fase acetonitrilica (71 e 72 bar nel caso B e D rispettivamente). La successiva fase metanolica mostra un incremento pressorio dato dalla differente viscosità del solvente con la fase.

La pressione iniziale e finale in questa fase sono state 77 e 81 bar per il caso B e 73 e 77 bar per il caso D. È possibile notare che in queste condizioni l'incremento nel corso dei 200 minuti è in entrambi i casi di 4 bar.

Successivamente, avviene il crollo pressorio caratterizzante il passaggio alla fase di ACN:WMQ 80:20 v/v. Nonostante la pressione finale della fase precedente fosse differente (81 vs 77), l'entità del crollo è stata la medesima (49 bar), ottenendo quindi una pressione finale di 32 e 28 bar (risp. nel caso B e D). Se si considera la differenza di bar esistente tra le ultime due fasi si nota che consta di 4 bar in entrambi i casi. Questo significherebbe che la fase di ACN:WMQ 80:20 v/v non abbia favorito un ulteriore abbassamento della pressione ma abbia mantenuto costante la differenza già esistente.

Anche questa analisi puntuale mette in evidenza quanto anticipato in precedenza, e cioè che i casi presi ad esempio in questa tesi non mostrano una maggiore superiorità di un lavaggio rispetto all'altro. Tuttavia, si reitera l'affermazione che l'esperienza ha mostrato che un lavaggio cortissimo non sempre è sufficiente.

La verifica delle pressioni finali di ciascun tipo di lavaggio ha permesso di controllare che il sistema fosse realmente pulito e che fossero state ripristinate le condizioni iniziali. In caso contrario è stato avviato un ulteriore lavaggio.

Inizialmente, si lasciava accesa la lampada durante i lavaggi e pertanto, si potevano controllare anche i cromatogrammi insieme con l'andamento pressorio del lavaggio. Un tipico caso è presentato in Figura 4.26.

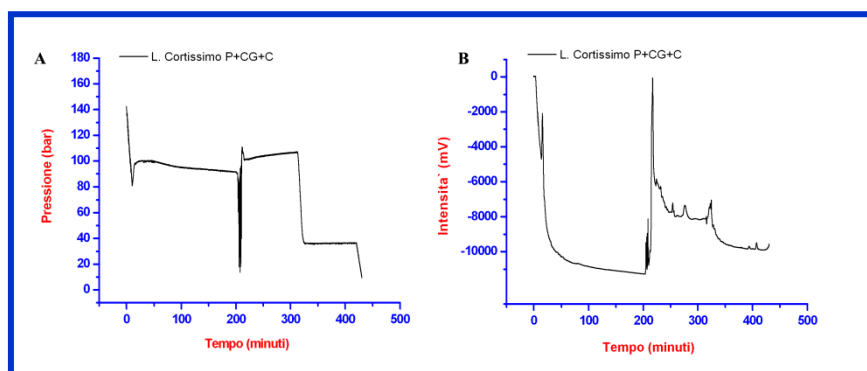


Figura 4.26. Lavaggio corto effettuato con colonna, pre-colonna e colonna di guardia: andamento pressorio (A) e cromatogramma dell'intensità acquisito a 254 nm (B).

Come si può notare, nella prima fase di lavaggio (10 - 210 min) il cromatogramma non presenta picchi. Tuttavia, questi sono presenti, invece, nella seconda (210 - 310 min) e terza (320 - 430 min) fase di lavaggio. Questa osservazione, permette di affermare che erano presenti delle sostanze che assorbono a 254 nm, e che fuoriescono a partire da 210 minuti.

Pertanto, è possibile ipotizzare che il metanolo abbia una maggior capacità solvente per le sostanze rimaste intrappolate nella fase stazionaria.

Un altro modo per verificare se la colonna è pulita consiste nel verificare la stabilità della linea di base. Se la temperatura è mantenuta costante, una soluzione di ACN - WMQ 70:30 non dovrebbe causare una deriva (positiva o negativa) di più di 2 - 3 mAU in una corsa di 5 minuti [54]. Nella nostra esperienza abbiamo notato che il range è stato sempre rispettato. Pertanto, si può concludere che i lavaggi effettuati sono stati efficaci.

Inoltre, abbiamo anche osservato che se tutto il circuito, incluso l'iniettore, la colonna ed i suoi accessori, è pulito, i cromatogrammi dei solventi o delle fasi mobili presentano sì dei picchi ma di bassa intensità (Fig. 4.27). Si può infatti osservare che l'altezza dei picchi rilevabili nei primi 5 minuti hanno un'intensità non superiore ai 400 mV (Fig. 4.27.A - D). Inoltre, tra i 5 ed i 20 minuti, la linea di base può considerarsi praticamente pulita (Fig. 4.27. B - D).

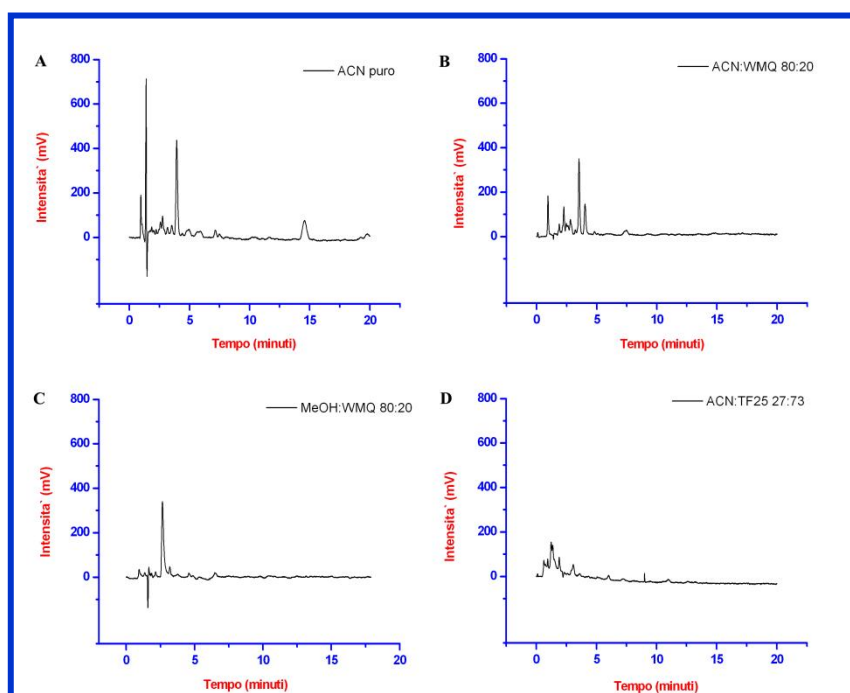


Figura 4.27. Cromatogramma di (A) ACN puro, (B) ACN:WMQ 80:20 v/v, (C) MeOH:WMQ 80:20 v/v, e (D) ACN:TF-25 27:73 v/v. Condizioni: 20 μ L di solvente iniettato in colonna accessoriata con pre-colonna, a 254 nm, 1,0 mL/min con la fase mobile identica al solvente in questione tranne nel caso A nel quale la fase mobile è stata ACN:WMQ 80:20 v/v.

Inoltre, nel caso dell'ACN puro (Fig. 4.27.A), è possibile notare la presenza di un picco con un tempo di ritenzione di ca. 15 minuti, che scompare quando questo solvente è miscelato al 20% con l'WMQ (Fig. 4.27.B) o al 27% con il TF-25 (Fig. 4.27.D).

Tuttavia, con il procedere delle analisi si può osservare come la forma e l'intensità dei picchi nei primi 2,5 minuti siano differenti (Fig. 4.28.A - D vs. Fig. 4.28.A - D). In questo caso,

infatti, sono presenti uno o due picchi la cui intensità varia tra i 6.000 ed i 115.000 mV. Inoltre, come si può vedere nei vari inserti della Figura 4.28, i quattro cromatogrammi appaiono puliti dopo i 5 minuti; anche quello dell'ACN puro (Fig. 4.28.A vs. Fig. 4.28.A). È rimasta, invece, inspiegata la deriva relativa alla sola iniezione della soluzione MeOH:WMQ (Fig. 4.28.C, inserto).

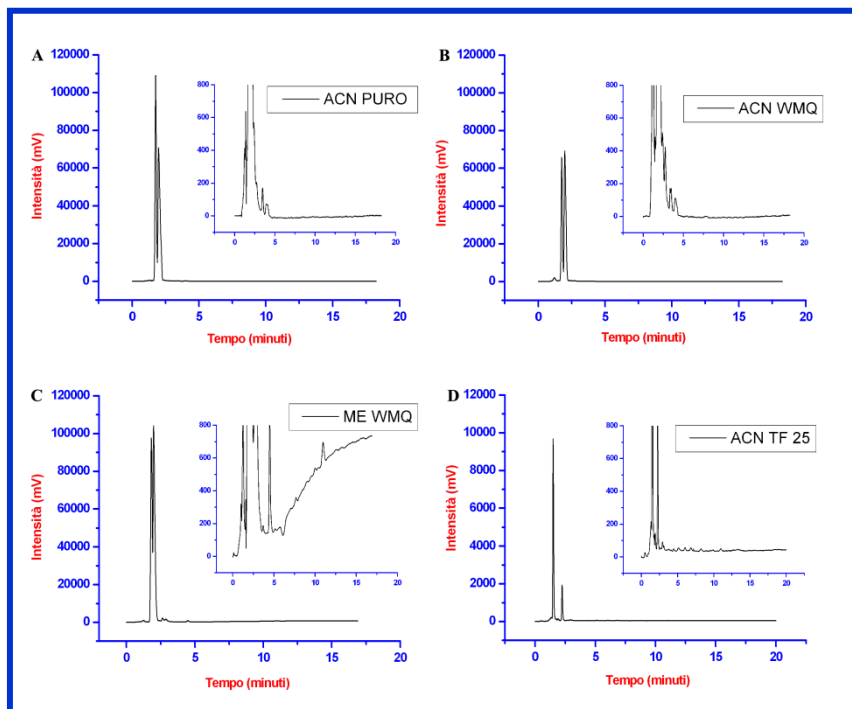


Figura 4.28. Cromatogramma di (A) ACN puro, (B) ACN:WMQ 80:20 v/v, (C) MeOH:WMQ 80:20 v/v, e (D) ACN:TF-25 27:73 v/v. I vari inserti hanno una scala delle intensità compresa tra 0 e 800 mV per evidenziare eventuali picchi presenti nel tempo 5-20 minuti. Condizioni: 20 μ L di solvente iniettato in colonna accessoriata con PC, a 254 nm, 1,0 mL/min con la fase mobile identica al solvente in questione tranne nel caso A nel quale la fase mobile è stata ACN:WMQ 80:20 v/v, in quanto impossibile far passare in colonna esclusivamente ACN puro. Nota: con "ME" nell'inserto della figura C si intende "MeOH".

Considerando che questi cromatogrammi sono stati ottenuti in presenza di pressioni post-lavaggio basse, pressioni di operazione corrette, e sostituzione della colonna di guardia con una nuova, si era ipotizzato che il problema non risiedesse nel circuito dello strumento, ma semplicemente nell'iniettore. Pertanto, sono stati eseguiti dei ripetuti cicli di lavaggio di tale componente (Par. 4.6.4), al termine dei quali sono state ripetute le iniezioni dei solventi. Nella Figura 4.29 viene mostrato un esempio di confronto tra dei cromatogrammi ottenuti prima e dopo la pulizia dell'iniettore.

Come si può notare, il lavaggio dell'iniettore con l'iPrOH, è responsabile della diminuzione dell'intensità dei picchi presenti nei primi minuti.

In particolare, nel caso della soluzione ACN:WMQ 80:20 v/v gli stessi si abbassano da 4.000 a 1.000 mV (Fig. 4.29.A vs. B), da circa 100.000 a 1.750 mV nel caso della soluzione MeOH:WMQ 80:20 v/v (Fig. 4.29.C vs. D), ed infine, da 4.500 a ca. 2.000 mV nel caso della

fase mobile ACN:TF25 27:73 v/v (Fig. 4.29.E vs. F). Tuttavia, permangono ancora alcuni picchetti dopo i 5 minuti, ed in alcuni casi anche le derive sono migliorate.

Pertanto, nonostante l'evidente miglioramento ottenuto in seguito ai diversi cicli di lavaggio eseguiti, i cromatogrammi ottenuti non sono risultati identici a quelli mostrati nella Figura 4.28, i quali vengono presi come riferimento.

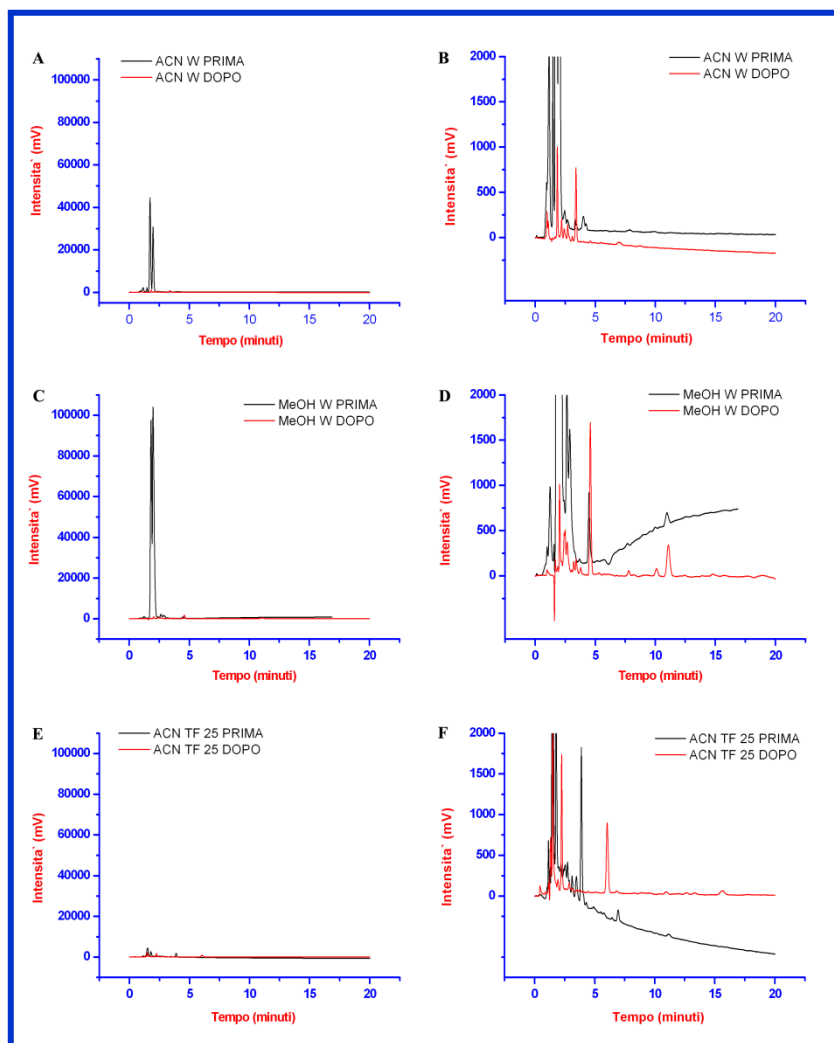


Figura 4.29. Cromatogramma di (A) ACN:WMQ 80:20 v/v, (B) ingrandimento di A, (C) MeOH:WMQ 80:20 v/v, (D) ingrandimento di C, (E) ACN:TF-25 27:73 v/v, (F) ingrandimento di E. In ciascun cromatogramma è presente il cromatogramma prima (in nero) e dopo (in rosso) il lavaggio dell'iniettore. Condizioni: 20 μ L di solvente iniettato in colonna accessoriata con PC, a 254 nm, 1,0 mL/min con la fase mobile identica al solvente in questione.

Un'ulteriore anomalia è stata riscontrata durante l'acquisizione, a due lunghezze d'onda differenti, del cromatogramma dell'iniezione della fase mobile ACN:TF25 27:73 v/v (Fig. 4.30).

Nella Figura 4.30 è possibile notare che la linea di base del cromatogramma registrato a 254 nm presenta una deriva negativa. Immediatamente, si potrebbe pensare che la causa possa essere attribuita ad un condizionamento dello strumento non

sufficientemente lungo. Tuttavia, tale ipotesi è stata scartata in quanto l'iniezione a 254 nm è stata successiva a quella effettuata a 265 nm. Quanto osservato rimane senza spiegazione.

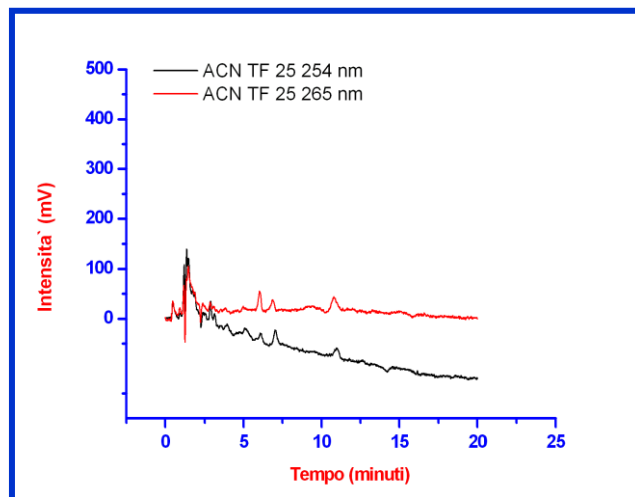


Figura 4.30. Cromatogramma della fase mobile ACN:TF25 27:73 v/v. I cromatogrammi sono stati acquisiti a 254 nm (in nero) e a 265 nm (in rosso). Condizioni: 20 μ L di solvente sono stati iniettati in colonna accessoriata con PC, a 254 e 265 nm, 1,0 mL/min con la fase mobile identica al solvente iniettato.

Lavaggio dei pescanti e delle bottiglie solventi

Il lavaggio delle bottiglie e dei pescanti è abbastanza importante perché eventuali impurezze qui presenti possono andare a contaminare le fasi mobili oppure ostruire il FRIT, la precolonna, la colonna di guardia, ed anche in ultimo la colonna.

Le bottiglie dedicate ai solventi sono state utilizzate pulite ogni qualvolta siano state effettuate delle analisi consecutive e rabboccate durante la giornata se il volume non era sufficiente all'analisi.

Periodicamente, (ogni 3 - 4 mesi) vengono lavati anche i pescanti, secondo il protocollo prima descritto (Par. 4.6.4).

Tale protocollo è stato allestito secondo ciò che veniva consigliato nel manuale dello strumento [55], apportando però delle modifiche a quello che era stato effettuato tempo prima dal tecnico Shimadzu.

Solo una volta è stato seguito un protocollo differente, effettuato dal servizio tecnico dello strumento. In questo caso, si sono utilizzati tre cicli di lavaggio in ultrasuoni (i.e., 1° ciclo: WMQ; 2° ciclo: NaOH acq. 2M; e 3° ciclo: WMQ) della durata di 15 minuti ciascuno. Tuttavia, in seguito a questa operazione si sono avuti degli episodi di opalescenza dell'acqua della bottiglietta molto marcati, tali da doverla cambiare quasi ogni giorno. È stato verificato che il terzo lavaggio in acqua non sia sufficiente per neutralizzare la base. Pertanto, è stato deciso di non utilizzare più l'NaOH ma di seguire alla lettera le istruzioni della casa madre, aumentando il tempo da 15 a 30 minuti. L'iPrOH (polarità 3,9 [30])

dovrebbe essere in grado di rimuovere le impurezze organiche non-polari, mentre l'WMQ quelle polari.

Lavaggio della bottiglietta

Con questo termine "bottiglietta" si intende quella che contiene l'acqua di lavaggio dei retro-pistoni. È risaputo che uno dei problemi più importanti quando si utilizzano i tamp oni in HPLC è la possibilità che si formino cristalli in questa zona, che creerebbero malfunzionamenti dello strumento. Lo strumento utilizzato ha un sistema che permette il costante lavaggio di questa porzione quando le pompe sono accese ed una fase mobile percorre il circuito [56]. Pertanto, è normale che nel tempo, il solvente nella bottiglietta si sporchi (aspetto biancastro opalescente), e quindi si cambia ogni settimana a prescindere. Quando il solvente viene cambiato, bisogna fare attenzione all'aspetto della bottiglietta che deve essere esente da incrostazioni (altrimenti si lava).

Nella nostra esperienza abbiamo osservato che (i) è necessario essere sicuri di aver lavato via tutto il sapone. (ii) È possibile utilizzare una soluzione acqua-alcool in cui l'iPrOH è presente al 10% v/v. Questa soluzione è in grado di rimuovere il grasso dei pistoni; l'acqua schiumeggia ed assume un odore caratteristico. (iii) Una sola volta i tubicini che trasportano la soluzione si sono riempiti di un precipitato marroncino (simile ad un precipitato proteico) dopo alcuni giorni di inattività. Questo era presente solo nei tubicini e non nella bottiglietta. Ciò è accaduto dopo l'intervento del tecnico della casa madre ed è un evento che è rimasto senza spiegazione.

Lavaggio iniettore

Su consiglio dell'assistenza tecnica, l'autocampionatore/iniettore è stato lavato con iPrOH al 100% (nella bottiglia ad esso dedicata, R) per una durata di 60 minuti al flusso impostato automaticamente dallo strumento, che è stato da noi verificato (1 mL/min).

Successivamente, sono stati effettuati sei lavaggi (i.e., "rinse") consecutivi prima di procedere con l'iniezione del campione.

Il manuale dello strumento non consiglia nessun solvente in particolare, perché questo dovrà essere scelto in funzione dei campioni e della FM utilizzati.

Lavaggio vial

Le vial sono state lavate come descritto nel Paragrafo 4.2. Si precisa che le vial sono state lavate abbondantemente con acqua di fonte, e risciacquate 10 volte con WMQ prima di essere lasciate asciugare a testa in giù su carta verde. Prima di essere riposte sono state osservate controluce per verificare l'assenza di eventuali depositi, e lucidate con un panno in microfibra.

4.9.3 Separazione cromatografica: messa a punto della metodica finale

All'inizio di questo lavoro è stato preso in considerazione l'articolo di Brown *et al.* [13] ed alcuni dati preliminari ottenuti precedentemente utilizzando la fase mobile ivi indicata.

Prima di tutto, si è proceduto all'eliminazione del THF in quanto incompatibile con i tubi in peek che possono rigonfiarsi/deformarsi ad una temperatura superiore ai 20°C [57]. Sebbene il THF sia sempre stato miscelato con ACN e quindi non è passato puro nei tubicini, neanche per un breve tragitto, tecnici e fornitori non sono stati in grado di dirci quale sia la percentuale di THF in una miscela che possa essere sopportata dal peek. Pertanto, abbiamo deciso di eliminarlo dalla composizione della fase mobile.

In secondo luogo, ci siamo soffermati sul tampone fosfato per due motivi: (i) il tampone da noi utilizzato è costituito da sali di fosfato di potassio monobasico e di fosfato di potassio dibasico (Par. 4.2), a differenza di quello di sodio usato da Brown *et al.* [13]. Inoltre, (ii) si è presa in esame la solubilità del tampone fosfato nei solventi organici.

Nonostante la scarsità di riferimenti bibliografici relativi alla solubilità del tampone fosfato nelle miscele idro-organiche, è stato trovato uno studio interessante di Schellinger *et al.*, dove viene riportato il comportamento di alcuni tamponi fosfato [58]. Questi autori hanno dimostrato che la solubilità del tampone segue lo stesso andamento della solubilità in acqua dei suoi cationi ($\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+$) [58]. Tuttavia, la solubilità è influenzata anche dalla concentrazione del tampone, dal solvente organico con cui il tampone è miscelato, e dal pH della soluzione finale [58].

Pertanto, è stato possibile giustificare una maggior solubilità del tampone fosfato di potassio da noi utilizzato rispetto a quello sodico presente nell'articolo di Brown *et al.*

Gli studi di Schellinger *et al.*, si sono limitati all'utilizzo di tamponi di sali inorganici in quanto meno solubili dei sali organici nei classici co-solventi (e.g., MeOH, ACN, ...). Gli studi si sono focalizzati sull'acetato di ammonio, sul fosfato d'ammonio e sul fosfato di potassio, la cui solubilità decresce nell'ordine in cui sono stati citati. I sali sodici non sono stati presi in considerazione a causa della loro bassa solubilità nei solventi organici. Pertanto, questi autori hanno preso il fosfato di potassio come riferimento [58].

Negli esperimenti portati avanti da Schellinger *et al.* sono stati calcolati il limite di solubilità ed il volume della frazione del co-solvente organico (% B; % solvente organico in Tab. 4.16) della soluzione finale nel punto di precipitazione, conoscendo il volume e la concentrazione del tampone e la miscela organico-acquosa. I dati ottenuti e rappresentati nella Tabella 4.16 (sotto) sono stati ottenuti dalla preparazione di soluzioni preparate con tutti i tamponi in esame a concentrazioni 5 e 50 mM.

Tabella 4.16. Dati relativi agli esperimenti di solubilità del tampone in fosfato di potassio a pH 7

Solubilità del tampone fosfato (mM)			
% solv. organico	MeOH	ACN	THF
0	>50	>50	>50
10	>50	>50	>50
20	>50	>50	>50
30	>50	>50	>50
40	>50	>50	50
50	>50	>50	25
60	>50	45	15
70	35	20	10
80	15	5	<5
90	5	0	0

Pertanto, si può evincere che entrambe le concentrazioni da noi utilizzate, non dovrebbero presentare problemi di precipitazione a contatto con l'ACN durante l'analisi [58]. Tuttavia, se i sali non fossero eluiti completamente durante la prima fase di lavaggio della colonna, la seconda e la terza fase di lavaggio li farebbe precipitare.

Infine, è necessario indicare che i tamponi fosfato possono essere in grado di solubilizzare la silice presente nelle colonne cromatografiche. Questo processo è influenzato dal tipo di fosfato ($\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+$), dalla concentrazione del tampone (> 50 mM), dal pH (> 7), e dalla temperatura ($> 40^\circ\text{C}$) [59]. In condizioni più miti di quelle indicate tra parentesi, il processo dissolutivo dovrebbe essere pressoché nullo [59].

Pertanto, si può concludere che nelle condizioni da noi utilizzate non si dovrebbero creare quelle condizioni tali da far avvenire la dissoluzione della silice. Inoltre, i risultati di tali esperimenti ci permettono di poter utilizzare con tranquillità il metodo da noi prescelto in quanto: il tampone fosfato a pH=7 presenta una concentrazione alquanto inferiore ai limiti di rischio verificati dagli autori, 25 mM; la temperatura di analisi da noi impostata e monitorata non supera mai i 25°C ; il pH nonostante sia al limite del valore a cui iniziano ad insorgere i problemi, si mantiene stabile durante la corsa cromatografica ed è associato ad una concentrazione di tampone largamente consentita.

Escludendo il THF, si è iniziato lo studio dalla FM-2, e pertanto si sono allestite due soluzioni madre di IbuNa (1 mg/mL in FM-2) e di DicloNa (1 mg/mL in FM-2). Le due sostanze sono state iniettate (20 μL) separatamente ed eluite con le FM-2 - FM-7 dove i rapporti tra ACN e TF-50 variano all'interno di questo range rispettivamente da 25:75 fino a 30:70 (Tab. 4.5). I risultati sono mostrati in Tabella 4.17 (dati puntuali) e Figura 4.31 (visione d'insieme).

Tabella 4.17. Dati relativi all'integrazione delle FM-2-7

IbuNa-L1					
Fase Mobile	Tempo (min)			Area	Spalle
	iniziale	finale	T. ritenzione		
FM-7	4,60	6,20	4,77	1.056.228	dx
FM-6	5,20	7,02	5,38	1.060.126	dx
FM-5	5,92	7,80	6,11	1.065.397	dx
FM-2	6,90	9,75	7,04	1.065.397	dx
FM-4	8,00	10,65	8,25	1.072.443	dx
FM-3	9,97	12,65	10,26	1.103.258	dx

DicloNa					
Fase Mobile	Tempo (min)			Area	Spalle
	iniziale	finale	T. ritenzione		
FM-7	5,70	7,90	5,92	19.958.891	dx
FM-6	6,70	9,20	6,93	20.136.160	dx
FM-5	7,90	12,00	8,19	20.296.140	
FM-2	9,60	13,70	9,90	20.447.062	
FM-4	11,70	16,40	11,98	20.587.160	
FM-3	16,00	20,30	16,38	20.797.426	

L'analisi congiunta dei risultati mostra che all'aumentare della percentuale di ACN, i picchi si affusolano, diventano più alti, e si spostano a sinistra (i.e., tempi di ritenzione più brevi). Se, per esempio, si confrontano i dati ottenuti con la FM-3 (ACN 25%) e la FM-7 (ACN 30%) si può osservare che il tempo di ritenzione dell'IbuNa passa rispettivamente da 10,3 ai 4,8 minuti, mentre quello del DicloNa da 16,4 a 5,9 minuti (Tab. 4.16). Queste osservazioni sono in accordo con quanto già commentato nel Paragrafo 4.6.2. Ovviamente, anche i tempi di ritenzione di tutti gli altri picchi si modificheranno conseguentemente.

Per scelta della miglior fase eluente si è tenuto conto del tempo di separazione tra i due picchi, della pulizia di tale tratto (Fig. 4.31.C e D) e di un tempo di ritenzione non troppo anticipato per l'IbuNa, che si potesse sovrapporre al fronte del solvente, e non particolarmente ritardato per il DicloNa, in quanto avrebbe determinato una corsa cromatografica troppo lunga.

Le caratteristiche ricercate sono state maggiormente rispettate nelle FM-2 e 4, che sono state mostrate separatamente per poterle confrontare più facilmente (Fig. 4.32).

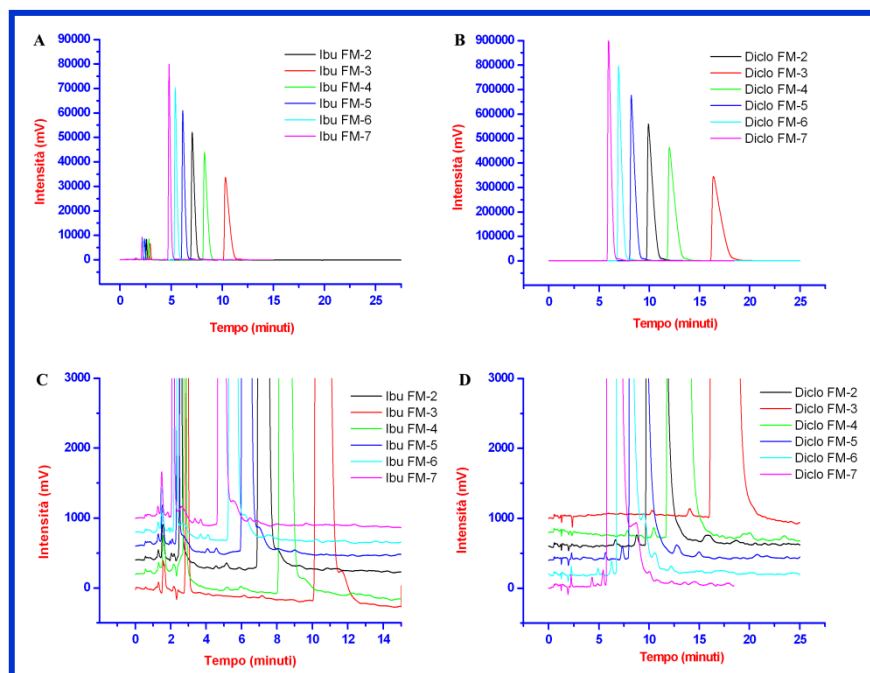


Figura 4.31. Cromatogrammi di IbuNa-L1 (A) e DicloNa (B) con i rispettivi ingrandimenti (C e D) volutamente traslati. Di seguito sono riassunte le condizioni di separazione. Campioni: entrambe le molecole sono sciolte (1 mg/mL) in FM-2; il volume di iniezione è 20 μ L; filtrati con Acrodisc. Colonna accessoriata con CG del tipo CC. Lunghezza d'onda di rilevamento: 254 nm. Flusso: 1 mL/min. Fase mobile di eluizione: in leggenda; filtrazione dei solventi: filtri Whatman in fibra di vetro.

La Figura 4.32 mostra che la separazione delle due sostanze necessiterebbe di 15 o 20 minuti utilizzando rispettivamente la FM-2 e la FM-4. Inoltre, dagli ingrandimenti della Figura 4.32 (C e D) si può notare che alcuni piccoli picchi provenienti dal DicloNa si sommerebbero a quello dell'IbuNa, in entrambi i casi.

Si è cercato di risolvere questo problema cambiando il flusso, e cioè effettuando le precedenti separazioni a 0,7 e 1,2 mL/min per la FM-2 e 1,2 e 1,3 mL/min per la FM-4 (Fig. 4.33). La Figura 4.33 mette in evidenza come l'aumento del flusso comporti un anticipo dei tempi di ritenzione, come era logico aspettarsi. Purtroppo, le aree (Tab. 4.18) non si sono mantenute costanti in questo esperimento per cause a noi sconosciute e pertanto, non si possono estrapolare altri dati utili alla discussione (e.g., migliore o peggiore separazione dei picchi).

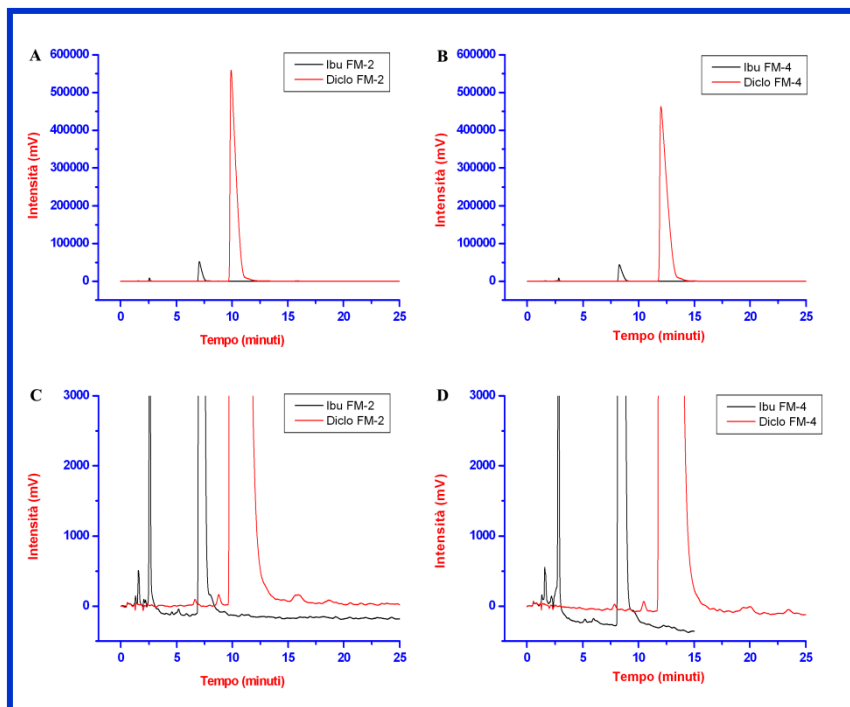


Figura 4.32. Cromatogrammi di IbuNa e DicloNa ottenuti con le FM-2 e 4. In questa figura vengono isolati i cromatogrammi relativi alle soluzioni di IbuNa (in nero) e DicloNa (in rosso) analizzati con FM-2 (A) e FM-4 (B) e i rispettivi ingrandimenti (C e D). Condizioni di separazione: Campioni: entrambe le molecole sono sciolte (1 mg/mL) in FM-2; il volume di iniezione è 20 μ L; filtrati con Acrodisc. Colonna accessoriata con CG del tipo CC. Lunghezza d'onda di rilevamento: 254 nm, Flusso: 1 mL/min. Fase mobile di eluizione: in leggenda; filtrazione dei solventi: filtri Whatman in fibra di vetro.

In seguito, si è voluto provare a sostituire il THF eliminato con un solvente che avesse delle caratteristiche simili al THF utilizzato nell'articolo di riferimento. La scelta ha tenuto conto dell'idrofilicità di tale solvente, ricadendo così sull'iPrOH, caratterizzato da uno stesso grado di polarità (i.e., viscosità: iPrOH= 2,30 cP; THF= 0,55 cP; indice di polarità: acqua= 9,0, THF= 4,0, iPrOH= 3,9; miscibilità in acqua = tutti e due 100% [48]). A differenza di Brown *et al*, non è stata effettuata una premiscelazione del solvente scelto con l'ACN, ma è stata impostata la miscelazione automatica da parte dello strumento.

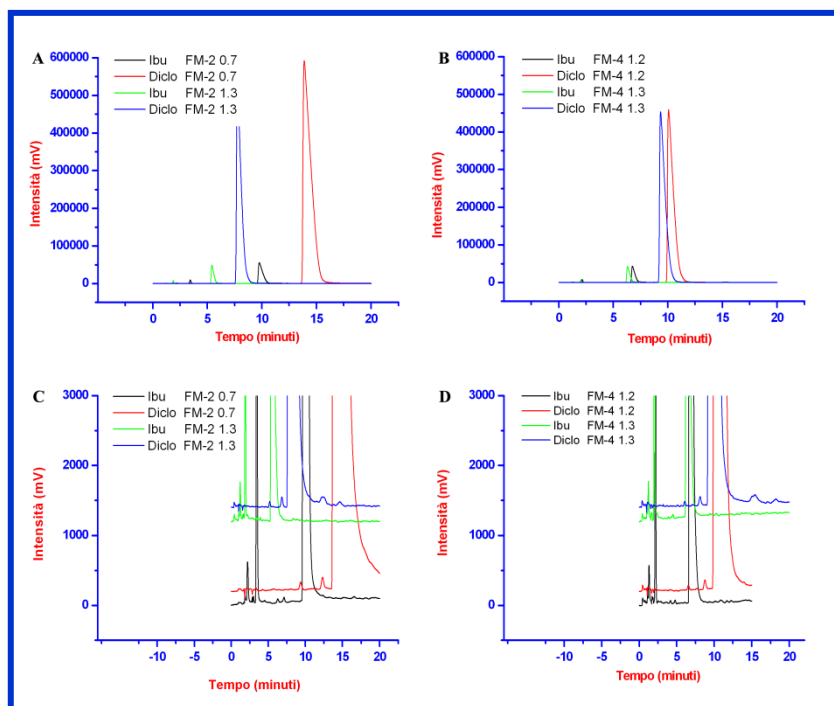


Figura 4.33. Cromatogrammi di IbuNa e DicloNa ottenuti con le FM-2 e FM-4 e variando il flusso. In questa figura vengono isolati i cromatogrammi relativi alle soluzioni di IbuNa e DicloNa nella FM-2 (A) e FM-4 (B) in cui si applica la variazione del flusso (0,7, 1,2 e 1,3 mL/min). Con le lettere "C" e "D" sono indicate rispettivamente i cromatogrammi ingranditi di IbuNa e DicloNa con FM-2 e 4 rispettivamente. Condizioni di separazione: Campioni: entrambe le molecole sono sciolte (1 mg/mL) in FM-2; il volume di iniezione è 20 μ L; filtrati con Acrodisc. Colonna accessoriata con CG del tipo CC. Lunghezza d'onda di rilevamento: 254 nm. Flusso: 1 mL/min. Fase mobile di eluizione: in legenda; filtrazione dei solventi: in legenda; filtri Whatman in fibra di vetro.

Tabella 4.18. Dati relativi all'integrazione delle FM-2 ed FM-4 ai flussi 0,7, 1,2 e 1,3 mL/min

		IbuNa-L1			Area	Spalle
		Tempo (min)		T. ritenzione		
Fase Mobile	Flusso (mL/min)	iniziale	finale			
FM-2	0,7	9,50	12,06	9,75	1.549.551	
FM-2	1,3	5,20	7,3	5,41	837.705	
FM-4	1,2	6,49	8,29	6,74	913.728	
FM-4	1,3	6,03	7,95	6,29	845.341	
		DicloNa			Area	Spalle
		Tempo (min)		T. ritenzione		
Fase Mobile	Flusso (mL/min)	iniziale	finale			
FM-2	0,7	13,50	18,30	13,88	29.587.727	
FM-2	1,3	7,46	11,60	7,73	15.840.780	
FM-4	1,2	9,74	12,23	10,05	17.348.404	
FM-4	1,3	9,06	11,68	9,33	16.019.662	

È così iniziato lo studio di IbuNa-L1 e del DicloNa con alcune fasi mobili (i.e., FM-8, FM-9, FM-10) caratterizzate da una composizione fissa di ACN (27%) e variabile di TF-50 (72 - 70%) e iPrOH (1 -3%), per verificare la loro influenza nella separazione dei due farmaci (Fig. 4.34).

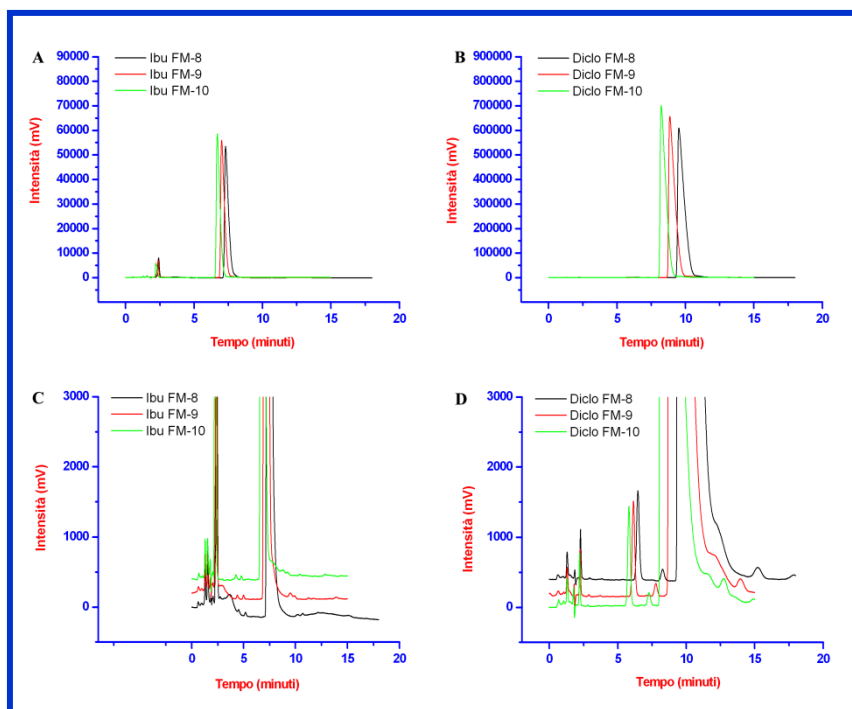


Figura 4.34. Cromatogrammi di IbuNa (primo lotto) e DicloNa ottenuti con le FM-8, 9 e 10. Campioni: entrambe le molecole sono sciolte (1 mg/mL) in FM-2, il volume di iniezione è 20 μ L; filtrati con Acrodisc. Colonna accessoriata con CG del tipo CC. Lunghezza d'onda di rilevamento: 254 nm. Flusso: 1 mL/min. Fase mobile di eluizione: in legenda; filtrazione dei solventi: filtri Whatman in fibra di vetro.

La Figura 4.34 mette in evidenza come all'aumentare della percentuale di iPrOH nella composizione della fase mobile, venga anticipata l'uscita della sostanza d'interesse. Oltretutto, compare a ca. 5 minuti un picco (intensità: ca. 1000 mV) che non è presente nei cromatogrammi precedenti del DicloNa.

La forma del picco dell'IbuNa (Fig. 4.34.C) appare con una spalla leggermente accennata nella FM-10 che tende ad assumere le sembianze di uno scodamento nel lato destro (simmetria > 1) nelle altre due FM, mentre la forma del picco del DicloNa presenta una vera e propria spalla seguita da un picchetto alla sua destra e due picchi successivi, che precedentemente non erano così consistenti (0,05 vs 1500 mV, 4.34.D vs 4.34.D), alla sua sinistra. Pertanto, in generale è possibile affermare che non sono stati ottenuti degli evidenti miglioramenti di forma, ma anzi è stato notato un peggioramento rispetto all'analisi effettuata utilizzando la fase mobile priva di iPrOH (Fig. 4.32). Il tempo di ritenzione ha mostrato, invece, un'anticipazione accettabile.

Nonostante, i cromatogrammi ottenuti non siano stati completamente soddisfacenti, è stato approfondito lo studio sull'iPrOH effettuando delle corse cromatografiche utilizzando, questa volta, le FM 13 - 16, nelle quali anche la percentuale di composizione dell'ACN è stata variata (Fig. 4.35).

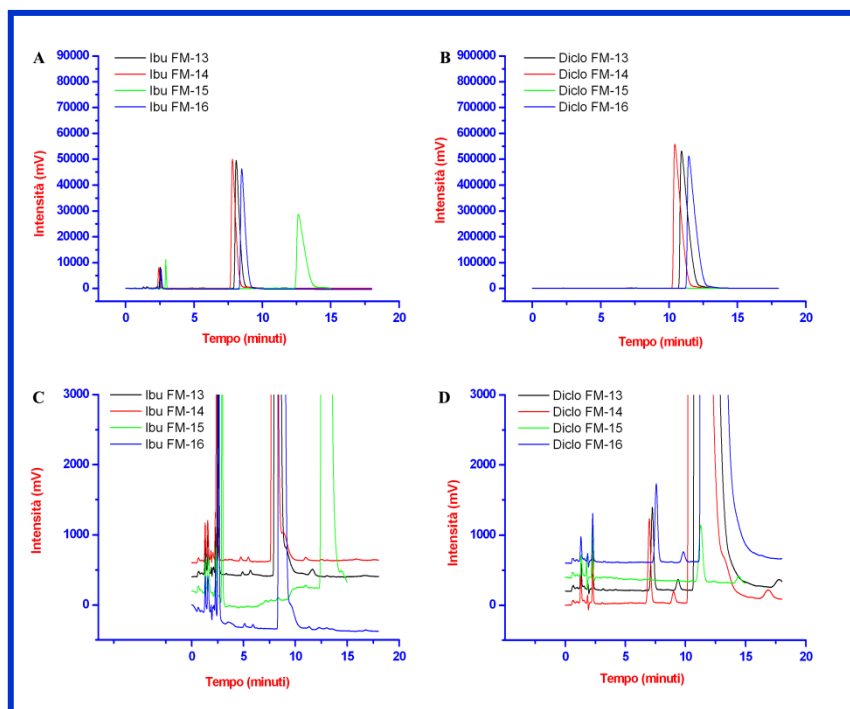


Figura 4.35. Cromatogrammi di IbuNa L1 e DicloNa ottenuti con le FM-13-16. Campioni: entrambe le molecole sono sciolte (1 mg/mL) in FM-2, il volume di iniezione è 20 μ L; filtrati con Acrodisc. Colonna accessoriata con CG del tipo CC. Lunghezza d'onda di rilevamento: 254 nm. Flusso: 1 mL/min. Fase mobile di eluizione: in leggenda; filtrazione solventi: filtri Whatman in fibra di vetro.

La Figura 4.35 mette in evidenza come la variazione della percentuale di ACN abbia portato ad un incremento delle spalle presenti alla destra del picco dell'IbuNa, rispetto alla Figura 4.34. D'altro canto, è possibile notare un miglioramento nei cromatogrammi del DicloNa (rispetto alla Fig. 4.34), i quali evidenziano una scomparsa della spalla per le FM-13 e 16, mentre per la FM-14 la spalla permane ma in maniera molto meno accentuata, e anche il picchetto alla sua destra risulta essere più regolare e più vicino alla linea di base.

Inoltre, è possibile notare come nella FM-15, caratterizzata dalla percentuale inferiore di ACN rispetto alle altre tre, ci sia un notevole spostamento dei picchi verso destra. Tale movimento non ha permesso la visualizzazione del DicloNa nella corsa cromatografica dei 20 minuti, in quanto il suo tempo di ritenzione si è modificato a tal punto da oltrepassare la durata dell'analisi.

Questo comporterebbe la necessità di una corsa cromatografica troppo lunga, non conveniente in termini di tempo e quantità di solvente necessario.

Nella Tabella 4.19, nella sezione dedicata al DicloNa, è possibile notare come non siano stati registrati i dati relativi alle FM-11, FM-12 ed FM-15. Tale assenza è dovuta alla non iniezione della molecola utilizzando le suddette FM.

Tabella 4.19. Dati relativi all'integrazione dalla FM-8 alla FM-16 ai flussi 1,0 mL/min a 254 nm

IbuNa-L1					
Tempo (min)					
Fase Mobile	iniziale	finale	T. ritenzione	Area	Spalle
FM-8	7,05	9,22	7,29	1.100.245	Dx
FM-9	6,76	8,76	7,00	1.093.250	Dx
FM-10	6,49	8,54	6,68	1.089.896	Dx
FM-11	5,72	7,01	5,96	1.076.228	Dx
FM-12	4,79	6,25	5,05	1.070.911	Dx
FM-13	7,82	10,22	8,07	1.100.890	Dx
FM-14	7,56	9,55	7,79	1.099.237	Dx
FM-15	12,26	15,00	12,63	1.120.269	Dx
FM-16	8,19	10,55	8,48	1.102.516	Dx

DicloNa					
Tempo (min)					
Fase Mobile	iniziale	finale	T. ritenzione	Area	Spalle
FM-8	9,19	12,85	9,51	20.659.562	Dx
FM-9	8,54	11,30	8,85	20.512.356	Dx
FM-10	8,00	10,73	8,22	20.380.705	Dx
FM-11	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	--
FM-12	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	--
FM-13	10,56	13,71	10,90	20.778.670	
FM-14	10,08	13,17	10,42	20.671.092	Dx
FM-15	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	
FM-16	11,10	14,31	11,43	20.732.450	

Concludendo, in base a tutte le prove eseguite ed ai cromatogrammi analizzati e confrontati, è stato deciso di effettuare una scelta tra le tante FM sperimentate. È stato tenuto conto dei picchi esenti da spalle e con dei tempi di ritenzione che permettessero una netta separazione tra le molecole. Inoltre, considerando la metodica utilizzata nell'articolo di riferimento, è stato tentato di discostarsi il meno possibile. Pertanto la scelta è ricaduta sulla FM-17, la quale presenta come unica differenza dalla metodica di Brown *et al.* l'assenza del THF e la concentrazione inferiore del TF.

4.9.4 Retta di calibrazione

Dopo aver stabilito quale fosse la fase mobile maggiormente indicata per la separazione dei due farmaci, si è proceduto con l'allestimento della retta di calibrazione, necessaria per la quantificazione della sostanza nei futuri campioni a concentrazione incognita provenienti dagli esperimenti di veicolazione transdermica.

Lo studio è iniziato con l'iniezione di 15 diluizioni seriali ($n = 1$) delle madri (1 mg/mL) di IbuNa-L1 e DicloNa iniettate separatamente, dalla più concentrata alla meno concentrata, in sequenza continua, prima tutti i campioni dell'IbuNa-L1 e poi quelli del DicloNa. I risultati sono mostrati in Tabella 4.19 dove possiamo notare quanto segue:

1. i tempi di ritenzione dell'IbuNa-L1 sono compresi nell'intervallo 7,88 - 8,04 minuti all'interno delle 15 corse, e sono ritardati rispetto a quelli osservati precedentemente utilizzando la FM-2 (Tab. 4.17; TR medio: 7,04 min.);
2. Le aree dei 15 campioni di IbuNa-L1 mantengono un rapporto di 1,95 - 2,0 tra campioni successivi che segue bene la diluizione seriale fino al campione a concentrazione 0,98 $\mu\text{g/mL}$. Rispetto all'area del campione a concentrazione 1.000 $\mu\text{g/mL}$ (Tab. 4.17) e quello a concentrazione 500 $\mu\text{g/mL}$ (Tab. 4.20) risulta essere 0,51 volte più piccolo (1,96 rapporti precedenti);
3. I tempi di ritenzione del DicloNa sono compresi nell'intervallo 10,46 - 11,39 all'interno delle 15 corse, e sono posticipati rispetto a quelli osservati precedentemente sempre per la FM-2 (Tab. 4.17; TR medio: 9,90 min.);
4. Le aree dei 15 campioni del DicloNa mantengono un rapporto costante (1,98) che segue la diluizione. Rispetto all'area del campione a concentrazione 1.000 $\mu\text{g/mL}$ (Tab. 4.17) ed a quello a concentrazione 500 $\mu\text{g/mL}$ (Tab. 4.20) risulta essere 2,05; in entrambi i casi la forma del picco dei due farmaci ha sempre avuto una simmetria > 1 [60], come precedentemente osservato;
5. Gli intervalli di concentrazione in cui è stato possibile quantificare senza problemi l'IbuNa-L1 ed il DicloNa sono rispettivamente 500 - 0,12 e 500 - 0,49 $\mu\text{g/mL}$. Tuttavia, dalla 23^{ma} iniezione (DicloNa 3,91 $\mu\text{g/mL}$) si è potuto osservare che la forma e l'intensità di tutti i picchi presenti nel cromatogramma si stava modificando. Per questo motivo, laddove ci siano delle incertezze, i valori ricavati sono indicati in corsivo per entrambi i farmaci in Tabella. 4.19. Pertanto, nelle condizioni di queste analisi, il limite di rivelamento è uguale a 0,24 $\mu\text{g/mL}$ ed inferiore a 0,98 $\mu\text{g/mL}$ rispettivamente per l'IbuNa-L1 ed il DicloNa. Ragionando sulle aree del DicloNa, si potrebbe arrivare ad un limite di rilevamento di ca. 7 - 8 ng/mL.

Inoltre, analizzando il cromatogramma, prima e dopo i picchi d'interesse, è stata notata, per quanto concerne l'IbuNa, la presenza di alcuni picchi tra 2,25 - 2,50 minuti, che non risultano essere identici (per forma ed area) nelle 15 ripetizioni; il DicloNa, invece, appare con una linea di base priva dei picchi presenti nell'altra molecola. Pertanto, è ipotizzabile che i picchi rilevati nel cromatogramma dell'IbuNa siano propri di tale sostanza e non attribuibili alla FM.

In seguito all'analisi dei cromatogrammi delle due rette è stato preso in considerazione il range 7,81 - 0,03 $\mu\text{g/mL}$ per l'IbuNa-L1 che più rispecchiava le concentrazioni attese dai campioni incogniti che provengono dagli esperimenti di veicolazione transdermica. Per quanto riguarda il DicloNa, invece, è stata scelta la concentrazione 0,98 $\mu\text{g/mL}$.

Lo studio della retta allestita con l'aggiunta del DicloNa a ciascuna concentrazione dell'IbuNa, preparato come descritto precedentemente (Par. 4.6.6), è proseguito attraverso l'iniezione di un triplicato analizzato, per questioni di tempo, in tre giorni differenti.

Con "triplicato" ci si riferisce alla preparazione di tre rette distinte. I campioni relativi ad ognuna delle tre rette sono stati preparati il giorno stesso dell'esecuzione delle analisi cromatografiche, a partire da soluzioni madri preparate qualche istante prima delle successive diluizioni seriali. Ogni giorno tutto il circuito è stato sottoposto a lavaggio, e la pressione finale era di 44 bar (160 bar iniziali), pressione abbastanza vicina a quella di un circuito completamente pulito (36 - 39 bar; Tab. 4.15; Par. 4.9.1).

Inoltre, si precisa che (i) le soluzioni madri preparate per le analisi tabulate in Tabella 4.20 - 4.23 sono state allestite utilizzando delle bottigliette in vetro, e (ii) che è stato necessario ricalcolare le concentrazioni dell'IbuNa, in quanto l'aggiunta del DicloNa ai campioni ha apportato una diluizione al campione di IbuNa.

Tabella 4.20. Dati delle due rette di Ibu Na e Diclo Na (FM-2, 1,0 mL/min, 254 nm)

IbuNa-L1					
Concentrazione $\mu\text{g/mL}$	Tempo (min)		TR	Area	Spalle
	iniziale	finale			
500	7,5	9,4	7,79	544.233	Dx
250	7,6	9,4	7,88	277.184	Dx
125	7,6	9,4	7,93	141.362	Dx
62,50	7,6	9,4	7,95	72.430	
31,25	7,6	9,4	7,96	35.982	
15,63	7,6	9,3	7,97	18.213	
7,81	7,7	9,7	7,99	9.583	
3,91	7,6	8,4	8,01	4.689	
1,95	7,7	9,4	8,04	2.711	
0,98	7,5	8,9	8,02	1.434	
0,49	7,5	8,5	8,03	877	
0,24	7,6	8,5	7,96	427	
0,12	7,8	8,3	7,98	655	
0,06	7,8	8,2	7,96	368	
0,03	7,8	8,2	7,94	165	

DicloNa					
Concentrazione $\mu\text{g/mL}$	Tempo (min)		TR	Area	Spalle
	iniziale	finale			
500	10,1	12,7	10,46	9.978.567	Dx
250	10,2	12,8	10,70	5.028.281	Dx
125	10,4	12,6	10,91	2.540.513	Dx
62,50	10,5	12,8	11,03	1.272.070	Dx
31,25	10,5	12,8	11,05	642.518	Dx
15,63	10,6	12,7	11,08	324.387	Dx
7,81	10,6	12,7	11,07	164.619	Dx
3,91	10,5	12,9	11,23	85.813	Dx
1,95	10,5	12,9	11,34	46.460	Sx-Dx
0,98	10,6	12,9	11,39	26.456	Sx-Dx
0,49	10,5	12,9	11,13	18.380	
0,24	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
0,12	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
0,06	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
0,03	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.

Le concentrazioni corrette sono mostrate nella Tabella 4.21. Tutti i dati relativi a questo esperimento sono mostrati nelle Tabelle 4.21 - 4.23 e Figura 4.37.

I dati mostrati in Tabella 3.16 indicano che:

1. i tempi di ritenzione dell'IbuNa-L1 sono compresi tra 8,07 e 7,90 minuti. Inoltre, rispetto ai dati mostrati in Tabella 4.17 si può osservare che risultano essere ritardati di ca. 1 minuto (7,04 min.); mentre rientrano nel range individuato nella Tabella 4.20.
2. Le aree dei 9 campioni di IbuNa-L1 mantengono un rapporto che varia nell'intervallo 1,7 - 2,4 che segue la diluizione. Nelle tre repliche successive, si è osservato che nelle basse concentrazioni, in alcuni casi, non è stato possibile integrare i picchi perché di difficile individuazione. Questi valori sono indicati in Tabella 4.21 con la sigla *n.r.*. Rispetto all'area del campione a concentrazione 1.000 $\mu\text{g/mL}$ (Tab. 4.17) ed a quello a concentrazione 500 $\mu\text{g/mL}$ (Tab. 4.20) i campioni a concentrazione 7,69 $\mu\text{g/mL}$ risultano essere più alti rispetto all'area teorica di 8.636 (calcolata per proporzionalità dalla Tab. 4.20) che dovrebbero avere.
3. La forma dei picchi del IbuNa-L1 nei vari cromatogrammi ($n = 9 \times 3$; non mostrati) presenta una simmetria = 1 ad entrambe le lunghezze d'onda, ed i picchi si mostra no caratterizzati da una forma stretta alla base ed allungata.
4. Gli intervalli di concentrazione in cui è stato possibile quantificare senza problemi l'IbuNa-L1 sono 7,69 - 0,12 $\mu\text{g/mL}$. Concentrazioni più piccole non sarebbero quantificabili con precisione. Pertanto, nelle condizioni di questa analisi, si può affermare che il limite di rivelamento è di ca. 0,12 $\mu\text{g/mL}$.

Continuando con l'analisi dei dati in Tabella 4.22, si può riassumere che:

1. i tempi di ritenzione del DicloNa variano tra 10,98 - 11,16 minuti. Rispetto ai dati mostrati in Tabella 4.17 e 4.20 si può osservare che queste ultime analisi risultano avere dei tempi anticipati (9,90 min.).
2. Le aree dei 9 campioni del DicloNa nelle diverse repliche oscillano in un intervallo compreso tra 15.619 e 20.759 unità arbitrarie. Rispetto all'area del campione a concentrazione 1.000 $\mu\text{g/mL}$ (Tab. 4.17) ed a quello a concentrazione 500 $\mu\text{g/mL}$ (Tab. 4.20), i campioni a concentrazione 0,98 $\mu\text{g/mL}$ risultano essere in alcuni casi più alti o più bassi rispetto all'area teorica di ca. 19.500 che dovrebbero avere. Rispetto all'area tabulata in Tabella 4.20 per una concentrazione di 0,98 $\mu\text{g/mL}$ (i.e., 26.456), in questo esperimento si è osservato che l'area risulta essere più vicina a quella teorica.
3. La forma dei picchi del DicloNa nei vari cromatogrammi ($n = 9 \times 3$; non mostrati) presenta una simmetria = 1, ossia caratterizzata da una forma stretta alla base che si sviluppa in altezza non presentando alcuna deformazione del picco.

Tabella 4.21. Dati della retta di IbuNa + DicloNa (FM-2, 1,0 mL/min, 254 nm) relativi a IbuNa-L1

ripetizione	Concentrazione		Tempo (min)			Area	Spalle
	$\mu\text{g/mL}$	iniziale	finale	T.R.	IbuNa-L1		
1	7,69	7,5	8,6	8,00	9.889	Spalle	
2		7,3	8,6	7,90	9.838		
3		7,2	8,9	7,94	9.855		
media		$7,3 \pm 0,15$	$8,7 \pm 0,17$	$7,95 \pm 0,05$	$9.861 \pm 25,97$		
1	3,84	7,5	8,6	8,00	5.145		
2		7,3	8,6	7,99	4.962		
3		7,3	8,9	7,95	5.125		
media		$7,4 \pm 0,12$	$8,7 \pm 0,17$	$7,98 \pm 0,026$	$5.077 \pm 100,4$		
1	1,92	7,4	8,5	8,02	2.525		
2		7,3	8,4	7,99	2.723		
3		7,4	8,6	7,93	2.445		
media		$7,4 \pm 0,06$	$8,5 \pm 0,1$	$7,98 \pm 0,046$	$2.564,3 \pm 143,1$		
1	0,96	7,8	8,4	8,03	1.315	Sx	
2		7,4	8,4	7,99	1.484		
3		7,7	8,5	7,93	1.316		
media		$7,6 \pm 0,21$	$8,4 \pm 0,6$	$7,98 \pm 0,050$	$1.371,7 \pm 97,3$		
1	0,48	7,8	8,4	8,06	775		
2		n.r.	n.r.	n.r.	n.r.		
3		7,7	8,3	7,94	778		
media		$7,8 \pm 0,07$	$8,4 \pm 0,07$	$8,0 \pm 0,085$	$776,5 \pm 2,1$		
1	0,24	7,7	8,3	8,07	346	Sx	
2		7,8	8,3	8,00	300		
3		7,8	8,4	7,90	323		
media		$7,8 \pm 0,06$	$8,3 \pm 0,06$	$7,99 \pm 0,085$	$323,0 \pm 23,0$		
1	0,12	7,8	8,3	8,07	159	Sx	
2		7,9	8,2	8,02	175		
3		7,8	8,2	7,97	179		
media		$7,8 \pm 0,06$	$8,2 \pm 0,06$	$8,02 \pm 0,050$	$171,0 \pm 10,6$		
1	0,06	7,7	8,1	7,99	66		
2		n.r.	n.r.	n.r.	n.r.		
3		n.r.	n.r.	n.r.	n.r.		
media		$7,7 \pm 0,0$	$8,1 \pm 0,0$	$7,99 \pm 0,0$	$66,0 \pm 0,0$		
1	0,03	7,8	8,0	7,99	30		
2		n.r.	n.r.	n.r.	n.r.		
3		n.r.	n.r.	n.r.	n.r.		
media		$7,8 \pm 0,0$	$8,0 \pm 0,0$	$7,99 \pm 0,0$	$30,0 \pm 0,0$		

Tabella 4.22. Dati della retta di IbuNa + DicloNa (FM-2, 1,0 mL/min, 254 nm) relativi a DicloNa

ripetizione	Conc. IbuNa		Tempo (min)		DicloNa		Spalle
	$\mu\text{g/mL}$	iniziale	finale	T.R.	Area		
1	7,69	10,4	12,4	11,10	17.800		
2		10,5	12,4	11,05	17.681		
3		10,4	12,3	11,01	16.534		
media		$10,4 \pm 0,06$	$12,4 \pm 0,06$	$11,05 \pm 0,045$	$17.338,3 \pm 699,1$		
1	3,84	10,6	12,2	11,00	18.033		
2		9,7	12,7	11,07	17.163		
3		10,4	12,4	11,01	15.619		
media		$10,2 \pm 0,5$	$12,4 \pm 0,3$	$11,03 \pm 0,038$	$16.938,3 \pm 1.222,6$		
1	1,92	10,6	12,0	11,10	18.994		
2		10,3	12,4	11,05	18.188		
3		10,5	12,8	11,00	16.284		
media		$10,5 \pm 0,2$	$12,4 \pm 0,4$	$11,05 \pm 0,05$	$17.822,0 \pm 1.391,6$		
1	0,96	10,6	12,0	11,16	20.759		
2		10,6	12,0	11,08	16.047		
3		10,5	12,8	11,00	16.162		
media		$10,6 \pm 0,06$	$12,3 \pm 0,5$	$11,08 \pm 0,080$	$17.656,0 \pm 2.687,9$		
1	0,48	10,6	12,1	11,15	18.021		
2		<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>		
3		10,5	12,2	11,00	15.643		
media		$10,5 \pm 0,06$	$12,1 \pm 0,15$	$11,08 \pm 0,106$	$16.832,0 \pm 1.681,5$		
1	0,24	10,6	11,9	11,16	16.864		
2		10,6	11,9	11,10	16.871		
3		10,5	12,1	10,98	18.003		
media		$10,6 \pm 0,06$	$12,0 \pm 0,1$	$11,08 \pm 0,092$	$17.246,0 \pm 655,6$		
1	0,12	10,4	12,4	11,12	18.628		
2		10,6	11,9	11,09	17.529	Sx	
3		10,2	12,3	11,02	16.201		
media		$10,4 \pm 0,2$	$12,2 \pm 0,3$	$11,08 \pm 0,051$	$17.452,7 \pm 1.215,3$		
1	0,06	10,6	12,2	11,14	17.114		
2		10,4	12,4	11,12	16.977		
3		<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>		
media		$10,5 \pm 0,1$	$12,3 \pm 0,1$	$11,13 \pm 0,014$	$17.045,5 \pm 96,9$		
1	0,03	10,6	12,1	11,16	18.051		
2		10,4	12,1	11,12	17.099		
3		<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>		
media		$10,5 \pm 0,1$	$12,1 \pm 0,0$	$11,14 \pm 0,028$	$17.575,0 \pm 673,2$		

Come anticipato precedentemente, questi dati (Tab. 3.16 - 3.17) sono stati utilizzati per calcolare, per ogni campione, il rapporto delle aree dell'IbuNa e del DicloNa (Tab. 3.18). Questi dati mostrano che i rapporti risultano avere una variabilità bassa (0,001 - 0,015).

Tabella 4.23. Rapporti delle aree IbuNa/DicloNa della retta analizzata a 254 nm

Concentrazione $\mu\text{g/mL}$	IbuNa-L1 / DicloNa				
	1	2	3	media	Dev.st
7,69	0,556	0,556	0,566	0,559	0,006
3,84	0,285	0,289	0,298	0,291	0,007
1,92	0,133	0,150	0,149	0,144	0,009
0,96	0,063	0,092	0,079	0,078	0,015
0,48	0,043	/	0,043	0,043	0,000
0,24	0,021	0,018	0,021	0,020	0,002
0,12	0,009	0,010	0,009	0,009	0,001
0,06	0,004	/	0,005	0,005	0,001
0,03	0,002	/	0,003	0,002	0,001

Gli stessi dati della Tabella 4.23 sono stati utilizzati per costruire un grafico che permettesse la modellizzazione degli stessi (Fig. 4.36; Origin 6.0). Pertanto, i rapporti delle aree sono stati messi in correlazione con le rispettive concentrazioni e questi nuovi dati sottoposti a regressione, che ha trovato una relazione con un'equazione lineare (equazione riportata nella Fig. 4.36).

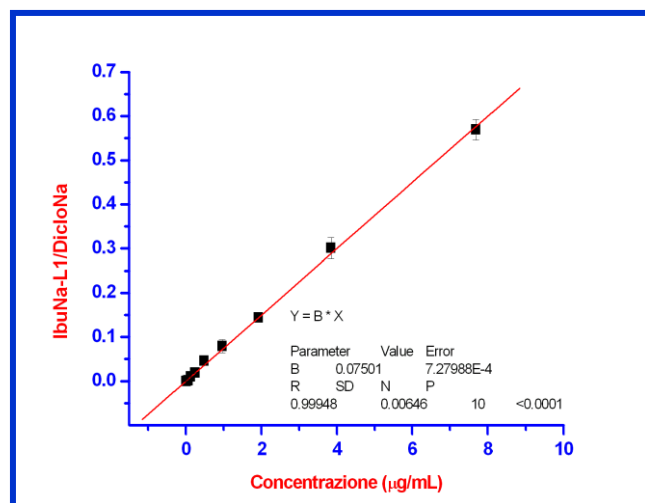


Figura 4.36. Rette di calibrazione di IbuNa in FM-2. Per protocollo di esecuzione vedasi Paragrafo 4.6.7.4. Dati puntuali in Tab. 4.23.

Infine, la retta è stata validata analizzando dei campioni a concentrazione nota, ma trattandoli come se fossero a "concentrazione incognita", per essere sicuri della corretta quantificazione.

4.9.5 Influenza dell'umidità sulla retta di calibrazione

Avendo osservato che i due lotti di IbuNa producevano risultati diversi quando esposti ai medesimi esperimenti (quantificazione UV-Vis), si volle verificare anche per HPLC quanto potesse influire l'umidità presente nella polvere. Le curve di calibrazione sono state acquisite a 254 e 265 nm, utilizzando la FM-17, la quale è stata in un caso premiscelata dall'operatore (Esperimento 1) e nell'altro dallo strumento stesso (Esperimento 2). Le madri sono state preparate in matraccio.

Gli esperimenti sono stati realizzati a distanza di 57 giorni l'uno dall'altro: l'esperimento 1 nel mese di agosto, nel quale è stato utilizzato come "controllo" l'IbuNa-L2 contenuto nel suo barattolo originale conservato in un armadio del laboratorio accuratamente parafilato; mentre l'esperimento 2 è stato realizzato a fine settembre, utilizzando il farmaco IbuNa-L2 conservato da agosto all'interno di una campana di vetro in condizioni di sottovuoto, assieme a del pentossido di fosforo.

Le uniche differenze esistenti tra gli esperimenti riguardano l'ottimizzazione del TF25: nella retta di "controllo" di agosto la sua filtrazione è stata eseguita con un imbuto filtrante sterile con filtro in acetato di cellulosa, mentre le rette caratterizzate da una permanenza in stufa di 24 e 48 ore sono state analizzate con una filtrazione del TF25 eseguita con dei filtri in nylon. Per quanto riguarda, invece, l'esperimento di settembre è possibile evidenziare che è stato utilizzato lo stesso TF25 di agosto filtrato con i filtri di nylon, tranne che per la retta delle 48 ore, per la quale è stato ripreparato ex novo.

I risultati ($n = 3$) degli esperimenti introdotti sopra sono graficamente riportati in Figura 4.38, mentre i dati puntuali si trovano nelle Tabelle 4.24 - 4.50.

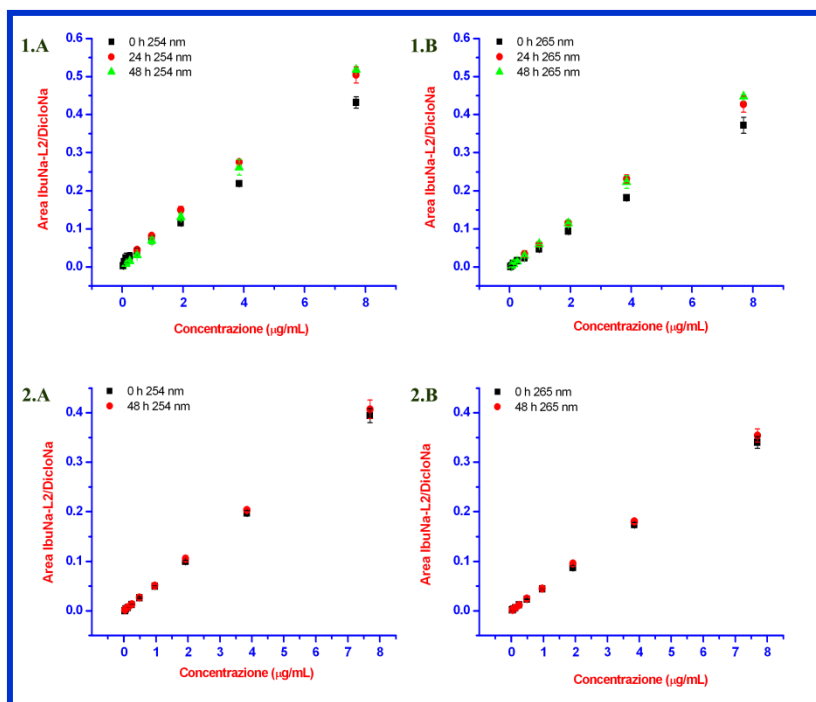


Figura 4.37. Curve di calibrazione di IbuNa-L2 dopo esposizione termica: prove stufa. In questa figura sono rappresentate le curve di calibrazione ottenute elaborando i cromatogrammi in HPLC delle diluizioni in FM-17 di IbuNa e DicloNa dell'esperimento 1 e 2 alle lunghezze d'onda di 254 nm (Fig. 4.37.1.A e 2.A) e di 265 nm (Fig. 4.37.1.B e 2.B).

In questo esperimento si sono messe a confronto cinque curve di calibrazione ottenute a distanza di 57 giorni l'una dall'altra (Esperimento 1 e 2) a due lunghezze d'onda differenti (254 e 265 nm). Per facilitare l'analisi dei dati si riportano singolarmente le valutazioni di ogni singolo esperimento.

Esperimento 1: Curva di calibrazione n. 1 (stufa: 0 ore; 254 nm)

I dati mostrati in Tabella 4.24 indicano che:

1. i tempi di ritenzione dell'IbuNa-L2 sono compresi tra 7,4 e 7,8 minuti. Inoltre, rispetto ai dati mostrati in Tabella 4.17 si può osservare che risultano essere ritardati ca. di 4 - 8 secondi (i.e., 7,04 min.); nonostante tale differenza temporale i tempi risultano essere molto costanti; nei confronti dei tempi individuati nella Tabella 4.20 risultano, invece, essere anticipati (7,88 - 8,04). In aggiunta, anche rispetto alla retta descritta in Tabella 4.21 (i.e., 8,00 min.) i tempi risultano essere anticipati di 4 - 8 secondi;
2. Le aree dei 9 campioni di IbuNa-L2 mantengono un rapporto che varia nell'intervallo 1,7 - 1,9 sino alla concentrazione 0,48 µg/mL, oltre la quale tende a scendere. Nelle tre repliche successive, si è osservato che nelle basse concentrazioni, in alcuni casi, non è stato possibile integrare i picchi perché di difficile individuazione. Questi valori sono indicati in Tabella 4.24 con la sigla *n.r.*. Rispetto all'area del campione a concentrazione 1.000 µg/mL (Tab. 4.17) ed a quello 500 µg/mL (Tab. 4.20) i campioni a concentrazione 7,69 µg/mL risultano avere un'area più bassa rispetto a quella

teorica di 8.500 unità arbitrarie che dovrebbero avere, calcolata per proporzionalità dalla Tabella 4.20, la quale però, si riferisce ad analisi di IbuNa-L1. Inoltre, se si paragona l'area quantificata (i.e., 7,69 $\mu\text{g/mL}$) con quella misurata in Tabella 4.21, è possibile notare un'area inferiore ma una differente deviazione standard (7.896 \pm 168 vs. 9.861 \pm 26). Tale differenza è ipoteticamente riconducibile al differente lotto della polvere (L2 vs L1);

3. La forma dei picchi del IbuNa-L2 nei vari cromatogrammi ($n = 9 \times 3$; non mostrati) si presenta stretta alla base ma tende ad allungarsi simmetricamente verso l'alto (simmetria = 1) ad entrambe le lunghezze d'onda;
4. Gli intervalli di concentrazione in cui è stato possibile quantificare senza problemi l'IbuNa-L2 sono 7,69 - 0,12 $\mu\text{g/mL}$. Concentrazioni più piccole non sarebbero quantificabili con precisione. Pertanto, nelle condizioni di questa analisi, si può affermare che il limite di rivelamento è di ca. 0,12 $\mu\text{g/mL}$.

Continuando con l'analisi dei dati in Tabella 4.25, si può riassumere che:

1. i tempi di ritenzione del DicloNa risultano essere tutti identici a 10,9 minuti. Rispetto ai dati mostrati in Tabella 4.17 e 4.20 si può osservare che queste ultime analisi risultano avere dei tempi anticipati (i.e., 9,90 min.);
2. Le aree dei 9 campioni del DicloNa nelle diverse repliche oscillano in un intervallo compreso tra 16.788 e 19.020 unità arbitrarie. Rispetto all'area tabulata in Tabella 4.20 relativa alla concentrazione 0,98 $\mu\text{g/mL}$ (i.e., 26.456), i campioni risultano avere un'area molto più bassa. Ma se a causa dei problemi che si sono verificati durante quelle analisi, si calcola un'area teorica ottenuta per proporzionalità seriale (19.500 u.a.), partendo dal risultato dell'analisi del campione a concentrazione 1.000 $\mu\text{g/mL}$ (Tab. 4.19) ed a quello a 500 $\mu\text{g/mL}$ (Tab. 4.20), i campioni analizzati risultano avere un'area molto più vicina a quella stimata (16.788 -19.020). Inoltre, le aree risultano essere molto simili a quelle quantificate in Tabella 3.16 (15.619 - 20.759), nonostante la soluzione madre di partenza sia stata preparata al momento dell'utilizzo. La forma dei picchi del DicloNa nei vari cromatogrammi ($n = 9 \times 3$; non mostrati) presenta una simmetria = 1.

Esperimento 1: Curva di calibrazione n. 1B (stufa: 0 ore; 265 nm)

I dati mostrati in Tabella 4.26 indicano che:

1. i tempi di ritenzione dell'IbuNa-L2 sono tutti a 7,8 minuti per il range di concentrazione 7,69 - 0,12 $\mu\text{g/mL}$; si nota un anticipo di 1 - 2 secondi nelle basse concentrazioni (0,06 - 0,03 $\mu\text{g/mL}$). Inoltre, rispetto ai dati mostrati in Tabella 4.17 si può osservare che risultano essere ritardati ca. di 5 - 8 secondi (i.e., 7,04 min.); ciononostante mostrano una maggior precisione, e nei confronti dei tempi individuati nella Tabella 4.21 risultano essere molto vicini (7,90 - 8,07 min.);

2. Le aree dei 9 campioni di IbuNa-L2 mantengono un rapporto molto vicino al valore 2 sino alla concentrazione $0,12 \mu\text{g/mL}$, oltre la quale arriva sino a 2,65. Nelle tre repliche successive, si è osservato che nelle basse concentrazioni, in alcuni casi, non è stato possibile integrare i picchi perché di difficile individuazione. Questi valori sono indicati in Tabella 4.26 con la sigla *n.r.*. Questo fatto lascia perplessi in quanto ci si aspettava una maggior risoluzione data dalla maggior assorbanza alla lunghezza d'onda in esame. In questo caso non è possibile effettuare un confronto dell'area ottenuta a $7,69 \mu\text{g/mL}$ (ca. 11.400 u.a.) con una concentrazione teorica, in quanto le rette della Tabella 4.20 e 4.21 non sono state analizzate a 265 nm;
3. La forma dei picchi del IbuNa-L2 nei vari cromatogrammi ($n = 9 \times 3$; non mostrati) presenta una simmetria = 1;
4. Gli intervalli di concentrazione in cui è stato possibile quantificare senza problemi l'IbuNa-L2 sono $7,69 - 0,12 \mu\text{g/mL}$. Concentrazioni più piccole non sarebbero quantificabili con precisione. Pertanto, nelle condizioni di questa analisi, si può affermare che il limite di rivelamento è di ca. $0,12 \mu\text{g/mL}$.

Continuando con l'analisi dei dati in Tabella 4.27, si può riassumere che:

1. i tempi di ritenzione del DicloNa risultano essere tutti identici a 10,9 minuti. Rispetto ai dati mostrati in Tabella 4.17 e 4.20 si può osservare che queste ultime analisi risultano avere dei tempi anticipati (i.e., 9,90 min.);
2. Le aree dei 9 campioni del DicloNa nelle diverse repliche oscillano in un intervallo compreso tra 28.073 e 31.611 unità arbitrarie. Anche in questo caso non è possibile effettuare un confronto con una concentrazione teorica, in quanto le rette della Tabella 4.22 e 4.23 non sono state analizzate a 265 nm. La forma dei picchi del DicloNa nei vari cromatogrammi ($n = 9 \times 3$; non mostrati) presenta una simmetria = 1.

Esperimento 1: Curva di calibrazione n. 2 (stufa: 24 ore; 254 nm)

I dati mostrati in Tabella 4.29 indicano che:

1. i tempi di ritenzione dell'IbuNa-L2 risultano essere tutti a 7,2 minuti. Inoltre, rispetto ai dati mostrati in Tabella 4.17 si può osservare che risultano essere ritardati ca. di 2 secondi (i.e., 7,04 min.); mentre mostrano un anticipo temporale ed una maggior precisione nei confronti dei tempi individuati nella Tabella 4.20 (7,88 - 8,04 min.) e della Tabella 4.21 (7,90 - 8,06 min.);
2. Le aree dei 9 campioni di IbuNa-L2 mantengono un rapporto che varia nell'intervallo 1,7 - 2,0 sino alla concentrazione $0,24 \mu\text{g/mL}$. Nelle tre repliche successive, si è osservato che nelle basse concentrazioni, in alcuni casi, non è stato possibile integrare i picchi perché di difficile individuazione. Questi valori sono indicati in Tabella 4.24 con la sigla *n.r.*. Rispetto all'area del campione a concentrazione $1.000 \mu\text{g/mL}$ (Tab. 4.17)

ed a quello a concentrazione 500 $\mu\text{g/mL}$ (Tab. 4.20) i campioni a concentrazione 7,69 $\mu\text{g/mL}$ risultano essere più alti (i.e., 9.616 u.a.) rispetto all'area teorica di 8.500 unità arbitrarie (calcolata per proporzionalità dalla Tab. 4.20) che dovrebbero avere;

3. La forma dei picchi del IbuNa-L2 nei vari cromatogrammi ($n = 9 \times 3$; non mostrati) presenta una simmetria = 1;
4. Gli intervalli di concentrazione in cui è stato possibile quantificare senza problemi l'IbuNa-L2 sono 7,69 - 0,12 $\mu\text{g/mL}$. Concentrazioni più piccole non sarebbero quantificabili con precisione. Pertanto, nelle condizioni di questa analisi, si può affermare che il limite di rivelamento è di ca. 0,12 $\mu\text{g/mL}$.

Continuando con l'analisi dei dati in Tabella 4.30, si può riassumere che:

1. i tempi di ritenzione del DicloNa risultano essere tutti identici a 10,2 minuti. Rispetto ai dati mostrati in Tabella 4.17 e 4.20 si può osservare che queste ultime analisi risultano avere dei tempi anticipati (i.e., 9,90 min.); stessa situazione è riscontrabile rispetto alla Tabella 4.21, rispetto alla quale i tempi risultano essere anticipati (10,98 - 11,16 min.);
2. Le aree dei 9 campioni del DicloNa nelle diverse repliche oscillano in un intervallo compreso tra 17.253 e 19.687 unità arbitrarie. Rispetto all'area teorica (19.500 u.a.), che è stata calcolata per proporzionalità delle diluizioni seriali partendo dal risultato dell'analisi del campione a concentrazione 1.000 $\mu\text{g/mL}$ (Tab. 4.17) e da quello a 500 $\mu\text{g/mL}$ (Tab. 4.20), i campioni analizzati risultano avere un'area molto vicina a quella stimata (17.253 - 19.687 u.a.). È possibile notare un comportamento identico anche se lo si paragona con i risultati in Tabella 4.24 (15.619 - 20.759 u.a.). La forma dei picchi del DicloNa nei vari cromatogrammi ($n = 9 \times 3$; non mostrati) presenta una simmetria = 1.

Esperimento 1: Curva di calibrazione n. 2B (stufa: 24 ore; 265 nm)

I dati mostrati in Tabella 4.31 indicano che:

1. i tempi di ritenzione dell'IbuNa-L2 sono tutti 7,2 minuti. Inoltre, rispetto ai dati mostrati in Tabella 4.17 si può osservare che risultano essere ritardati ca. di 5 - 8 secondi (i.e., 7,04 min.); mentre sono maggiormente costanti ed anticipati nei confronti dei tempi individuati nella Tabella 4.20 (7,88 - 8,04 min.);
2. Le aree dei 9 campioni di IbuNa-L2 mantengono un rapporto uguale al valore 2 sino alla concentrazione 0,96 $\mu\text{g/mL}$ per poi mostrarsi meno stabili nel range di concentrazione 0,48 - 0,03 $\mu\text{g/mL}$. Nelle tre repliche successive, si è osservato che nelle basse concentrazioni, in alcuni casi, non è stato possibile integrare i picchi perché di difficile individuazione. Questi valori sono indicati in Tabella 3.21 con la sigla *n.r.*. In questo caso non è possibile effettuare un confronto dell'area ottenuta a 7,69 $\mu\text{g/mL}$ (ca. 13.700 u.a.) con una concentrazione teorica, in quanto le rette della Tabella 4.20 non sono state analizzate a 265 nm. Ciò nonostante, è possibile fare un

confronto con l'area di controllo (Tab. 4.26) quantificata alla stessa concentrazione (i.e., 11.442 u.a.): in seguito alle 24 ore di stufa l'area è aumentata a 13.698 unità arbitrarie;

3. La forma dei picchi del IbuNa-L2 nei vari cromatogrammi ($n = 9 \times 3$; non mostrati) presenta una simmetria = 1;
4. Gli intervalli di concentrazione in cui è stato possibile quantificare senza problemi l'IbuNa-L2 sono 7,69 - 0,12 $\mu\text{g/mL}$. Concentrazioni più piccole non sarebbero quantificabili con precisione. Pertanto, nelle condizioni di questa analisi, si può affermare che il limite di rivelamento è di ca. 0,12 $\mu\text{g/mL}$;

Continuando con l'analisi dei dati in Tabella 4.32, si può riassumere che:

1. i tempi di ritenzione del DicloNa risultano essere tutti identici a 10,9 minuti. Rispetto ai dati mostrati in Tabella 4.17 e 4.20 si può osservare che queste ultime analisi risultano avere dei tempi anticipati (i.e., 9,90 min.), mentre risultano essere identici ai tempi tabulati in Tabella 4.27;
2. Le aree dei 9 campioni del DicloNa nelle diverse repliche oscillano in un intervallo compreso tra 29.126 e 33.403 unità arbitrarie. In questo caso, è possibile effettuare un confronto esclusivamente con la retta di controllo analizzata alla stessa lunghezza d'onda, con la quale le aree risultano essere molto simili (28.073 - 31.611 u.a.). La forma dei picchi del DicloNa nei vari cromatogrammi ($n = 9 \times 3$; non mostrati) presenta una simmetria = 1.

Esperimento 1: Curva di calibrazione n. 3 (stufa: 48 ore; 254 nm)

I dati mostrati in Tabella 4.34 indicano che:

1. i tempi di ritenzione dell'IbuNa-L2 risultano essere a 7,3 minuti per le concentrazioni 0,03 - 0,6 $\mu\text{g/mL}$. Rispetto ai dati mostrati in Tabella 4.17 si può osservare che risultano essere ritardati ca. di 3 secondi (7,04 min.); mentre risultano essere maggiormente costanti ed anticipati nei confronti dei tempi individuati nella Tabella 4.20 (7,88 - 8,04 min.). Effettuando, invece, un confronto con la retta eseguita utilizzando l'IbuNa-L1 (Tab. 4.21) risultano essere comunque anticipati (7,90 - 8,07 min.). Inoltre, è possibile notare un diverso comportamento per le concentrazioni 7,69 - 0,12 $\mu\text{g/mL}$, le quali mostrano un tempo di ritenzione pari a 4,1 minuti. L'anticipazione è avvenuta in coincidenza del rabboccamento della fase mobile premiscelata dall'operatore;
2. Le aree dei 9 campioni di IbuNa-L2 mantengono un rapporto molto vicino al valore 2 sino nel range di concentrazione compreso tra 7,69 - 0,48 $\mu\text{g/mL}$, oltre il quale tende a diminuire (0,24 - 0,03 $\mu\text{g/mL}$). Nelle tre repliche successive, si è osservato che nelle basse concentrazioni, in alcuni casi, non è stato possibile integrare i picchi perché di difficile individuazione. Questi valori sono indicati in Tabella 4.34 con la sigla *n.r.*. Rispetto all'area teorica calcolata per proporzionalità (i.e., 8.500 u.a.) delle diluizioni

seriali prendendo come punto di riferimento il campione a concentrazione 1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tab. 4.17) e quello a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tab. 4.20) i campioni a concentrazione 7,69 $\mu\text{g}/\text{mL}$ risultano essere più alti (i.e., 9.304 u.a.);

3. La forma dei picchi del IbuNa-L2 nei vari cromatogrammi ($n = 9 \times 3$; non mostrati) presenta una simmetria = 1;
4. Gli intervalli di concentrazione in cui è stato possibile quantificare senza problemi l'IbuNa-L2 sono 7,69 - 0,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Concentrazioni più piccole non sarebbero quantificabili con precisione. Ancor di più in questo caso specifico nel quale si sono avuti problemi con la fase mobile. Pertanto, nelle condizioni di questa analisi, si può affermare che il limite di rivelamento è di ca. 0,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Continuando con l'analisi dei dati in Tabella 4.35, si può riassumere che:

1. i tempi di ritenzione del DicloNa risultano essere tutti identici a 10,2 minuti per le ultime due concentrazioni (0,6 - 0,03 $\mu\text{g}/\text{mL}$). È stato, invece, osservato un anticipo dell'uscita del picco a 4,9 minuti per tutte le altre concentrazioni (7,69 - 0,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$), dovuto al rabboccamento della fase mobile premiscelata dall'operatore. Rispetto ai dati mostrati in Tabella 4.17 e 4.20 si può osservare che queste ultime analisi risultano avere dei tempi anticipati (i.e., 9,90 min.) nel caso delle basse concentrazioni, ma ritardati per le concentrazioni 7,69 - 0,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$;
2. Le aree dei 9 campioni del DicloNa nelle diverse repliche oscillano in un intervallo compreso tra 17.436 e 19.139 unità arbitrarie. Rispetto all'area teorica (ca. 19.500 u.a.) calcolata sulla base delle analisi del campione a concentrazione 1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tab. 4.17) ed a quello a concentrazione 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tab.4.20), i campioni a concentrazione 0,98 $\mu\text{g}/\text{mL}$ risultano essere più bassi. Il confronto con la Tabella 4.30 mostra una similarità nella quantificazione la quale non mostra particolari differenze (i.e., 17.253 e 19.687 u.a.). La forma dei picchi del DicloNa nei vari cromatogrammi ($n = 9 \times 3$; non mostrati) presenta una simmetria = 1.

Esperimento 1: Curva di calibrazione n. 3B (stufa: 48 ore; 265 nm)

I dati mostrati in Tabella 4.36 indicano che:

1. i tempi di ritenzione dell'IbuNa-L2 sono 7,2 minuti per le concentrazioni 0,6 - 0,03 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Pertanto, rispetto ai dati mostrati in Tabella 4.17 si può osservare che risultano essere ritardati ca. di 2 secondi (i.e., 7,04 min.), mentre rispetto alla Tabella 4.21 risultano essere anticipati (10,98 - 11,10 min.), ma è da tener presente il differente lotto del farmaco e la differente FM. Inoltre, è stato registrato un tempo di 4,1 minuti per le concentrazioni 7,69 - 0,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$, che risultano essere parecchio anticipati nei confronti dei tempi individuati nella Tabella 4.20 (7,88 - 8,04 min.). L'anticipazione è stata attribuita al rabbocco di fase mobile da parte dell'operatore;

2. Le aree dei 9 campioni di IbuNa-L2 mantengono un rapporto che si avvicina al valore 2 dalla concentrazione 7,69 - 0,48 $\mu\text{g/mL}$, mentre tendono a diminuire nelle concentrazioni basse (0,24 - 0,03 $\mu\text{g/mL}$). Nelle tre repliche successive, si è osservato che nelle basse concentrazioni, in alcuni casi, non è stato possibile integrare i picchi perché di difficile individuazione. Questi valori sono indicati in Tabella 4.36 con la sigla *n.r.*. I campioni a concentrazione 7,69 $\mu\text{g/mL}$ risultano avere un'area di ca. 13.700 unità arbitrarie. In questo caso non è possibile effettuare un confronto con una concentrazione teorica, in quanto le rette della Tab. 4.20 non sono state analizzate a 265 nm, ma è possibile fare un paragone con le Tabelle 4.26 e 4.31, con le quali emerge un'area comune di ca. 13.700 in tutti e tre i casi;
3. La forma dei picchi del IbuNa-L2 nei vari cromatogrammi ($n = 9 \times 3$; non mostrati) presenta una simmetria = 1;
4. Gli intervalli di concentrazione in cui è stato possibile quantificare senza problemi l'IbuNa-L2 sono 7,69 - 0,12 $\mu\text{g/mL}$. Concentrazioni più piccole non sarebbero quantificabili con precisione. Pertanto, nelle condizioni di questa analisi, si può affermare che il limite di rivelamento è di ca. 0,12 $\mu\text{g/mL}$.

Continuando con l'analisi dei dati in Tabella 4.37, si può riassumere che:

1. i tempi di ritenzione del DicloNa risultano essere a 10,2 minuti (0,12 - 0,03 $\mu\text{g/mL}$). È evidente un'anticipazione (i.e., 4,9 min.) per le concentrazioni 7,69 - 0,24 $\mu\text{g/mL}$, data dalla differente fase mobile immessa dall'operatore. Rispetto ai dati mostrati in Tabella 4.17 e 4.20 si può osservare che queste ultime analisi risultano avere dei tempi anticipati (i.e., 9,90 min.); tale osservazione è possibile farla anche nei confronti della Tabella 4.26 e 4.31, rispetto ai quali i tempi sono anticipati di 7 secondi (i.e., 10,9 min.);
2. Le aree dei 9 campioni del DicloNa nelle diverse repliche oscillano in un intervallo compreso tra 29.467 e 32.580 unità arbitrarie. Confrontandole con quelle quantificate in Tabella 4.26 e 4.31 emerge un'elevata similarità, evidenziando una ripetibilità dell'area del DicloNa che ha mostrato avere una stessa area nei 3 esperimenti a 265 nm (28.073 - 31.611 vs. 29.126 - 33.403 vs. 29.467 - 32.580 u.a.). La forma dei picchi del DicloNa nei vari cromatogrammi ($n = 9 \times 3$; non mostrati) presenta una simmetria = 1.

Da un'analisi globale dell'esperimento effettuato utilizzando IbuNa-L2 a tre diversi tempi di permanenza in stufa (0 - 24 - 48 ore) ed analizzandolo con la FM-17 premiscelata dall'operatore, è stato potuto osservare, innanzitutto, una precisione ed un rispetto dei tempi di ritenzione delle due sostanze (ca. 7,8 min. per l'IbuNa e ca. 10,9 min. per il DicloNa), in modo particolare per le concentrazioni 7,69 - 0,12 $\mu\text{g/mL}$, sia a 254 che 265 nm, ed a tutti i tempi dell'esperimento. Non è possibile giungere alle medesime conclusioni per le concentrazioni 0,06 - 0,03 $\mu\text{g/mL}$, per le quali sono stati ottenuti dei tempi non

sempre puntuali. Le osservazioni fatte finora rafforzano la determinazione del limite di rilevamento a $0,12 \mu\text{g/mL}$.

È da sottolineare che durante l'analisi della retta delle 48 ore, sia a 254 che 265 nm, i tempi sono cambiati a causa dell'errore dell'operatore nella preparazione della FM-17, ma nonostante ciò, si sono mantenuti uguali tra loro.

Se si confrontano i tempi di ritenzione con la retta realizzata in Tabella 4.21 e 4.22 è possibile notare un anticipo di ca. due secondi (ca. 8,00 min. per l'IbuNa-L1 e ca. 11,00 min. per il DicloNa). Tale differenza è attribuibile all'utilizzo di una differente fase mobile caratterizzata dal contenere un TF maggiormente concentrato (TF50 vs TF25).

Se ci si sofferma, invece, sulle aree dell'IbuNa-L2 (e.g., $7,69 \mu\text{g/mL}$) a 254 nm è possibile notare un decisivo incremento nelle 24 ore che tende a diminuire leggermente nelle 48 ore (i.e., 7.896 vs. 9.616 vs. 9.304 u.a.). La retta di calibrazione di riferimento (Tab.4.21) invece, aveva fornito un'area di ca. 9.900 unità arbitrarie, ma tale differenza potrebbe essere derivata dal differente lotto della polvere e dalla diversa fase mobile utilizzata (FM-2 vs. FM-17).

Analizzando, invece, le aree alla lunghezza d'onda di 265 nm, emerge un continuo aumento della quantificazione (i.e., 11.442 vs. 13.698 vs. 13.723 u.a.), caratterizzato però da una variabilità superiore rispetto all'analisi effettuata a 254 nm in tutti e tre i tempi di analisi.

Il DicloNa in tutti e tre gli esperimenti è risultato con un'area costante compresa in un range di 18.000 - 20.000 unità arbitrarie.

Nonostante il differente comportamento dell'IbuNa-L2 a 254 nm nei tre tempi, durante l'analisi dei rapporti tra IbuNa-L2 / DicloNa, emerge un aumento degli stessi che risulta essere proporzionale alla durata del trattamento termico (0,431 vs. 0,504 vs. 0,518). Tale risultato potrebbe dipendere dall'area quantificata per il DicloNa, il quale, nel caso specifico (e.g., $7,69 \mu\text{g/mL}$) risulta essere più alto alle 24 ore (i.e., 18.316 vs. 19.084 vs. 17.972 u.a.). Questo comporta un allineamento dell'andamento dei risultati.

Se si analizzano le aree dell'IbuNa-L2 e del DicloNa quantificate a 254 nm nell'esperimento di controllo (Tab. 4.24 - 4.27) e le si confrontano con quelle analizzate negli altri due tempi (Tab. 4.29 - 4.37), è possibile notare una maggior variabilità quantificata attraverso il calcolo delle deviazioni standard, che è possibile attribuire al differente metodo di filtrazione utilizzato per la FM-17. Più precisamente, è stato utilizzato un imbuto filtrante sterile con filtro in acetato di cellulosa per l'esperimento di controllo, mentre per le analisi relative alle 24 e 48 ore di distanza, è stata eseguita una filtrazione mediante i filtri in nylon. Pertanto, è possibile ipotizzare che, i dispositivi filtranti utilizzati abbiano avuto una diversa efficacia sul trattenimento delle impurità presenti nel TF, le quali potrebbero aver alterato la precisione della corsa cromatografica.

In aggiunta, le aree dell'IbuNa-L2 quantificate alla lunghezza d'onda di 265 nm, appaiono crescenti proporzionalmente al tempo di permanenza in stufa (11.442 vs. 13.698

vs. 13.723 u.a.), e mostrano una deviazione standard più alta nelle 24 ore rispetto agli altri tempi (391,7 vs. 740,0 vs. 333,4). Le aree del DicloNa a questa lunghezza d'onda mostrano un assorbimento maggiore raggiungendo il range di ca. 30.000 - 32.000 unità arbitrarie.

L'analisi dei rapporti IbuNa-L2 / DicloNa ai tre tempi, conferma l'andamento crescente all'aumentare della permanenza in stufa (0,371 vs. 0,427 vs. 0,448).

Inoltre, il limite di rivelamento stimato che ha permesso una corretta integrazione a tutti i tempi è stato 0,12 µg/mL tranne nel caso della Tabella 4.31 (0,24 µg/mL).

In conclusione, è anche possibile interpretare l'incidente commesso dall'operatore durante la composizione della fase mobile premiscelata, la quale ha comportato un anticipo dei tempi di ritenzione dei farmaci, grazie ai risultati ottenuti negli esperimenti precedenti. Infatti, avendo ottenuto un anticipo è possibile ipotizzare che nella fase mobile fosse presente una maggior quantità di solvente organico, il quale comporta un movimento dei picchi verso sinistra.

Esperimento 2: Curva di calibrazione n. 4 (stufa: 0 ore; 254 nm)

I dati mostrati in Tabella 4.39 indicano che:

1. i tempi di ritenzione dell'IbuNa-L2 risultano essere compresi tra 7,6 - 7,9 minuti per le concentrazioni comprese tra 3,84 - 0,12 µg/mL, mentre si oscilla anche sino a 7,4 minuti per le concentrazioni 7,69 e 0,06 µg/mL. Rispetto ai dati mostrati in Tabella 4.17 si può osservare che risultano essere ritardati ca. di 6 - 9 secondi (i.e., 7,04 min.);
2. Le aree dei 9 campioni di IbuNa-L2 mantengono un rapporto molto vicino al valore 2 sino alla concentrazione 0,48 µg/mL, oltre la quale si abbassa anche sino a 1,5. Nelle tre repliche successive, si è osservato che si sono avuti meno problemi nell'integrazione dei picchi relativi alle basse concentrazioni. Rispetto all'area teorica di 8.500 unità arbitrarie (7,69 µg/mL) calcolata proporzionalmente in base al campione a concentrazione 1.000 µg/mL (Tab. 4.17) ed a quello a concentrazione 500 µg/mL (Tab. 4.20), i campioni risultano essere in media molto vicini (i.e., 8,485) ad essa;
3. La forma dei picchi del IbuNa-L2 nei vari cromatogrammi ($n = 9 \times 3$; non mostrati) presenta una simmetria = 1;
4. L'intervallo di concentrazione in cui è stato possibile quantificare senza problemi l'IbuNa-L2 è 7,69 - 0,12 µg/mL. Le concentrazioni più piccole non sarebbero quantificabili con precisione. Pertanto, nelle condizioni di questa analisi, si può affermare che il limite di rivelamento è di ca. 0,12 µg/mL.

Continuando con l'analisi dei dati in Tabella 4.40, si può riassumere che:

1. i tempi di ritenzione del DicloNa risultano essere variabili tra 9,8 e 10,6 minuti. Rispetto ai dati mostrati in Tabella 4.17 e 4.20 si può osservare che queste ultime analisi risultano avere dei tempi anticipati (i.e., 9,90 min.);
2. Le aree dei 9 campioni del DicloNa nelle diverse repliche oscillano in un intervallo compreso tra 20.283 e 21.965 unità arbitrarie. Pertanto, sono molto vicine all'area teorica (19.500 u.a.) stimata per proporzionalità dal campione a concentrazione 1.000 $\mu\text{g/mL}$ (Tab. 3.12) ed a quello a 500 $\mu\text{g/mL}$ (Tab. 4.20). La forma dei picchi del DicloNa nei vari cromatogrammi ($n = 9 \times 3$; non mostrati) presenta una simmetria = 1.

Esperimento 2: Curva di calibrazione n. 4B (stufa: 0 ore; 265 nm)

I dati mostrati in Tabella 4.41 indicano che:

1. i tempi di ritenzione dell'IbuNa-L2 sono compresi nel range 7,6 - 7,9 minuti per le concentrazioni comprese tra 3,84 - 0,12 $\mu\text{g/mL}$, mentre si oscilla anche sino a 7,4 minuti per le concentrazioni 7,69 e 0,06 $\mu\text{g/mL}$. Rispetto ai dati mostrati in Tabella 4.17 si può osservare che risultano essere ritardati ca. di 6 - 9 secondi (i.e., 7,04 min.);
2. Le aree dei 9 campioni di IbuNa-L2 mantengono un rapporto che si avvicina molto al valore 2 sino alla concentrazione 0,48 $\mu\text{g/mL}$. Nelle tre repliche successive, si è osservato che nelle basse concentrazioni, in alcuni casi, non è stato possibile integrare i picchi perché di difficile individuazione. Questi valori sono indicati in Tabella 4.41 con la sigla *n.r.*;

In questo caso è possibile effettuare un confronto dell'area ottenuta a 7,69 $\mu\text{g/mL}$ (ca. 12.500 u.a.) con una concentrazione teorica, ma lo si può fare solamente con la retta di calibrazione realizzata nelle stesse condizioni nel corso dell'esperimento 1 (Tab. 4.26). Dal confronto emerge un aumento dell'area (i.e., 11.442 vs. 12.489) del quale si analizzeranno le possibili cause in seguito all'analisi dettagliata di tutti gli esperimenti;

3. La forma dei picchi del IbuNa-L2 nei vari cromatogrammi ($n = 9 \times 3$; non mostrati) presenta una simmetria = 1;
4. L'intervallo di concentrazione in cui è stato possibile quantificare senza problemi l'IbuNa-L2 è 7,69 - 0,12 $\mu\text{g/mL}$. Concentrazioni più piccole non sarebbero quantificabili con precisione. Pertanto, nelle condizioni di questa analisi, si può affermare che il limite di rivelamento è di ca. 0,12 $\mu\text{g/mL}$.

Continuando con l'analisi dei dati in Tabella 4.42, si può riassumere che:

1. i tempi di ritenzione del DicloNa risultano essere compresi tra 10,0 e 10,6 minuti per il range di concentrazione compreso tra 3,84 e 0,06 $\mu\text{g/mL}$, mentre per le concentrazioni 7,69 e 0,03 $\mu\text{g/mL}$ sono stati registrati dei tempi che oscillano anche sino a 9,8 minuti. Rispetto ai dati mostrati in Tabella 4.17 e 4.20 si può osservare che

queste ultime analisi risultano avere dei tempi anticipati (i.e., 9,90 min.), ma ritardati rispetto alla Tabella 4.27 (10,9 min.);

2. Le aree dei 9 campioni del DicloNa nelle diverse repliche oscillano in un intervallo compreso tra 34.618 e 37.724 unità arbitrarie. Dal confronto con la retta di controllo analizzata alla stessa lunghezza d'onda nell'esperimento 1 (Tab. 4.27), è possibile notare immediatamente un aumento dell'area (28.073 - 31.611 vs. 34.618 - 37.724 u.a.). È ipotizzabile che l'incremento registrato sia dovuto alla concentrazione della sostanza, dato dall'utilizzo della stessa soluzione preparata per l'esperimento 1, conservata in un bancone da laboratorio accuratamente parafilata. La forma dei picchi del DicloNa nei vari cromatogrammi ($n = 9 \times 3$; non mostrati) presenta una simmetria = 1.

Esperimento 2: Curva di calibrazione n. 5 (stufa: 48 ore; 254 nm)

I dati mostrati in Tabella 4.44 indicano che:

1. i tempi di ritenzione dell'IbuNa-L2 risultano essere compresi tra 7,6 - 7,7 minuti per tutte le concentrazioni ad esclusione di quella a 7,69 $\mu\text{g/mL}$ per la quale si ha un'oscillazione tra i 7,4 e 7,5 minuti. Rispetto ai dati mostrati in Tabella 4.17 si può osservare che risultano essere ritardati ca. di 4 - 7 secondi (7,04 min.);
2. Le aree dei 9 campioni di IbuNa-L2 mantengono un rapporto che si avvicina al valore 2 sino alla concentrazione 0,48 $\mu\text{g/mL}$ per poi scendere a 1,8 sino al campione meno concentrato (0,03 $\mu\text{g/mL}$). Nelle tre repliche successive, si è osservato che si sono avuti meno problemi nell'integrazione dei picchi relativi alle basse concentrazioni. Rispetto all'area teorica (ca. 8.500 u.a.), stimata in riferimento alle diluizioni seriali del campione a concentrazione 1.000 $\mu\text{g/mL}$ (Tab. 4.17) ed a quello a concentrazione 500 $\mu\text{g/mL}$ (Tab. 4.20), i campioni a concentrazione 7,69 $\mu\text{g/mL}$ risultano essere in media molto vicini (i.e., 9.078 u.a.) ad essa;
3. La forma dei picchi del IbuNa-L2 nei vari cromatogrammi ($n = 9 \times 3$; non mostrati) presenta una simmetria = 1;
4. L'intervallo di concentrazione in cui è stato possibile quantificare senza problemi l'IbuNa-L2 sono 7,69 - 0,12 $\mu\text{g/mL}$. Le concentrazioni più piccole non sarebbero quantificabili con precisione. Pertanto, nelle condizioni di questa analisi, si può affermare che il limite di rivelamento è di ca. 0,12 $\mu\text{g/mL}$.

Continuando con l'analisi dei dati in Tabella 4.45, si può riassumere che:

1. i tempi di ritenzione del DicloNa risultano essere variabili tra 10,0 e 10,5 minuti per le concentrazioni comprese nel range 7,69 - 0,06 $\mu\text{g/mL}$, mentre si osserva una variabilità che arriva a 9,6 minuti per la concentrazione 0,03 $\mu\text{g/mL}$. Rispetto ai dati mostrati in Tabella 4.17 e 4.20 si può osservare che queste ultime analisi risultano avere dei tempi anticipati (9,90 min.);

2. Le aree dei 9 campioni del DicloNa nelle diverse repliche oscillano in un intervallo compreso tra 17.552 e 22.595 unità arbitrarie. Rispetto all'area teorica (ca. 19.500 u.a.), stimata partendo dal risultato dell'analisi del campione a concentrazione 1.000 $\mu\text{g/mL}$ (Tab. 4.17) ed a 500 $\mu\text{g/mL}$ (Tab. 4.20), i campioni analizzati risultano avere un'area molto vicina ad essa (17.552 - 22.595 u.a.). In aggiunta, confrontando i dati ottenuti con le aree quantificate nell'esperimento 1 (Tab. 4.20), è possibile mettere in evidenza un aumento del DicloNa (17.436 - 19.139 vs. 17.552 - 22.595 u.a.). La forma dei picchi del DicloNa nei vari cromatogrammi ($n = 9 \times 3$; non mostrati) presenta una simmetria = 1.

Esperimento 2: Curva di calibrazione n. 5B (stufa: 48 ore; 265 nm)

I dati mostrati in Tabella 4.46 indicano che:

1. i tempi di ritenzione dell'IbuNa-L2 sono tutti uguali a 7,7 minuti tranne per il campione a concentrazione 7,69 $\mu\text{g/mL}$ per il quale è stato registrato un tempo di 7,4 e 7,5 minuti. Pertanto, rispetto ai dati mostrati in Tabella 4.17 si può osservare che risultano essere ritardati ca. di 4 - 7 secondi (i.e., 7,04 min.);
2. Le aree dei 9 campioni di IbuNa-L2 mantengono un rapporto prossimo al valore 2 sino alla concentrazione 0,48 $\mu\text{g/mL}$, per poi essere altalenante nei campioni restanti (0,24 - 0,03 $\mu\text{g/mL}$). Nelle tre repliche successive, si è osservato che nelle basse concentrazioni, in alcuni casi, non è stato possibile integrare i picchi perché con una facile individuazione. Inoltre, non essendo possibile effettuare un confronto dei risultati ottenuti a 7,69 $\mu\text{g/mL}$ (i.e., 13.419 u.a.) con una concentrazione teorica, dunque, è stato effettuato un paragone con l'IbuNa-L2 analizzato nell'esperimento 1 (ca. 13.700 vs. 13.419 u.a.). Il confronto ha fatto emergere una diminuzione dell'area a distanza di 57 giorni;
3. La forma dei picchi del IbuNa-L2 nei vari cromatogrammi ($n = 9 \times 3$; non mostrati) presenta una simmetria = 1;
4. L'intervallo di concentrazione in cui è stato possibile quantificare senza problemi l'IbuNa-L2 sono 7,69 - 0,12 $\mu\text{g/mL}$. Concentrazioni più piccole non sarebbero quantificabili con precisione. Pertanto, nelle condizioni di questa analisi, si può affermare che il limite di rivelamento è di ca. 0,12 $\mu\text{g/mL}$.

Continuando con l'analisi dei dati in Tabella 4.47, si può riassumere che:

1. i tempi di ritenzione del DicloNa risultano essere compresi tra 10,0 e 10,5 minuti per tutte le concentrazioni ad eccezione della 0,03 $\mu\text{g/mL}$ (i.e., 9,6 e 9,7 min.). Rispetto ai dati mostrati in Tabella 4.17 e 4.20 si può osservare che queste ultime analisi risultano avere dei tempi anticipati (9,90 min.);
2. Le aree dei 9 campioni del DicloNa nelle diverse repliche oscillano in un intervallo compreso tra 30.207 e 37.912 unità arbitrarie. In questo caso, è possibile effettuare

un confronto esclusivamente con la retta analizzata nell'esperimento 1 dopo 48 ore ed a 265 nm (Tab. 4.37), con la quale le aree risultano essere aumentate (29.467 - 32.580 vs. 30.207 - 37.912 u.a.). La forma dei picchi del DicloNa nei vari cromatogrammi ($n = 9 \times 3$; non mostrati) presenta una simmetria = 1.

Analizzando l'esperimento 2 nella sua totalità, a due diversi tempi di permanenza in stufa (0 e 48 ore) attraverso l'utilizzo della fase mobile FM-17 premiscelata dallo strumento stesso, è stato possibile notare poca differenza nei risultati.

In modo particolare, mettendo a confronto i tempi di ritenzione ottenuti nelle rette di controllo (Tab. 4.39 - 4.42), non è stata notata alcuna variazione temporale, sia per l'IbuNa-L2 che per il DicloNa. È stata riscontrata qualche piccola differenza rispetto alle rette trattate termicamente per 48 ore (Tab. 4.44 - 4.47), per le quali esiste, ad entrambe le lunghezze d'onda, una maggior puntualità dei tempi dell'IbuNa-L2 (i.e., 7,7 min.). Mentre non avviene lo stesso per il DicloNa, il quale manifesta dei tempi identici nei due esperimenti ad entrambe le lunghezze d'onda.

A questo proposito è possibile effettuare un confronto con l'esperimento 1: per il farmaco non esposto ad alta temperatura si ha un tempo di ritenzione, ad entrambe le lunghezze d'onda, che appare ritardato di un secondo rispetto all'esperimento 2; inoltre, il tempo del DicloNa è risultato perfettamente puntale in tutte le iniezioni presentandosi a 10,9 minuti. Il confronto tra gli esperimenti 1 e 2, eseguiti in seguito alle 48 ore di stufa, non è possibile eseguirlo a causa dell'errore dell'operatore avvenuto nel primo esperimento.

Se si prosegue nell'analisi dell'esperimento 2 tenendo conto delle aree quantificate per l'IbuNa-L2, è possibile notare un incremento tra i due spazi temporali ad entrambe le lunghezze d'onda (8.485 vs. 9.078 u.a. per 254 nm e 12.489 vs. 13.419 u.a. per 265 nm).

Per un'analisi corretta dei risultati ottenuti ed una corretta interpretazione degli stessi è però necessario considerare inevitabilmente anche le relative deviazioni standard (244 vs. 338 per 254 nm e 518 vs. 639 per 265 nm), le quali risultano essere più alte nelle 48 ore di trattamento termico.

D'altro canto, l'area del DicloNa appare invece, molto più alta di quella quantificata nell'esperimento 1 (18.000 vs. 21.000 u.a.). È possibile attribuire tale avvenimento all'utilizzo della medesima soluzione di DicloNa preparata per l'esperimento 1, conservata nel bancone del laboratorio. Evidentemente nonostante l'accurata chiusura col parafilm non è stata evitata una sua concentrazione data dall'evaporazione del solvente.

Se vengono presi in considerazione i rapporti IbuNa-L2 / DicloNa (e.g., 7,69 $\mu\text{g/mL}$) emerge un risultato che conferma l'efficacia della permanenza in stufa della polvere ad entrambe le lunghezze d'onda (0,394 vs. 0,407 per 254 nm, 0,340 vs. 0,354 per 265 nm).

Considerando, invece, i rapporti tra le concentrazioni, è emerso un rispetto maggiore dell'andamento della serialità delle diluizioni sino alla concentrazione 0,24 $\mu\text{g/mL}$, limite per il quale il rapporto è molto vicino al valore 2.

In conclusione, è possibile affermare che per l'esperimento 2 non è stata notata alcuna evidente differenza tra le analisi di controllo e quelle eseguite alle 48 ore, nonostante per queste ultime, ci fosse come possibile variabile la preparazione ex novo delle soluzioni madri del tampone.

Effettuare un confronto tra i due esperimenti (1 e 2) potrebbe essere utile per verificare l'efficacia della conservazione del farmaco all'interno della campana di vetro in condizioni di sottovuoto. Per fare questo si sono confrontate le aree dell'IbuNa-L2 di controllo dell'esperimento 1 a 254 nm (Tab. 4.24) con le aree del farmaco di controllo alla stessa lunghezza d'onda dell'esperimento 2 (Tab. 4.38).

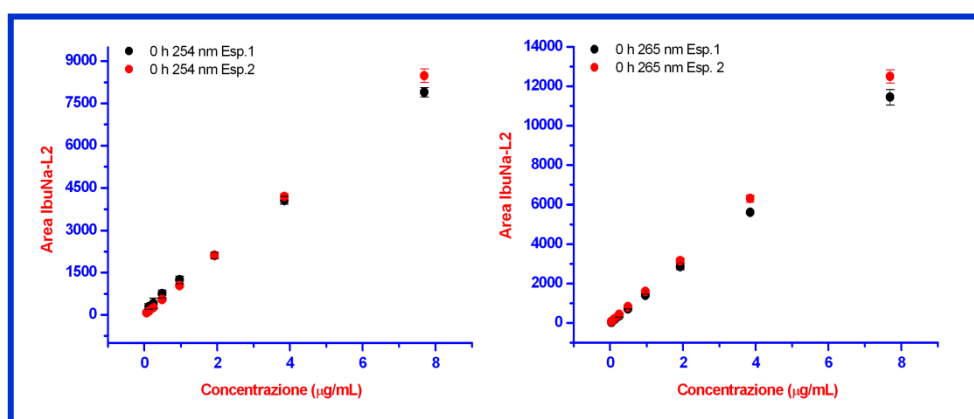


Figura 4.38. Confronto tra le aree dell'IbuNa-L2 non trattato termicamente quantificate negli esperimenti 1 e 2 alle lunghezze d'onda di 254 (sinistra) e 265 nm (destra).

La Figura 4.38 mostra la rappresentazione grafica delle aree dell'IbuNa-L2 quantificate negli esperimenti 1 e 2 messi a confronto a seconda della lunghezza d'onda settata per l'analisi cromatografica.

Il grafico di sinistra indica i risultati ottenuti a 254 nm, per i quali è possibile notare un aumento dell'area relativa al farmaco nell'esperimento 2. Ciononostante è anche visibile una deviazione standard maggiormente marcata, evidente solamente nel campione a concentrazione più alta (7,69 µg/mL). Tutti gli altri punti risultano quasi perfettamente sovrapposti alle analisi effettuate nell'esperimento 1.

La parte destra della Figura 4.39 mostra i risultati degli stessi esperimenti analizzati a 265 nm. In questo caso, emerge una similarità dei punti dei due esperimenti che tendono a sovrapporsi per il range di concentrazioni compreso tra 0,03 - 1,92 µg/mL. Tale precisione va a diminuire per i campioni a concentrazione 3,84 e 7,69 µg/mL, per i quali si nota una leggera differenza: per il punto più basso si ha solamente differenza nell'area, mentre nel primo punto è stata evidenziata la presenza di deviazione standard, che comunque risulta essere molto simile nei due esperimenti.

Concludendo, è stato constatato che la conservazione in campana ha comportato un piccolo aumento dell'area quantificata, ma non ha apportato una significativa

variazione della concentrazione della polvere. Questa affermazione è parzialmente dimostrata dalla Figura 4.38, nella quale bisogna però, tener conto della diversa quantificazione ottenuta per il DicloNa nel tempo intercorso tra i due esperimenti.

Si ricorda che l'unico parametro variabile è stata la preparazione della fase mobile da parte dell'operatore.

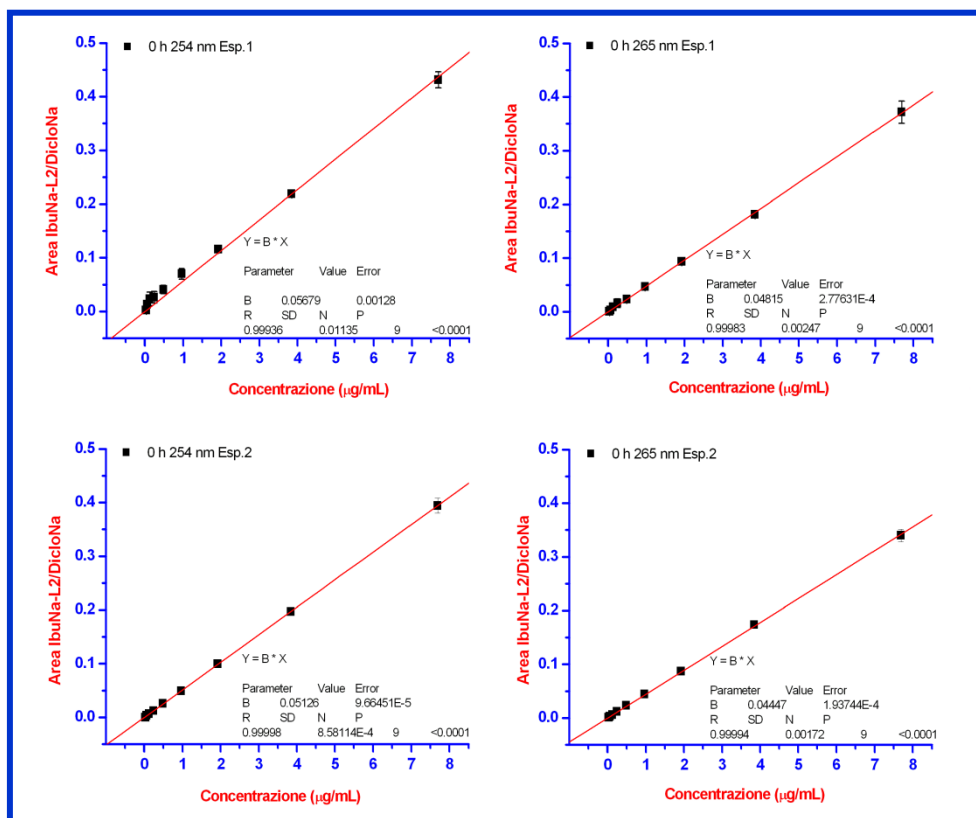


Figura 4.39. Confronto tra le regressioni lineari dell'IbuNa-L2 non trattato termicamente quantificate negli esperimenti 1 e 2 alle lunghezze d'onda di 254 (sinistra) e 265 nm (destra).

Per avere un'idea più chiara sulle differenze tra i due esperimenti, si sono elaborati i dati ottenuti, calcolando la media e la deviazione standard delle tre repliche per ciascuna retta, in modo da poter realizzare la regressione più consona all'andamento del grafico.

Infatti, la Figura 4.39 mostra l'elaborazione ed il confronto delle regressioni lineari caratterizzanti le rette dell'esperimento 1 e 2 a 254 nm (sinistra) e 265 nm (destra).

È possibile notare immediatamente, che i valori delle R-square risultano essere più alti nelle rette relative all'esperimento 2 in entrambe le lunghezze d'onda. Inoltre, è anche presente una deviazione standard molto meno significativa nell'ultimo esperimento ed una maggior linearità della distribuzione dei punti delle rette.

Per un'analisi dei risultati molto più approfondita, si è voluto procedere col calcolo percentuale sull'aumento della concentrazione dell'IbuNa-L2 rispetto ai diversi tempi di permanenza in stufa. È stato preso in considerazione come punto di riferimento il rapporto

tra IbuNa-L2 e DicloNa ottenuto nell'esperimento di controllo per la concentrazione 7,69 $\mu\text{g/mL}$, ritenuto essere il 100% del farmaco. Successivamente, per semplice proporzione, è stata calcolata la percentuale rappresentata dal farmaco trattato termicamente.

Per quanto riguarda l'esperimento 1, i calcoli effettuati hanno portato alla stima di un incremento del ca. 20% ottenuto nell'arco delle 48 ore, che risulta essere molto simile ad entrambe le lunghezze d'onda.

La percentuale non appare la medesima nell'esperimento 2, nella quale si abbassa sino al 3 - 4%.

Per l'esperimento 1, caratterizzato dall'analisi intermedia a 24 ore, è stato possibile anche verificare l'aumento percentuale nei diversi step (0 - 24 h vs. 24 - 48 h vs. 0 - 48 ore). Tale analisi ha appurato che si verifica un aumento del 15 - 17% nelle prime 24 ore, il quale viene incrementato del 3 - 5% tra le 24 - 48 ore. Perciò la percentuale che è possibile quantificare nell'intervallo 0 - 48 ore risulta essere ca. il 20%.

Quindi, è possibile concludere che per l'esperimento 1 è stato ottenuto un incremento del 20% nell'arco delle 48 ore ad entrambe le lunghezze d'onda. Inoltre, analizzando i tre step temporali, è possibile specificare che ca. l'85% dell'incremento avviene nelle prime 24 ore. La validità dei calcoli è stata verificata anche sulla concentrazione 3,84 $\mu\text{g/mL}$ mostrando gli stessi risultati.

L'analisi percentuale dell'esperimento 2 invece, mostra un incremento molto più basso, del 3 - 5%.

Infine, non è possibile concludere mettendo in evidenza la sicura efficacia della conservazione del farmaco sottovuoto, in quanto non è possibile effettuare un confronto percentuale tra i rapporti IbuNa-L2 / DicloNa, data la differente quantificazione dello standard interno nell'esperimento 2. Pertanto, è stato eseguito un calcolo percentuale prendendo in considerazione le aree dell'IbuNa-L2 e non i rapporti come fatto precedentemente.

Il risultato (e.g., 7,69 $\mu\text{g/mL}$) ottenuto mostra un incremento dell'8 - 9% ad entrambe le lunghezze d'onda, ma che tende a variare nelle altre concentrazioni (i.e., 3,84 $\mu\text{g/mL}$; 3,3 - 12%).

Per verificare l'attendibilità del calcolo è stata calcolata la percentuale anche sull'analisi effettuata a zero e 24 ore dell'esperimento 1 per la concentrazione 7,69 $\mu\text{g/mL}$. Il risultato è stato molto simile a quello ottenuto utilizzando i rapporti tra i due farmaci (21,8% vs. 20%).

Infine, se consideriamo le due lunghezze d'onda, è stato notato sicuramente un assorbimento maggiore della molecola a 265 nm, il quale però non aumenta il limite di rivelamento. Infatti, sebbene non siano stati risolti i problemi riscontrati per i 254 nm, è stato notato come vantaggio la pulizia del cromatogramma ed una maggior facilità nell'integrazione dei picchi d'interesse.

Esperimento 1

Tabella 4.24. Dati dei cromatogrammi della retta di IbuNa-L2 di controllo assieme al DicloNa a 254 nm

ripetizione	IbuNa-L2		T.R.	Area	Spalle	
	Conc. IbuNa μg/mL	Tempo (min)				
		iniziale	finale			
1	7,69	7,2	8,3	7,8	7.933	
2		7,1	8,5	7,8	7.713	
3		7,2	8,3	7,8	8.042	
media		7,2 ± 0,1	8,4 ± 0,1	7,8 ± 0,0	7.896,0 ± 167,6	
1	3,84	7,1	8,2	7,8	4.137	Sx
2		7,3	8,3	7,8	3.902	
3		7,1	8,3	7,8	4.131	
media		7,2 ± 0,1	8,3 ± 0,1	7,8 ± 0,0	4.056,7 ± 134,0	
1	1,92	7,1	8,2	7,8	2.129	
2		7,4	8,2	7,8	1.984	
3		7,2	8,3	7,8	2.213	
media		7,2 ± 0,2	8,2 ± 0,1	7,8 ± 0,0	2.108,7 ± 115,8	
1	0,96	7,1	8,3	7,8	1.334	Sx
2		7,4	8,2	7,8	1.095	Sx
3		7,1	8,2	7,8	1.314	Sx
media		7,2 ± 0,2	8,2 ± 0,1	7,8 ± 0,0	1.247,7 ± 132,6	
1	0,48	7,1	8,3	7,8	864	Sx
2		7,4	8,2	7,8	600	Sx
3		7,2	8,1	7,8	777	Sx
media		7,2 ± 0,2	8,2 ± 0,1	7,8 ± 0,0	747,0 ± 134,5	
1	0,24	7,1	8,0	7,7	537	
2		7,5	8,0	7,8	270	Sx
3		7,5	8,2	7,8	n.r.	
media		7,4 ± 0,2	8,1 ± 0,1	7,8 ± 0,1	403,5 ± 188,8	
1	0,12	6,9	7,9	7,7	n.r.	
2		7,5	7,9	7,6	225	
3		7,4	8,0	7,8	367	
media		7,3 ± 0,3	7,9 ± 0,1	7,7 ± 0,1	296,0 ± 100,4	
1	0,06	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	
2		n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	
3		n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	
media		n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	
1	0,03	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	
2		n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	
3		n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	
media		n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	

Tabella 4.25. Dati dei cromatogrammi del DicloNa a 254 nm (di controllo)

ripetizione	Conc. DicloNa µg/mL	DicloNa Tempo (min)		T.R.	Area	Spalle
		iniziale	finale			
1	7,69	10,4	11,8	10,9	18.209	
2		10,3	11,9	10,9	18.606	
3		10,4	11,9	10,9	18.134	
media		10,4 ± 0,1	11,9 ± 0,1	10,9 ± 0,0	18.316,3 ± 253,6	
1	3,84	10,3	12,0	10,9	18.397	
2		10,3	12,0	10,9	18.454	
3		10,3	12,0	10,9	18.749	
media		10,3 ± 0,0	12,0 ± 0,0	10,9 ± 0,0	18.533,3 ± 188,9	
1	1,92	10,3	11,7	10,9	18.135	
2		10,4	11,8	10,9	18.187	
3		10,4	11,9	10,9	18.274	
media		10,4 ± 0,1	11,8 ± 0,1	10,9 ± 0,0	18.198,7 ± 70,2	
1	0,96	10,4	11,8	10,9	16.788	
2		10,4	11,9	10,9	18.359	
3		10,4	11,9	10,9	18.415	
media		10,4 ± 0,0	11,9 ± 0,1	10,9 ± 0,0	17.854,0 ± 923,6	
1	0,48	10,3	11,9	10,9	18.055	
2		10,4	11,9	10,9	18.498	
3		10,3	11,9	10,9	18.236	
media		10,3 ± 0,1	11,9 ± 0,0	10,9 ± 0,0	18.263,0 ± 222,7	
1	0,24	10,3	12,0	10,9	18.298	
2		10,4	11,9	10,9	19.020	
3		10,3	11,8	10,9	18.235	
media		10,3 ± 0,1	11,9 ± 0,1	10,9 ± 0,0	18.517,7 ± 436,2	
1	0,12	10,3	11,9	10,9	17.733	
2		10,3	11,9	10,9	18.469	
3		10,3	11,9	10,9	18.056	
media		10,3 ± 0,0	11,9 ± 0,0	10,9 ± 0,0	18.086,0 ± 368,9	
1	0,06	10,4	11,9	10,9	18.608	
2		10,3	11,8	10,9	18.399	
3		10,2	11,8	10,9	18.287	
media		10,3 ± 0,1	11,8 ± 0,1	10,9 ± 0,0	18.431 ± 162,9	
1	0,03	10,5	11,8	10,9	18.325	
2		10,4	11,9	10,9	18.249	
3		10,4	11,9	10,9	18.218	
media		10,4 ± 0,1	11,9 ± 0,1	10,9 ± 0,0	18.264,0 ± 55,1	

Tabella 4.26. Dati dei cromatogrammi della retta di IbuNa di controllo assieme al DicloNa a 265 nm

ripetizione	IbuNa-L2		T.R.	Area	Spalle
	Conc. IbuNa μg/mL	Tempo (min)			
		iniziale	finale		
1	7,69	7,3	8,3	7,8	11.323
2		7,3	8,3	7,8	11.123
3		7,3	8,3	7,8	11.879
media		7,3 ± 0,0	8,3 ± 0,0	7,8 ± 0,0	11.441,7 ± 391,7
1	3,84	7,3	8,3	7,8	5.634
2		7,3	8,3	7,8	5.529
3		7,3	8,3	7,8	5.674
media		7,3 ± 0,0	8,3 ± 0,0	7,8 ± 0,0	5.612,3 ± 74,9
1	1,92	7,4	8,2	7,8	2.773
2		7,3	8,2	7,8	2.759
3		7,4	8,2	7,8	3.050
media		7,4 ± 0,1	8,2 ± 0,0	7,8 ± 0,0	2.860,7 ± 164,1
1	0,96	7,4	8,2	7,8	1.356
2		7,3	8,2	7,8	1.474
3		7,4	8,2	7,8	1.403
media		7,4 ± 0,1	8,2 ± 0,0	7,8 ± 0,0	1.411,0 ± 59,4
1	0,48	7,5	8,2	7,8	709
2		7,4	8,3	7,8	722
3		7,5	8,1	7,8	720
media		7,5 ± 0,1	8,2 ± 0,1	7,8 ± 0,0	717,0 ± 7,0
1	0,24	7,4	8,1	7,8	319
2		7,4	8,1	7,8	405
3		7,4	8,1	7,8	n.r.
media		7,4 ± 0,0	8,1 ± 0,0	7,8 ± 0,0	362,0 ± 60,81
1	0,12	7,5	8,1	7,8	138
2		7,4	8,0	7,8	204
3		7,4	8,0	7,8	n.r.
media		7,4 ± 0,1	8,0 ± 0,0	7,8 ± 0,0	171,0 ± 46,7
1	0,06	7,6	7,9	7,7	74
2		7,4	7,8	7,8	121
3		7,5	7,9	7,6	75
media		7,5 ± 0,1	7,9 ± 0,1	7,7 ± 0,1	90,0 ± 26,9
1	0,03	7,4	7,6	7,5	34
2		7,4	7,6	7,5	n.r.
3		n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
media		7,4 ± 0,0	7,6 ± 0,0	7,5 ± 0,0	34,0 ± 0,0

Tabella 4.27. Dati dei cromatogrammi della retta di DicloNa a 265 nm

ripetizione	DicloNa					Area	Spalle
	Conc. DicloNa		Tempo (min)		T.R.		
	$\mu\text{g/mL}$	iniziale	finale				
1	7,69	10,3	11,9	10,9	31.209		
2		10,3	11,9	10,9	31.225		
3		10,3	11,9	10,9	30.052		
media		10,3 ± 0,0	11,9 ± 0,0	10,9 ± 0,0	30.828,7 ± 672,7		
1	3,84	10,3	11,9	10,9	30.952		
2		10,3	11,9	10,9	30.949		
3		10,3	11,9	10,9	31.399		
media		10,3 ± 0,0	11,9 ± 0,0	10,9 ± 0,0	31.100,0 ± 258,9		
1	1,92	10,2	11,8	10,9	30.384		
2		10,3	11,8	10,9	30.553		
3		10,2	11,8	10,9	30.474		
media		10,2 ± 0,1	11,8 ± 0,0	10,9 ± 0,0	30.470,3 ± 84,6		
1	0,96	10,2	11,8	10,9	28.073		
2		10,3	11,8	10,9	30.997		
3		10,2	11,8	10,9	31.046		
media		10,2 ± 0,1	11,8 ± 0,0	10,9 ± 0,0	30.038,7 ± 1.702,5		
1	0,48	10,4	12,0	10,9	29.982		
2		10,3	11,8	10,9	31.414		
3		10,4	11,7	10,9	30.124		
media		10,4 ± 0,1	11,8 ± 0,2	10,9 ± 0,0	30.506,7 ± 789,0		
1	0,24	10,4	11,8	10,9	30.866		
2		10,4	11,7	10,9	31.611		
3		10,4	11,8	10,9	30.581		
media		10,4 ± 0,1	11,8 ± 0,2	10,9 ± 0,0	31.019,3 ± 531,8		
1	0,12	10,3	11,9	10,9	29.800		
2		10,3	11,6	10,9	30.810		
3		10,3	11,7	10,9	30.414		
media		10,3 ± 0,0	11,7 ± 0,2	10,9 ± 0,0	30.341,3 ± 508,9		
1	0,06	10,4	11,9	10,9	31.134		
2		10,3	11,7	10,9	30.966		
3		10,4	11,6	10,9	30.531		
media		10,4 ± 0,1	11,7 ± 0,2	10,9 ± 0,0	30.877,0 ± 311,2		
1	0,03	10,4	11,7	10,9	30.846		
2		10,4	12,0	10,9	30.929		
3		10,4	11,7	10,9	30.778		
media		10,4 ± 0,0	11,8 ± 0,2	10,9 ± 0,0	30.851,0 ± 75,6		

Tabella 4.28. Rapporti delle aree di IbuNa e DicloNa della retta di controllo a 254 e 265 nm

$\mu\text{g/mL}$	254 nm 0 ore					265 nm 0 ore				
	Ibu/Diclo		Ibu/Diclo			Ibu/Diclo		Ibu/Diclo		
	1	2	3	media	Dev.st	1	2	3	media	Dev.st
7,69	0,436	0,415	0,0443	0,431	0,015	0,363	0,356	0,395	0,371	0,021
3,84	0,225	0,211	0,220	0,219	0,007	0,182	0,179	0,184	0,181	0,003
1,92	0,117	0,109	0,121	0,116	0,006	0,091	0,090	0,100	0,094	0,005
0,96	0,079	0,060	0,071	0,070	0,010	0,048	0,048	0,045	0,047	0,002
0,48	0,048	0,032	0,043	0,041	0,008	0,024	0,023	<i>n.r.</i>	0,024	0,001
0,24	0,029	0,014	0,036	0,026	0,011	0,010	0,013	0,025	0,016	0,008
0,12	<i>n.r.</i>	0,012	0,020	0,016	0,005	0,005	0,007	<i>n.r.</i>	0,006	0,001
0,06	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	0,002	0,004	0,002	0,003	0,001
0,03	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	0,001	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	0,001	0,000

Tabella 4.29. Dati dei cromatogrammi della retta di IbuNa-L2 a 254 nm con 24 ore di stufa

ripetizione	IbuNa-L2						
	Conc. IbuNa		Tempo (min)			Area	Spalle
	$\mu\text{g/mL}$	iniziale	finale	T.R.			
1	7,69	6,6	7,8	7,2	9.836		
2		6,6	7,8	7,2	9.886		
3		6,4	7,9	7,2	9.127		
media		$6,5 \pm 0,1$	$7,8 \pm 0,1$	$7,2 \pm 0,0$	$9.616 \pm 424,5$		
1	3,84	6,7	7,6	7,2	4.932		
2		6,7	7,7	7,2	5.240		
3		6,5	7,9	7,2	4.916		
media		$6,6 \pm 0,1$	$7,7 \pm 0,2$	$7,2 \pm 0,0$	$5.029,3 \pm 182,6$		
1	1,92	6,6	7,6	7,2	2.767		
2		6,6	7,6	7,2	2.866		
3		6,6	7,8	7,2	2.649		
media		$6,6 \pm 0,0$	$7,7 \pm 0,1$	$7,2 \pm 0,0$	$2.760,7 \pm 108,6$		
1	0,96	6,6	7,6	7,2	1.426		
2		6,7	7,7	7,2	1.456		
3		6,7	7,6	7,2	1.427		
media		$6,7 \pm 0,1$	$7,6 \pm 0,1$	$7,2 \pm 0,0$	$1.436,3 \pm 17,0$		
1	0,48	6,9	7,6	7,2	900		
2		6,7	7,7	7,2	853		
3		6,8	7,6	7,2	747		
media		$6,8 \pm 0,1$	$7,6 \pm 0,1$	$7,2 \pm 0,0$	$833,3 \pm 78,4$		
1	0,24	6,7	7,6	7,2	515		
2		6,9	7,5	7,2	490		
3		6,8	7,5	7,2	393		
media		$6,8 \pm 0,1$	$7,5 \pm 0,1$	$7,2 \pm 0,0$	$466,0 \pm 64,4$		
1	0,12	6,9	7,5	7,2	230		
2		6,9	7,4	7,2	289		
3		7,0	7,5	7,2	193		
media		$6,9 \pm 0,1$	$7,5 \pm 0,1$	$7,2 \pm 0,0$	$237,3 \pm 48,4$		
1	0,06	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>		
2		<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>		
3		<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>		
media		<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>		
1	0,03	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>		
2		<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>		
3		<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>		
media		<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>		

Tabella 4.30. Dati dei cromatogrammi della retta di DicloNa a 254 nm con 24 ore di stufa

ripetizione	Conc. DicloNa μg/mL	DicloNa			Area	Spalle
		iniziale	finale	T.R.		
1	7,69	9,6	11,0	10,2	18.943	
2		9,5	11,1	10,2	19.279	
3		9,6	11,0	10,2	19.030	
media		9,6 ± 0,1	11,0 ± 0,1	10,2 ± 0,0	19.084,0 ± 174,4	
1	3,84	9,6	11,0	10,2	17.774	
2		9,4	11,1	10,2	18.999	
3		9,6	11,1	10,2	18.106	
media		9,5 ± 0,1	11,1 ± 0,1	10,2 ± 0,0	18.293,0 ± 633,5	
1	1,92	9,5	11,1	10,2	18.751	
2		9,5	11,1	10,2	17.896	
3		9,5	11,1	10,2	18.556	
media		9,5 ± 0,0	11,1 ± 0,0	10,2 ± 0,0	18.401,0 ± 448,1	
1	0,96	9,6	11,0	10,2	18.016	
2		9,6	11,0	10,2	17.623	
3		9,6	11,0	10,2	17.253	
media		9,6 ± 0,0	11,0 ± 0,0	10,2 ± 0,0	17630,7 ± 381,6	
1	0,48	9,5	11,1	10,2	19.687	
2		9,6	11,1	10,2	18.549	
3		9,6	11,0	10,2	17.943	
media		9,6 ± 0,1	11,1 ± 0,1	10,2 ± 0,0	18.726,3 ± 885,4	
1	0,24	9,5	11,1	10,2	18.709	
2		9,5	11,1	10,2	18.112	
3		9,5	11,1	10,2	18.637	
media		9,5 ± 0,0	11,1 ± 0,0	10,2 ± 0,0	18.486,0 ± 325,9	
1	0,12	9,6	11,1	10,2	17.808	
2		9,6	11,1	10,2	18.096	
3		9,6	11,1	10,2	18.300	
media		9,6 ± 0,0	11,1 ± 0,0	10,2 ± 0,0	18.068,0 ± 247,2	
1	0,06	9,6	11,1	10,2	17.871	
2		9,6	11,1	10,2	18.867	
3		9,6	11,1	10,2	17.990	
media		9,6 ± 0,0	11,1 ± 0,0	10,2 ± 0,0	18.242,7 ± 544,0	
1	0,03	9,6	11,1	10,2	18.325	
2		9,6	11,1	10,2	18.877	
3		9,6	11,1	10,2	18.385	
media		9,6 ± 0,0	11,1 ± 0,0	10,2 ± 0,0	18.529,0 ± 302,9	

Tabella 4.31. Dati dei cromatogrammi della retta di IbuNa-L2 a 265nm con 24 ore di stufa

ripetizione	Conc. IbuNa µg/mL	IbuNa-L2			Area	Spalle
		iniziale	finale	T.R.		
1	7,69	6,6	7,8	7,2	14.244	
2		6,5	7,9	7,2	13.995	
3		6,6	7,6	7,2	12.855	
media		6,6 ± 0,1	7,8 ± 0,2	7,2 ± 0,0	13.698,0 ± 740,1	
1	3,84	6,8	7,7	7,2	7.118	
2		6,8	7,8	7,2	7.487	
3		6,6	7,7	7,2	6.711	
media		6,7 ± 0,1	7,7 ± 0,1	7,2 ± 0,0	7.105,3 ± 388,2	
1	1,92	6,8	7,7	7,2	3.700	
2		6,8	7,8	7,2	3.634	
3		6,8	7,7	7,2	3.378	
media		6,8 ± 0,0	7,7 ± 0,1	7,2 ± 0,0	3.570,7 ± 170,1	
1	0,96	6,8	7,6	7,2	1.850	
2		6,9	7,6	7,2	1.759	
3		6,8	7,6	7,2	1.626	
media		6,8 ± 0,1	7,6 ± 0,0	7,2 ± 0,0	1.745,0 ± 112,7	
1	0,48	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	
2		6,9	7,6	7,2	844	
3		6,8	7,7	7,2	909	
media		6,9 ± 0,1	7,6 ± 0,1	7,2 ± 0,0	876,5 ± 46,0	
1	0,24	6,8	7,6	7,2	620	
2		n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	
3		n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	
media		6,8 ± 0,1	7,6 ± 0,0	7,2 ± 0,0	620,0 ± 0,0	
1	0,12	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	
2		n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	
3		n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	
media		n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	
1	0,06	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	
2		n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	
3		n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	
media		n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	
1	0,03	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	
2		n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	
3		n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	
media		n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	

Tabella 4.34. Dati dei cromatogrammi della retta di IbuNa-L2 a 254 nm con 48 ore di stufa

ripetizione	IbuNa-L2						
	Conc. IbuNa		Tempo (min)			Area	Spalle
	$\mu\text{g/mL}$	iniziale	finale	T.R.			
1	7,69	3,8	4,4	4,1	9.084		
2		3,8	4,4	4,1	9.505		
3		3,8	4,4	4,1	9.324		
media		$3,8 \pm 0,0$	$4,4 \pm 0,0$	$4,1 \pm 0,0$	$9.304,3 \pm 211,2$		
1	3,84	3,8	4,4	4,1	4.404		
2		3,8	4,4	4,1	4.752		
3		3,8	4,4	4,1	5.143		
media		$3,8 \pm 0,0$	$4,4 \pm 0,0$	$4,1 \pm 0,0$	$4.766,3 \pm 369,7$		
1	1,92	3,8	4,4	4,1	2.187		
2		3,8	4,4	4,1	2.516		
3		3,8	4,4	4,1	2.347		
media		$3,8 \pm 0,0$	$4,4 \pm 0,0$	$4,1 \pm 0,0$	$2.350,0 \pm 164,5$		
1	0,96	3,9	4,4	4,1	1.120		
2		3,8	4,4	4,1	1.432		
3		3,8	4,4	4,1	1.149		
media		$3,8 \pm 0,0$	$4,4 \pm 0,0$	$4,1 \pm 0,0$	$1.233,7 \pm 172,4$		
1	0,48	4,0	4,4	4,1	545		
2		3,9	4,4	4,1	622		
3		3,9	4,3	4,1	549		
media		$3,9 \pm 0,1$	$4,4 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,0$	$572,0 \pm 43,3$		
1	0,24	4,0	4,4	4,1	264		
2		4,0	4,4	4,1	274		
3		4,0	4,4	4,1	304		
media		$4,0 \pm 0,0$	$4,4 \pm 0,0$	$4,1 \pm 0,0$	$280,7 \pm 20,8$		
1	0,12	4,0	4,4	4,1	162		
2		4,0	4,4	4,1	144		
3		4,0	4,4	4,1	162		
media		$4,0 \pm 0,0$	$4,4 \pm 0,0$	$4,1 \pm 0,0$	$156,0 \pm 10,4$		
1	0,06	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>		
2		<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>		
3		<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>		
media		<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>		
1	0,03	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>		
2		<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>		
3		<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>		
media		<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>		

Tabella 4.35. Dati dei cromatogrammi della retta di DicloNa a 254nm con 48 ore di stufa

ripetizione	DicloNa		T.R.	Area	Spalle
	Conc. DicloNa $\mu\text{g/mL}$	Tempo (min)			
		iniziale	finale		
1	7,69	4,6	5,5	4,9	17.436
2		4,6	5,3	4,9	18.430
3		4,6	5,4	4,9	18.049
media		$4,6 \pm 0,0$	$5,4 \pm 0,1$	$4,9 \pm 0,0$	$17.971,7 \pm 501,5$
1	3,84	4,6	5,4	4,9	18.413
2		4,6	5,3	4,9	17.929
3		4,6	5,4	4,9	18.430
media		$4,6 \pm 0,0$	$5,4 \pm 0,1$	$4,9 \pm 0,0$	$18257,3 \pm 284,5$
1	1,92	4,6	5,4	4,9	17.945
2		4,6	5,4	4,9	17.867
3		4,6	5,4	4,9	17.953
media		$4,6 \pm 0,0$	$5,4 \pm 0,0$	$4,9 \pm 0,0$	$17.921,7 \pm 47,5$
1	0,96	4,6	5,4	4,9	17.717
2		4,6	5,4	4,9	18.182
3		4,6	5,4	4,9	17.349
media		$4,6 \pm 0,0$	$5,4 \pm 0,0$	$4,9 \pm 0,0$	$17749,3 \pm 417,4$
1	0,48	4,7	5,5	4,9	18.715
2		4,7	5,6	4,9	18.729
3		4,5	5,4	4,9	17.821
media		$4,6 \pm 0,1$	$5,5 \pm 0,1$	$4,9 \pm 0,0$	$18.421,7 \pm 502,2$
1	0,24	4,7	5,7	4,9	18.717
2		4,7	5,7	4,9	18.578
3		4,7	5,7	4,9	18.092
media		$4,7 \pm 0,0$	$5,7 \pm 0,1$	$4,9 \pm 0,0$	$18.462,3 \pm 328,2$
1	0,12	4,8	5,6	4,9	18.578
2		4,8	5,6	4,9	19.139
3		4,8	5,6	4,9	18.578
media		$4,8 \pm 0,0$	$5,6 \pm 0,0$	$4,9 \pm 0,0$	$18.765,0 \pm 323,9$
1	0,06	9,6	11,0	10,2	18.447
2		9,6	11,0	10,2	18.377
3		9,6	11,0	10,2	17.792
media		$9,6 \pm 0,0$	$11,0 \pm 0,0$	$10,2 \pm 0,0$	$18.205,3 \pm 359,7$
1	0,03	9,6	11,0	10,2	18.331
2		9,6	11,0	10,2	18.784
3		9,6	11,0	10,2	18.392
media		$9,6 \pm 0,0$	$11,0 \pm 0,0$	$10,2 \pm 0,0$	$18.502,3 \pm 245,8$

Tabella 4.36. Dati dei cromatogrammi della retta di IbuNa-L2 a 265 nm con 48 ore di stufa

ripetizione	Conc.IbuNa		IbuNa-L2			Area	Spalle
	$\mu\text{g/mL}$		Tempo (min)		T.R.		
		iniziale	finale				
1	7,69	3,8	4,5	4,1	13.364		
2		3,8	4,4	4,1	14.023		
3		3,8	4,4	4,1	13.781		
media		$3,8 \pm 0,0$	$4,4 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,0$	$13.722,7 \pm 333,4$		
1	3,84	3,8	4,4	4,1	6.463		
2		3,8	4,4	4,1	6.994		
3		3,8	4,4	4,1	7.415		
media		$3,8 \pm 0,0$	$4,4 \pm 0,0$	$4,1 \pm 0,0$	$6.957,3 \pm 477,1$		
1	1,92	3,8	4,4	4,1	3.224		
2		3,9	4,4	4,1	3.777		
3		3,8	4,4	4,1	3.475		
media		$3,8 \pm 0,1$	$4,4 \pm 0,0$	$4,1 \pm 0,0$	$3.492,0 \pm 276,9$		
1	0,96	3,8	4,4	4,1	1.708		
2		3,8	4,5	4,1	2.108		
3		3,9	4,3	4,1	1.666		
media		$3,8 \pm 0,1$	$4,4 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,0$	$1.827,3 \pm 244,0$		
1	0,48	4,0	4,5	4,1	831		
2		3,9	4,4	4,1	963		
3		3,8	4,4	4,1	950		
media		$3,9 \pm 0,1$	$4,4 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,0$	$914,7 \pm 72,7$		
1	0,24	4,0	4,5	4,1	442		
2		3,9	4,4	4,1	455		
3		3,8	4,4	4,1	442		
media		$3,9 \pm 0,1$	$4,4 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,0$	$446,3 \pm 7,5$		
1	0,12	4,0	4,5	4,1	317		
2		4,0	4,5	4,1	251		
3		3,8	4,4	4,1	255		
media		$3,9 \pm 0,1$	$4,5 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,0$	$274,3 \pm 37,0$		
1	0,06	6,9	7,5	7,2	227		
2		<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>		
3		6,9	7,6	7,2	118		
media		$6,9 \pm 0,1$	$7,6 \pm 0,1$	$7,2 \pm 0,0$	$172,5 \pm 77,1$		
1	0,03	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>		
2		<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>		
3		<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>		
media		<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>		

Esperimento 2

Tabella 4.39. Dati dei cromatogrammi della retta di IbuNa-L2 a 254 nm di controllo

ripetizione	Conc.IbuNa		IbuNa-L2		T.R.	Area	Spalle
	$\mu\text{g/mL}$		iniziale	finale			
1	7,69		7,1	7,8	7,4	8.350	
2			7,3	8,0	7,6	8.338	
3			7,0	7,8	7,4	8.767	
media			$7,1 \pm 0,2$	$7,9 \pm 0,1$	$7,5 \pm 0,1$	$8485,0 \pm 244,3$	
1	3,84		7,5	8,2	7,8	4.101	Sx
2			7,4	8,2	7,7	4.169	
3			7,4	8,1	7,7	4.300	
media			$7,4 \pm 0,1$	$8,2 \pm 0,1$	$7,7 \pm 0,1$	$4.190,0 \pm 101,1$	
1	1,92		7,4	8,1	7,7	2.122	
2			7,6	8,2	7,9	2.049	Sx
3			7,6	8,3	7,9	2.160	Sx
media			$7,5 \pm 0,1$	$8,2 \pm 0,1$	$7,8 \pm 0,1$	$2.110,3 \pm 56,4$	
1	0,96		7,6	8,2	7,8	1.059	Sx
2			7,6	8,1	7,8	1.004	Sx
3			7,5	8,2	7,8	1.063	Sx
media			$7,6 \pm 0,1$	$8,2 \pm 0,1$	$7,8 \pm 0,0$	$1.042,0 \pm 33,0$	
1	0,48		7,5	8,1	7,8	545	Sx
2			7,4	8,0	7,6	520	
3			7,4	8,0	7,7	559	
media			$7,4 \pm 0,1$	$8,0 \pm 0,1$	$7,7 \pm 0,1$	$541,3 \pm 19,8$	
1	0,24		7,4	7,9	7,6	277	Sx
2			7,4	7,9	7,6	235	Sx
3			7,4	7,9	7,6	260	Sx
media			$7,4 \pm 0,0$	$7,9 \pm 0,0$	$7,6 \pm 0,0$	$257,3 \pm 21,1$	
1	0,12		7,4	7,9	7,6	136	
2			7,5	7,9	7,7	132	
3			7,4	7,9	7,7	137	
media			$7,4 \pm 0,1$	$7,9 \pm 0,0$	$7,7 \pm 0,1$	$135,0 \pm 2,6$	
1	0,06		7,3	7,9	7,5	77	
2			7,3	7,7	7,5	87	
3			7,5	7,8	7,6	72	
media			$7,4 \pm 0,1$	$7,8 \pm 0,1$	$7,97 \pm 0,028$	$78,7 \pm 7,6$	
1	0,03		<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	
2			<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	
3			<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	
media			<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	

Tabella 4.40. Dati dei cromatogrammi della retta di Diclo Na a 254 nm di controllo

ripetizione	Diclo Na		T.R.	Area	Spalle
	Conc.DicloNa μg/mL	Tempo (min)			
		iniziale	finale		
1	7,69	9,3	10,5	9,8	21.151
2		9,6	10,7	10,1	21.965
3		9,3	10,3	9,8	21.504
media		9,4 ± 0,2	10,5 ± 0,2	9,9 ± 0,2	21.540,0 ± 408,2
1	3,84	10,1	11,1	10,5	21.245
2		9,9	11,0	10,4	21.396
3		9,8	11,0	10,3	21.249
media		9,9 ± 0,2	11,0 ± 0,1	10,4 ± 0,1	21.296,7 ± 86,0
1	1,92	9,9	10,9	10,3	21.174
2		10,1	11,2	10,6	21.139
3		10,1	11,2	10,3	21.256
media		10,0 ± 0,1	11,1 ± 0,2	10,4 ± 0,2	21.189,7 ± 60,1
1	0,96	10,0	11,2	10,6	21.117
2		10,0	11,0	10,4	21.140
3		10,0	11,1	10,5	21.218
media		10,0 ± 0,0	11,1 ± 0,1	10,5 ± 0,1	21.158,3 ± 52,9
1	0,48	9,9	11,0	10,4	21.152
2		9,8	11,0	10,2	21.059
3		9,8	10,9	10,3	20.283
media		9,8 ± 0,1	11,0 ± 0,1	10,3 ± 0,1	20.831,3 ± 477,1
1	0,24	9,6	10,8	10,2	21.025
2		9,8	10,9	10,2	21.178
3		9,8	10,9	10,2	20.847
media		9,7 ± 0,1	10,9 ± 0,1	10,2 ± 0,0	21.016,7 ± 165,7
1	0,12	9,7	10,7	10,2	21.290
2		9,7	11,0	10,2	21.049
3		9,8	10,9	10,3	21.094
media		9,7 ± 0,1	10,9 ± 0,2	10,2 ± 0,1	21.144,3 ± 128,1
1	0,06	9,5	10,7	10,1	21.313
2		9,4	10,7	10,0	21.249
3		9,7	10,8	10,2	21.755
media		9,5 ± 0,2	10,7 ± 0,1	10,1 ± 0,1	21.439,0 ± 275,5
1	0,03	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>
2		9,4	10,7	10,0	21.767
3		<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>
media		9,7 ± 0,4	11,0 ± 0,5	10,2 ± 0,3	21.767,0 ± 0,0

Tabella 4.41. Dati dei cromatogrammi della retta di IbuNa a 265 nm di controllo

ripetizione	IbuNa-L2		T.R.	Area	Spalle
	Conc.IbuNa $\mu\text{g/mL}$	Tempo (min)			
		iniziale	finale		
1	7,69	7,2	8,1	7,5	12.193
2		7,0	8,0	7,4	12.417
3		7,0	8,0	7,5	12.858
media		$7,1 \pm 0,1$	$8,0 \pm 0,1$	$7,5 \pm 0,1$	$12.489,3 \pm 338,3$
1	3,84	7,5	8,3	7,8	6.137
2		7,1	8,0	7,5	6.267
3		7,3	8,1	7,6	6.481
media		$7,3 \pm 0,2$	$8,1 \pm 0,2$	$7,6 \pm 0,2$	$6.295,0 \pm 173,7$
1	1,92	7,5	8,3	7,8	3.161
2		7,5	8,1	7,8	3.012
3		7,4	8,2	7,7	3.281
media		$7,5 \pm 0,1$	$8,2 \pm 0,1$	$7,8 \pm 0,1$	$3.151,3 \pm 134,8$
1	0,96	7,4	8,1	7,7	1.673
2		7,4	8,0	7,7	1.516
3		7,6	8,2	7,9	1.596
media		$7,5 \pm 0,1$	$8,1 \pm 0,1$	$7,8 \pm 0,1$	$1.595,0 \pm 78,5$
1	0,48	7,6	8,1	7,8	849
2		7,4	8,0	7,7	821
3		7,5	8,2	7,8	805
media		$7,5 \pm 0,1$	$8,1 \pm 0,1$	$7,8 \pm 0,1$	$825,0 \pm 22,3$
1	0,24	7,3	7,9	7,6	428
2		7,4	8,1	7,7	440
3		7,3	7,9	7,6	417
media		$7,3 \pm 0,1$	$8,0 \pm 0,1$	$7,6 \pm 0,1$	$428,3 \pm 11,5$
1	0,12	7,3	7,8	7,6	229
2		7,4	7,8	7,5	187
3		7,3	7,7	7,5	231
media		$7,3 \pm 0,1$	$7,8 \pm 0,1$	$7,5 \pm 0,1$	$215,7 \pm 24,8$
1	0,06	7,4	7,9	7,6	130
2		7,3	7,6	7,5	92
3		7,5	8,0	7,7	123
media		$7,4 \pm 0,1$	$7,8 \pm 0,2$	$7,6 \pm 0,1$	$115,0 \pm 20,2$
1	0,03	7,5	7,9	7,6	74
2		<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>
3		7,4	7,7	7,6	64
media		$7,5 \pm 0,1$	$7,8 \pm 0,1$	$7,6 \pm 0,0$	$69,0 \pm 7,1$

Tabella 4.42. Dati dei cromatogrammi della retta di DicloNa a 265 nm di controllo

ripetizione	Conc. DicloNa $\mu\text{g/mL}$	DicloNa Tempo (min)		T.R.	Area	Spalle
		iniziale	finale			
1	7,69	9,6	10,8	10,1	36.064	
2		9,3	10,6	9,8	37.724	
3		9,3	10,6	9,8	36.529	
media		9,4 \pm 0,2	10,7 \pm 0,1	9,9 \pm 0,2	36.772,3 \pm 856,3	
1	3,84	10,0	11,2	10,6	36.015	
2		9,5	10,7	10,0	36.443	
3		9,7	10,9	10,2	36.158	
media		9,7 \pm 0,3	10,9 \pm 0,3	10,3 \pm 0,3	36.205,3 \pm 217,9	
1	1,92	10,1	11,3	10,6	36.074	
2		9,9	11,0	10,4	36.183	
3		9,8	11,1	10,4	36.327	
media		9,9 \pm 0,2	11,1 \pm 0,2	10,5 \pm 0,1	36.194,7 \pm 126,9	
1	0,96	9,8	11,0	10,4	36.158	
2		9,9	11,1	10,4	36.018	
3		10,2	11,2	10,6	35.911	
media		10,0 \pm 0,2	11,1 \pm 0,1	10,5 \pm 0,1	36.029,0 \pm 123,9	
1	0,48	10,0	11,1	10,5	36.032	
2		9,7	11,0	10,2	35.974	
3		10,0	11,2	10,5	34.618	
media		9,9 \pm 0,2	11,1 \pm 0,1	10,4 \pm 0,2	35.541,3 \pm 800,2	
1	0,24	9,5	10,7	10,0	35.850	
2		9,8	10,9	10,3	36.031	
3		9,6	10,9	10,1	35.759	
media		9,6 \pm 0,2	10,8 \pm 0,1	10,1 \pm 0,2	35.880,0 \pm 138,5	
1	0,12	9,5	10,6	10,0	36.077	
2		9,6	10,7	10,0	35.353	
3		9,5	10,8	10,0	35.953	
media		9,5 \pm 0,1	10,7 \pm 0,1	10,0 \pm 0,0	35.794,3 \pm 387,2	
1	0,06	9,7	10,9	10,2	36.283	
2		9,5	10,7	10,0	36.050	
3		9,8	10,9	10,3	36.908	
media		9,7 \pm 0,2	10,8 \pm 0,1	10,2 \pm 0,2	36.413,7 \pm 443,7	
1	0,03	9,6	10,9	10,1	35.601	
2		9,4	10,6	9,8	35.960	
3		9,7	10,8	10,1	35.291	
media		9,6 \pm 0,2	10,8 \pm 0,2	10,0 \pm 0,2	35.617,3 \pm 334,8	

Tabella 4.43. Rapporti delle aree di IbuNa e DicloNa a 254 e 265 nm con trattamento di 0 ore di stufa

$\mu\text{g/mL}$	254 nm 0 ore					265 nm 0 ore				
	Ibu/Diclo		Ibu/Diclo			Ibu/Diclo		Ibu/Diclo		
	1	2	3	media	Dev.st	1	2	3	media	Dev.st
7,69	0,395	0,380	0,408	0,394	0,014	0,338	0,329	0,352	0,340	0,012
3,84	0,193	0,195	0,202	0,197	0,005	0,170	0,172	0,179	0,174	0,005
1,92	0,100	0,097	0,102	0,100	0,002	0,088	0,083	0,090	0,087	0,004
0,96	0,050	0,047	0,050	0,049	0,002	0,046	0,042	0,044	0,044	0,002
0,48	0,026	0,025	0,028	0,026	0,001	0,024	0,023	0,023	0,023	0,000
0,24	0,013	0,011	0,012	0,012	0,001	0,012	0,012	0,012	0,012	0,000
0,12	0,006	0,006	0,006	0,006	0,000	0,006	0,005	0,006	0,006	0,001
0,06	0,004	0,004	0,003	0,004	0,001	0,004	0,003	0,003	0,003	0,001
0,03	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	0,002	<i>n.r.</i>	0,002	0,002	0,000

Tabella 4.44. Dati dei cromatogrammi della retta di IbuNa a 254 nm trattati con 48 ore di stufa

IbuNa-L2						
ripetizione	Conc. IbuNa		Tempo (min)			Spalle
	$\mu\text{g/mL}$	iniziale	finale	T.R.	Area	
1	7,69	7,3	8,0	7,5	8.590	Sx
2		7,1	7,9	7,4	9.023	
3		7,1	7,9	7,4	9.622	
media		$7,2 \pm 0,1$	$7,9 \pm 0,1$	$7,4 \pm 0,1$	$9.078,3 \pm 518,2$	
1	3,84	7,4	8,2	7,7	4.255	Sx
2		7,4	8,2	7,7	4.393	
3		7,4	8,2	7,7	4.633	
media		$7,4 \pm 0,0$	$8,2 \pm 0,0$	$7,7 \pm 0,0$	$4.427,0 \pm 518,2$	
1	1,92	7,5	8,1	7,7	2.136	
2		7,5	8,1	7,7	2.158	
3		7,4	8,1	7,7	2.239	
media		$7,5 \pm 0,1$	$8,1 \pm 0,0$	$7,7 \pm 0,0$	$2.177,7 \pm 54,2$	
1	0,96	7,4	8,0	7,7	1.040	
2		7,4	8,0	7,7	1.161	
3		7,5	8,1	7,7	1.124	
media		$7,4 \pm 0,1$	$8,0 \pm 0,1$	$7,7 \pm 0,0$	$1.108,3 \pm 62,0$	
1	0,48	7,4	8,0	7,7	498	
2		7,4	8,0	7,7	547	
3		7,5	8,1	7,7	577	
media		$7,4 \pm 0,1$	$8,0 \pm 0,1$	$7,7 \pm 0,0$	$540,7 \pm 39,9$	
1	0,24	7,4	7,9	7,7	252	
2		7,3	7,9	7,7	294	
3		7,4	7,9	7,7	274	
media		$7,4 \pm 0,1$	$7,9 \pm 0,0$	$7,7 \pm 0,0$	$273,3 \pm 21,0$	
1	0,12	7,5	7,9	7,7	185	
2		7,5	7,9	7,7	137	
3		7,4	7,8	7,6	136	
media		$7,5 \pm 0,1$	$7,9 \pm 0,1$	$7,7 \pm 0,1$	$152,7 \pm 28,0$	
1	0,06	7,6	7,9	7,7	93	
2		7,3	7,7	7,6	81	
3		7,4	7,8	7,6	84	
media		$7,4 \pm 0,2$	$7,8 \pm 0,1$	$7,6 \pm 0,1$	$86,0 \pm 6,2$	
1	0,03	7,6	7,8	7,7	50	
2		<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	
3		7,5	7,9	7,7	48	
media		$7,6 \pm 0,1$	$7,9 \pm 0,1$	$7,7 \pm 0,0$	$49,0 \pm 1,4$	

Tabella 4.45. Dati dei cromatogrammi della retta di DicloNa a 254 nm trattati con 48 ore di stufa

ripetizione	DicloNa		T.R.	Area	Spalle	
	Conc. DicloNa	Tempo (min)				
	$\mu\text{g/mL}$	iniziale	finale			
1	7,69	9,7	10,9	10,2	21.858	Dx Dx
2		9,5	10,8	10,0	22.595	
3		9,5	10,8	10,0	22.480	
media		$9,6 \pm 0,1$	$10,8 \pm 0,1$	$10,1 \pm 0,1$	$22.311,0 \pm 396,5$	
1	3,84	10,0	11,0	10,4	21.510	Dx
2		9,9	11,0	10,4	21.412	
3		10,0	11,0	10,4	22.346	
media		$10,0 \pm 0,1$	$11,0 \pm 0,0$	$10,4 \pm 0,0$	$21.756,0 \pm 513,3$	
1	1,92	10,0	11,0	10,5	19.119	
2		10,0	11,0	10,5	21.958	
3		9,9	11,1	10,5	21.225	
media		$10,0 \pm 0,1$	$11,0 \pm 0,0$	$10,5 \pm 0,0$	$20.767,3 \pm 1473,8$	
1	0,96	10,0	11,0	10,4	21.390	
2		9,9	11,0	10,4	22.176	
3		9,9	11,0	10,5	22.109	
media		$9,9 \pm 0,1$	$11,0 \pm 0,0$	$10,4 \pm 0,1$	$21.891,7 \pm 435,7$	
1	0,48	9,8	11,0	10,3	21.753	
2		9,9	11,0	10,3	21.537	
3		9,9	11,0	10,4	17.552	
media		$9,9 \pm 0,1$	$11,0 \pm 0,0$	$10,3 \pm 0,1$	$20.280,7 \pm 2365,6$	
1	0,24	9,9	11,0	10,3	21.448	
2		9,8	11,0	10,3	20.289	
3		9,8	11,0	10,3	21.802	
media		$9,8 \pm 0,1$	$11,0 \pm 0,0$	$10,3 \pm 0,0$	$21.179,7 \pm 791,4$	
1	0,12	9,9	11,0	10,4	21.353	
2		9,8	11,0	10,3	21.784	
3		9,7	11,0	10,3	21.627	
media		$9,8 \pm 0,1$	$11,0 \pm 0,0$	$10,3 \pm 0,0$	$21.588,0 \pm 218,1$	
1	0,06	9,8	11,0	10,4	21.089	
2		9,5	10,9	10,2	19.728	
3		9,8	11,0	10,2	21.167	
media		$9,7 \pm 0,2$	$11,0 \pm 0,1$	$10,3 \pm 0,1$	$20.661,3 \pm 809,2$	
1	0,03	9,0	10,1	9,6	21.124	
2		9,2	10,2	9,7	19.935	
3		9,3	10,2	9,7	20.878	
media		$9,2 \pm 0,2$	$10,2 \pm 0,1$	$9,7 \pm 0,1$	$20.645,7 \pm 627,6$	

Tabella 4.46. Dati dei cromatogrammi della retta di IbuNa a 265 nm trattati con 48 ore di stufa

ripetizione	IbuNa-L2					
	Conc. IbuNa	Tempo (min)			Area	Spalle
	$\mu\text{g/mL}$	iniziale	finale	T.R.		
1	7,69	7,1	8,0	7,5	12.845	
2		7,1	8,0	7,4	13.304	
3		7,1	8,0	7,5	14.107	
media		$7,1 \pm 0,0$	$8,0 \pm 0,0$	$7,5 \pm 0,1$	$13.418,7 \pm 638,8$	
1	3,84	7,3	8,2	7,7	6.376	
2		7,4	8,1	7,7	6.624	
3		7,4	8,1	7,7	6.931	
media		$7,4 \pm 0,1$	$8,1 \pm 0,1$	$7,7 \pm 0,0$	$6.643,7 \pm 278,0$	
1	1,92	7,4	8,2	7,7	3.259	
2		7,4	8,2	7,7	3.291	
3		7,4	8,1	7,7	3.474	
media		$7,4 \pm 0,0$	$8,2 \pm 0,1$	$7,7 \pm 0,0$	$3.341,3 \pm 116,0$	
1	0,96	7,4	8,2	7,7	1.614	
2		7,4	8,1	7,7	1.645	
3		7,5	8,1	7,7	1.742	
media		$7,4 \pm 0,1$	$8,1 \pm 0,1$	$7,7 \pm 0,0$	$1.667,0 \pm 66,8$	
1	0,48	7,4	8,0	7,7	764	
2		7,4	8,0	7,7	868	
3		7,4	8,1	7,7	878	
media		$7,4 \pm 0,0$	$8,0 \pm 0,1$	$7,7 \pm 0,0$	$836,7 \pm 63,1$	
1	0,24	7,4	7,9	7,7	387	
2		7,4	8,0	7,7	420	
3		7,4	8,0	7,7	426	
media		$7,4 \pm 0,0$	$8,0 \pm 0,1$	$7,7 \pm 0,0$	$411,0 \pm 21,0$	
1	0,12	7,5	7,9	7,7	188	
2		7,4	7,9	7,7	228	
3		7,4	7,9	7,7	236	
media		$7,4 \pm 0,1$	$7,9 \pm 0,0$	$7,7 \pm 0,0$	$217,3 \pm 25,7$	
1	0,06	7,6	7,9	7,7	112	
2		7,3	7,9	7,7	120	
3		7,5	7,9	7,7	125	
media		$7,5 \pm 0,2$	$7,9 \pm 0,0$	$7,7 \pm 0,0$	$119,0 \pm 6,6$	
1	0,03	7,6	7,9	7,7	45	
2		7,6	7,9	7,7	58	
3		7,6	7,9	7,7	64	
media		$7,6 \pm 0,0$	$7,9 \pm 0,0$	$7,7 \pm 0,0$	$55,7 \pm 9,7$	

Tabella 4.47. Dati dei cromatogrammi della retta di DicloNa a 265 nm trattati con 48 ore di stufa

ripetizione	DicloNa					
	Conc. DicloNa			Tempo (min)		
	$\mu\text{g/mL}$	iniziale	finale	T.R.	Area	Spalle
1	7,69	9,5	10,8	10,1	37.174	
2		9,5	10,8	10,0	38.401	
3		9,6	10,9	10,0	38.165	
media		9,5 \pm 0,1	10,8 \pm 0,1	10,0 \pm 0,1	37.913,3 \pm 651,1	
1	3,84	9,9	11,1	10,4	36.505	
2		9,9	11,1	10,4	36.273	
3		9,9	11,1	10,4	37.912	
media		9,9 \pm 0,0	11,1 \pm 0,0	10,4 \pm 0,0	36.896,7 \pm 886,9	
1	1,92	9,9	11,1	10,5	32.476	
2		10,0	11,2	10,5	37.185	
3		10,0	11,0	10,4	35.703	
media		10,0 \pm 0,1	11,1 \pm 0,1	10,5 \pm 0,1	35.121,3 \pm 2407,8	
1	0,96	9,9	11,0	10,4	36.366	
2		10,0	11,1	10,4	37.574	
3		10,0	11,1	10,5	37.130	
media		10,0 \pm 0,1	11,1 \pm 0,1	10,4 \pm 0,1	37.023,3 \pm 611,0	
1	0,48	9,9	11,0	10,3	36.893	
2		9,9	11,0	10,4	36.628	
3		9,9	11,1	10,4	30.207	
media		9,9 \pm 0,0	11,0 \pm 0,1	10,4 \pm 0,1	34.576,0 \pm 3.786,0	
1	0,24	9,8	11,1	10,3	36.750	
2		9,8	11,1	10,3	34.369	
3		9,8	11,0	10,3	36.892	
media		9,8 \pm 0,0	11,1 \pm 0,1	10,3 \pm 0,0	36003,7 \pm 1.417,4	
1	0,12	9,9	11,1	10,4	36.620	
2		9,8	11,0	10,3	36.914	
3		9,8	10,9	10,3	36.478	
media		9,8 \pm 0,1	11,0 \pm 0,1	10,3 \pm 0,1	36.670,7 \pm 222,4	
1	0,06	9,8	10,9	10,3	35.444	
2		9,6	11,0	10,2	33.813	
3		9,8	11,0	10,3	35.976	
media		9,7 \pm 0,1	11,0 \pm 0,1	10,3 \pm 0,1	35.077,7 \pm 1.127,1	
1	0,03	9,1	10,2	9,6	36.734	
2		9,1	10,6	9,7	34.197	
3		9,7	10,8	10,1	35.291	
media		9,3 \pm 0,3	10,5 \pm 0,3	9,8 \pm 0,3	35.407,3 \pm 1.272,5	

Tabella 4.48. Rapporti delle aree di IbuNa-L2 e DicloNa a 254 e 265 nm con trattamento di 48 ore di stufa

$\mu\text{g/mL}$	254 nm 48 ore					265 nm 48 ore				
	Ibu/Diclo		Ibu/Diclo			Ibu/Diclo		Ibu/Diclo		
	1	2	3	media	Dev.st	1	2	3	media	Dev.st
7,69	0,393	0,399	0,428	0,407	0,019	0,346	0,346	0,370	0,354	0,014
3,84	0,198	0,205	0,207	0,203	0,005	0,175	0,183	0,183	0,180	0,005
1,92	0,112	0,098	0,105	0,105	0,007	0,100	0,089	0,097	0,095	0,006
0,96	0,049	0,052	0,051	0,051	0,002	0,044	0,044	0,047	0,045	0,002
0,48	0,023	0,025	0,033	0,027	0,005	0,021	0,024	0,029	0,024	0,004
0,24	0,012	0,014	0,013	0,013	0,001	0,011	0,012	0,012	0,011	0,001
0,12	0,009	0,006	0,006	0,007	0,001	0,005	0,006	0,006	0,006	0,001
0,06	0,004	0,004	0,004	0,004	0,000	0,003	0,004	0,003	0,003	0,000
0,03	0,002	<i>n.r.</i>	0,002	0,002	0,000	0,001	0,002	0,002	0,002	0,000

Tabella 4.49. Confronto tra IbuNa / DicloNa a 254 e 265 nm trattati con 0 - 48 ore di stufa (Esperimento 2)

$\mu\text{g/mL}$	254 nm 0 ore		265 nm 0 ore		254 nm 48 ore		265 nm 48 ore	
	Ibu/Diclo		Ibu/Diclo		Ibu/Diclo		Ibu/Diclo	
	media	Dev.st	media	Dev.st	media	Dev.st	media	Dev.st
7,69	0,394	0,014	0,340	0,012	0,407	0,019	0,354	0,014
3,84	0,197	0,005	0,174	0,005	0,203	0,005	0,180	0,005
1,92	0,100	0,002	0,087	0,004	0,105	0,007	0,095	0,006
0,96	0,049	0,002	0,044	0,002	0,051	0,002	0,045	0,002
0,48	0,026	0,001	0,023	0,000	0,027	0,005	0,024	0,004
0,24	0,012	0,001	0,012	0,000	0,013	0,001	0,011	0,001
0,12	0,006	0,000	0,006	0,001	0,007	0,001	0,006	0,001
0,06	0,004	0,000	0,003	0,001	0,004	0,000	0,003	0,000
0,03	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	0,001	0,001	0,002	0,001	0,001	0,000

Tabella 4.50. Confronto tra IbuNa / DicloNa a 254 e 265 nm trattati con 0 - 48 ore di stufa (Esperimento 1)

$\mu\text{g/mL}$	254 nm 0 ore		265 nm 0 ore		254 nm 48 ore		265 nm 48 ore	
	Ibu/Diclo		Ibu/Diclo		Ibu/Diclo		Ibu/Diclo	
	media	Dev.st	media	Dev.st	media	Dev.st	media	Dev.st
7,69	0,431	0,015	0,371	0,021	0,518	0,003	0,448	0,003
3,84	0,219	0,007	0,181	0,003	0,261	0,020	0,223	0,016
1,92	0,116	0,006	0,094	0,005	0,131	0,009	0,114	0,009
0,96	0,070	0,010	0,047	0,002	0,069	0,008	0,060	0,007
0,48	0,041	0,008	0,024	0,000	0,031	0,002	0,029	0,003
0,24	0,026	0,011	0,016	0,008	0,015	0,001	0,014	0,000
0,12	0,023	0,013	0,009	0,006	0,008	0,001	0,009	0,001
0,06	0,013	0,006	0,003	0,001	0,020	0,007	0,006	0,002
0,03	0,002	0,004	0,001	0,001	0,018	0,001	0,010	0,000

4.9.6 Influenza della temperatura sul campione

Nella messa a punto della metodica cromatografica è stato studiato anche il comportamento del farmaco in seguito alla variazione del settaggio (dallo strumento stesso) della temperatura del campione.

Le analisi finora effettuate sono state caratterizzate dal campione iniettato a temperatura ambiente (30 °C), monitorata anche dal sistema dello strumento stesso; in aggiunta, si è anche provato a portarlo ad una temperatura di 25°C, termostatando la rack nella quale era contenuta la vial del campione d'interesse.

Inoltre, la termostatazione ha riguardato anche la stanza in cui sono state eseguite le analisi, attraverso un condizionamento di 24 ore su 24 ad una temperatura costante di 25 °C.

In aggiunta, è stata impostata anche la temperatura del forno, la quale è rimasta per tutta la durata dell'analisi cromatografica a 25°C.

Tutti gli accorgimenti descritti e attuati hanno permesso di evitare degli sbalzi di temperatura che avrebbero potuto alterare le condizioni di analisi dello strumento.

Dai risultati ottenuti e graficati in Figura 4.40 è possibile notare una leggera differenza nel cromatogramma ottenuto dal campione termostato (Fig. 4.40 in rosso).

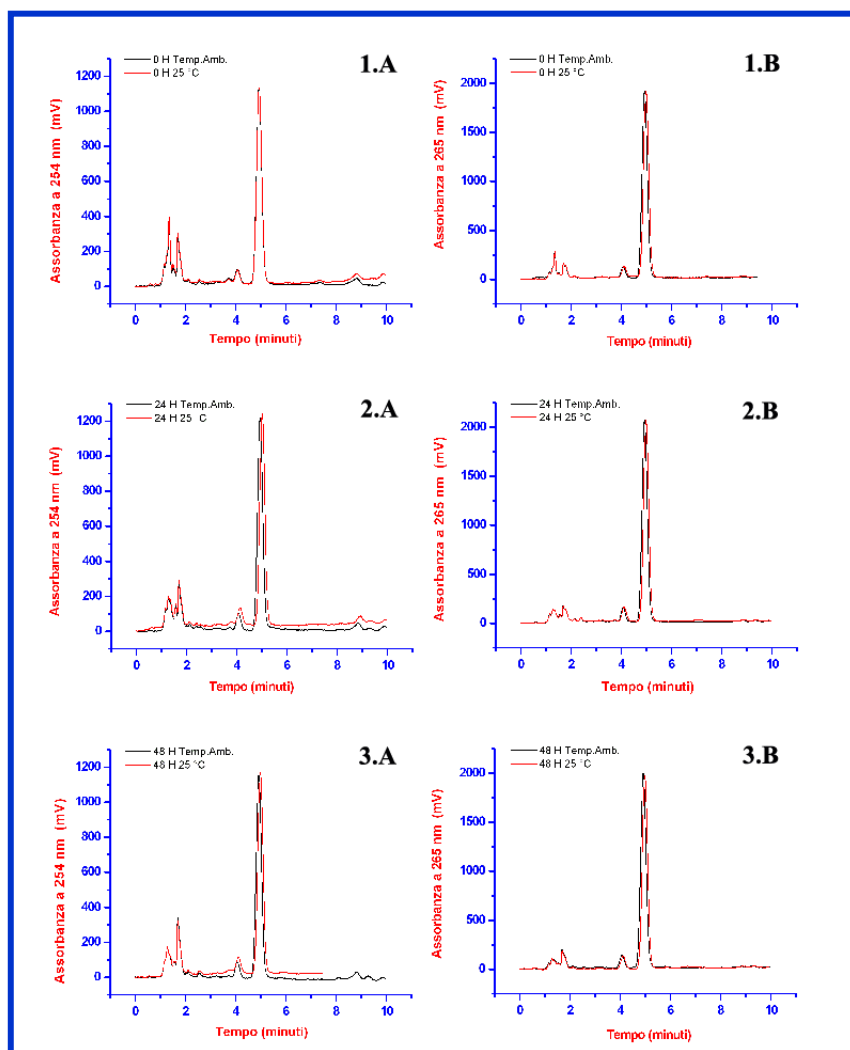


Figura 4.40. Cromatogrammi IbuNa e DicloNa insieme. I cromatogrammi rappresentati in questa figura sono quelli relativi alle prove di conservazione dell'IbuNa in stufa per 24h e 48h rispettivamente alle lunghezze d'onda 265 nm a destra e 254 nm a sinistra. Inoltre per ognuna delle condizioni di conservazione dell'IbuNa, sono state prese anche in considerazione le condizioni climatiche dell'ambiente in cui si è svolta l'analisi: a "Temp.Amb." temperatura ambiente oppure a "25°C" termostatando la rack a 25°C.

In tutti i casi (Fig.4.40 1.A - 3B), infatti, il grafico risulta essere caratterizzato da una linea di base meno regolare rispetto alla temperatura ambiente e dalla presenza di deriva nel corso delle analisi a 254 nm di lunghezza d'onda (Fig. 4.40 1.A, 2.A, 3.A).

Inoltre, è possibile evidenziare una miglior simmetria del picco dell'IbuNa nelle condizioni di temperatura ambiente e delle analisi effettuate a 265 nm, nei restanti casi

emerge una spalla alla sinistra del picco. In generale è ben visibile una traslazione dei picchi verso destra di qualche secondo.

Infine, il fronte del solvente (0 - 2 min.) risulta essere sempre il medesimo, anche se nell'analisi a 265 nm appare con un'intensità molto più bassa. E' possibile ipotizzare che sia dovuto semplicemente ad un minor assorbimento delle sostanze contenute nel campione a quella lunghezza d'onda.

Nella Figura 4.41 sono visibili i cromatogrammi del medesimo esperimento osservati tutti insieme per lunghezza d'onda.

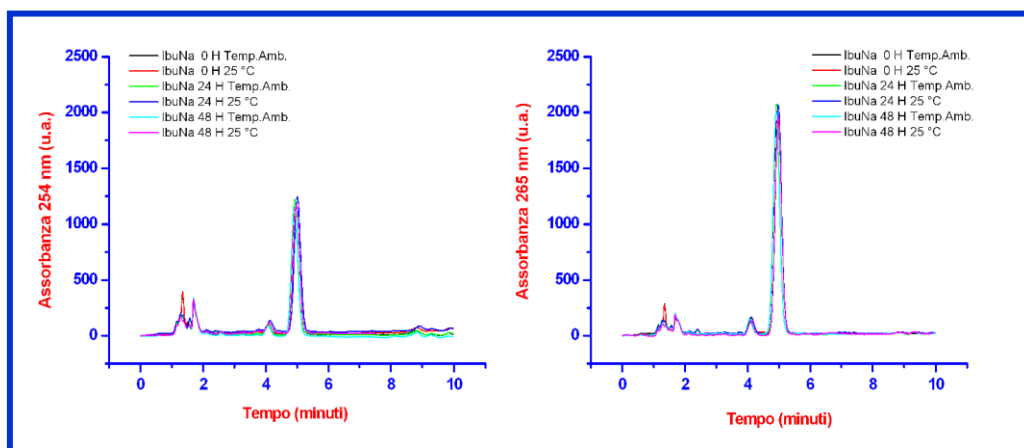


Figura 4.41. Cromatogrammi IbuNa e DicloNa insieme. I cromatogrammi rappresentati in questa figura sono quelli relativi alle prove di conservazione dell'IbuNa in stufa per 24h e 48h rispettivamente alle lunghezze d'onda 254 nm a sinistra e 265 nm a destra. Come è possibile osservare dalla figura, i cromatogrammi a 265 nm presentano dei picchi migliori. Inoltre per ognuna delle condizioni di conservazione dell'IbuNa, sono state prese anche in considerazione le condizioni climatiche dell'ambiente in cui si è svolta l'analisi: a "Temp.Amb." temperatura ambiente oppure a "25C" 25°C.

Pertanto, possiamo concludere che la termostatazione non ha apportato alcun miglioramento del cromatogramma, ma anzi ha mostrato un'alterazione della linea di base.

La sperimentazione della metodica ottimizzata ha preso in considerazione come punto di partenza il lavoro di Brown *et al.* nonostante l'utilizzo da parte dello stesso della forma acida dell'Ibu. Infatti, la scelta è stata effettuata in base all'utilizzo in fase mobile del tampone fosfato a pH 7, importante per il nostro campione d'interesse che si troverà appunto disperso in questa fase in quanto derivante da un esperimento di veicolazione transdermica.

Le altre differenze riguardanti gli altri parametri di analisi verranno analizzate per semplicità in modo schematico:

Tipo di tampone utilizzato: in letteratura sono stati trovati dei lavori in cui si utilizza il tampone fosfato di potassio [61, 62], ma in alcuni casi si tratta di fosfato di sodio [13, 16, 15] e in altri di fosfato acetato [62]. La scelta per la messa a punto della nostra metodica

è ricaduta sul fosfato di potassio che era già a nostra disposizione in laboratorio, ed è stato utilizzato senza nessun timore di precipitazione in quanto gli studi di Schellinger *et al.* [58] hanno posto i limiti di concentrazione e pH tali per cui non si andasse incontro a nessun tipo di problema durante l'analisi cromatografica.

pH: gli autori tendono a lavorare con una metodica in cui il parametro del pH è tendenzialmente acido e non neutro come le condizioni da noi richieste [62]. La scelta effettuata nel nostro laboratorio ha preferito utilizzare un pH neutro che rispecchiasse il più possibile le condizioni sperimentali di veicolazione transdermica [13, 64]. Pertanto, in colonna era atteso un comportamento intermedio tra le due possibili situazioni riguardanti le analisi di composti acidi (come nel caso del nostro campione): a pH basico diminuisce la ritenzione e di conseguenza si avrà un tempo di uscita anticipato; mentre a pH acido la ritenzione aumenta e quindi il farmaco verrà rilasciato più ritardatamente [manuale colonna].

Temperatura: in lavori precedenti è stato notato l'utilizzo del riscaldamento della colonna pari a 40 °C [63, 61], che nel nostro caso non è stato utilizzato per attenerci il più possibile alle condizioni sperimentali ambientali (temp.amb.).

Fase mobile: in letteratura non sono stati trovati altri lavori che utilizzassero la fase mobile da noi messa a punto. Talvolta il tampone fosfato di potassio è stato utilizzato in concentrazione 50 mM ma in combinazione con un altro solvente come il metanolo [61]. In altri casi, la sua concentrazione dimezzata (25 mM) è stata utilizzata con l'acetonitrile in rapporto 50:50 v/v ma con un pH acido (pH=2) [X.Yuan].

Flusso e Assorbanza: lavori presenti in letteratura mostrano che il flusso da noi utilizzato risulta essere intermedio a quello scelto da altri autori che oscilla tra 0,8 mL/min [64] e 1,5 mL/min [63].

La lunghezza d'onda utilizzata nella nostra metodica (265 nm) è stata scelta in seguito ad un'analisi spettrofotometrica attraverso la quale è stato stimato il massimo punto di assorbimento della sostanza. In precedenza, la messa a punto del metodo era partita da 254 nm, lunghezza d'onda utilizzata in esperimenti precedenti. Pertanto, alla luce dei risultati ottenuti dai nostri studi, non è del tutto comprensibile come diversi autori siano riusciti a quantificare in maniera accurata e precisa la molecola a 220 nm [63, 61, 65, 66]. Altri lavori invece, utilizzano una lunghezza d'onda di poco superiore alla nostra settata a 280 nm [62,16].

5

Conclusioni

Il lavoro eseguito in questa tesi ha posto le basi per l'organizzazione e la realizzazione di un esperimento di veicolazione transdermica utilizzando della cute umana.

Infatti, è stato messo a punto un metodo per la quantificazione delle proteine presenti nel campione di cute sottoposto a degradazione e deproteinizzazione. Pertanto, attraverso l'utilizzo del kit NanoOrange è stata possibile testare l'efficacia dei diversi metodi di deproteinizzazione presi in esame.

I risultati ottenuti hanno sottolineato la medesima funzionalità dei metodi che sfruttavano l'azione precipitante con solvente organico e della criodeproteinizzazione. Nonostante questo, un minor quantitativo proteico è stato misurato in seguito all'utilizzo delle provette Amicon, le quali risultano essere eccellenti anche per il loro pratico e veloce impiego.

Non è possibile dire altrettanto riguardo le cartucce Spe, le quali sembrano essere più problematiche anche per l'interazione con farmaco in forma salificata di nostro interesse. Ma per poterle totalmente escludere dal possibile utilizzo per la deproteinizzazione del campione resta da testare la soluzione dell'analisi immediata del filtrato evitando qualsiasi forma di essiccazione e risospensione.

Infine, anche il metodo Folch è risultato valido, nonostante rimanga da caratterizzare con maggior attenzione la componente della fase cloroformica per poter escludere con certezza la possibile presenza del farmaco nella suddetta fase.

La messa a punto della metodica cromatografica per la quantificazione dell'IbuNa ha previsto un'analisi completa e meticolosa di tutte le soluzioni utilizzate e di tutte le metodiche sperimentate. Infatti, non ci si è soffermati alla semplice analisi cromatografica ma sono stati approfonditi tutti gli aspetti concernenti la caratterizzazione dei farmaci utilizzati.

Innanzitutto, in seguito ai problemi pressori riscontrati utilizzando la metodica di Brown *et al.* si è approfondita l'analisi sulla stabilità delle soluzioni utilizzate e trattate.

È stata indagata l'efficacia dei supporti filtranti utilizzati e la purezza dell'acqua ottenendo dei risultati che attestavano la stabilità fisica delle soluzioni da noi adoperate.

Successivamente, in seguito alla percezione di un odore sgradevole del farmaco d'interesse, ci si è soffermati sull'ispezione delle sue caratteristiche fisiche, le quali sono state messe a confronto con quelle di un lotto nuovo.

Le analisi effettuate hanno riguardato: la misurazione del pH, il punto di fusione, l'analisi NMR, l'analisi IR ed infine, l'analisi UV-Vis.

Se si analizzano nel dettaglio i risultati è possibile notare che:

la misurazione del punto di fusione di entrambi i lotti e della loro miscela ha permesso di stabilire una maggior purezza del lotto 2;

la misurazione del pH ha permesso di notare che l'aggiunta dell'ACN al tampone, per il ripristino della fase mobile, porta ad un aumento del valore di pH in maniera proporzionale alla concentrazione del tampone fosfato; nonostante questo i pH dei due lotti sono molto simili tra loro;

l'analisi IR non ha permesso di notare differenze tra i due lotti, solamente effettuando un confronto con lo spettro fornito dalla casa madre è stato possibile confermare la natura igroscopica della sostanza;

infine, lo spettro NMR eseguito, purtroppo, non è stato utile sull'approfondimento dell'indagine riguardante la presenza di umidità nella polvere, in quanto il solvente utilizzato è stato l'acqua deuterata, la quale avrebbe mascherato l'eventuale igroscopicità del farmaco;

l'analisi Uv-Vis ha messo invece in evidenza che:

- la forma del picco resta sempre la medesima in ciascuna soluzione testata (WMQ, PBS, TF25) tranne nel caso dell'Ac.Form col quale compare una piccola spalla alla sinistra;
- l'assorbimento dei due lotti non trattati termicamente è differente;
- l'assorbimento massimo dell'IbuNa risulta sempre essere 265 nm;
- è stata testata l'efficacia del trattamento termico a 100°C a diversi tempi: entrambi i lotti aumentano dopo 24 ore e diminuiscono tra le 48-72 ore, ma poi assumono un comportamento differente sino alle 168. L'IbuNa-L1 aumenta per poi diminuire notevolmente, mentre il lotto 2 cresce costantemente;
- la conservazione con l'anidrificante testata come metodo alternativo alla stufa non ha avuto gli stessi risultati ma risulta essere più pratico;

- le curve di calibrazione realizzate mostrano un differente andamento a seconda della lunghezza d'onda selezionata: lineare a 255 nm e polinomiale a 265 nm.

Pertanto, è stato deciso di proseguire lo studio per l'allestimento della metodica utilizzando il lotto 2 dell'IbuNa, e preferendo la lunghezza d'onda di 265 nm, nonostante sia stata utilizzata nelle prove anche 254 nm per verificare le differenze.

Per quanto riguarda quanto accennato all'inizio di questo paragrafo sull'effetto del THF sullo strumento, purtroppo non è stato possibile ottenere delle informazioni esaustive ne dai manuali operativi ne tantomeno da parte dell'assistenza tecnica, di conseguenza è stato pensato di non utilizzarlo come componente della fase mobile.

Prima di effettuare tale scelta e di proseguire con la messa a punto della nostra metodica, sono state adottate delle misure precauzionali che assicurassero un ottimo utilizzo e rendimento dello strumento stesso.

Innanzitutto, sono state determinate le condizioni basali dello strumento: sono state monitorate le pressioni generate a 0,5 e 1,0 mL/min facendo fluire diverse fasi mobili di riferimento (Tab. 4.15) prima del condizionamento dello strumento. In modo particolare, sono state testate anche le pressioni registrate nelle diverse condizioni di allestimento del sistema previo utilizzo, per verificare le condizioni della colonna e dei suoi accessori per assicurare un ottimo funzionamento.

Pertanto, è stato stabilito che le pressioni che attestano le ottime condizioni del circuito corredato di colonna e dei suoi accessori, nella sua fase di conservazione sono rispettivamente 40 e 70 bar per 0,5 e 1,0 mL/min.

Questo significa che in seguito alle analisi dei campioni e dei rispettivi lavaggi la pressione è sempre stata controllata per verificare se fossero state ripristinate le condizioni basali prima di un successivo esperimento.

In caso contrario è sempre stato avviato un ulteriore lavaggio. I metodi di pulizia dello strumento allestiti sono stati cinque (Tab. 4.3), differenti tra loro esclusivamente per la diversa durata delle fasi. La scelta di uno piuttosto che un altro è stata fatta basandosi sul numero e sul tipo di campioni analizzati e soprattutto sulla pressione raggiunta alla fine delle analisi. È possibile affermare che qualsiasi lavaggio eseguito ha sempre ripristinato le condizioni basali iniziali.

Successivamente, è stato studiato il comportamento dei componenti della fase mobile variando le loro percentuali all'interno del range 27:73 - 30:70 v/v per capire quale fosse la più adatta per le nostre analisi.

Il risultato delle varie prove ha portato alla conclusione della capacità del solvente organico di anticipare i tempi di ritenzione delle sostanze. Ma a tal proposito è stato tenuto conto di un tempo di uscita non troppo vicino al fronte del solvente per evitare una possibile sovrapposizione dei picchi che interferisse con una corretta quantificazione.

Un'ulteriore prova è stata fatta variando il flusso, ad una velocità di 0,7, 1,2 e 1,3 mL/min, ma il ritardo e l'anticipazione dei tempi di ritenzione ottenuti non soddisfaceva le nostre esigenze. In aggiunta, la separazione tra le due sostanze non era particolarmente definita come quella ottenuta ad un flusso di 1,0 mL/min.

Inoltre, è stato testato l'inserimento di un terzo solvente in fase mobile, che giocasse il ruolo del THF utilizzato da Brown *et al.*. Ma i risultati ed i cromatogrammi ottenuti non sono stati soddisfacenti, anche a causa dell'alterazione della forma del picco che presentava una spalla nel lato destro, pertanto, è stata abbandonata tale soluzione.

La scelta di monitorare le analisi alle due lunghezze d'onda sopracitate ha permesso di notare immediatamente, una maggior pulizia della linea di base del cromatogramma ed un maggior assorbimento delle due sostanze a 265 nm.

Infine, tenendo conto di tutti i cromatogrammi ottenuti e di tutti gli studi effettuati è stata scelta la fase mobile più adatta alla nostra separazione in modo da discostarci il meno possibile dall'articolo di riferimento; pertanto è stata scelta inizialmente la FM-2 che è stata successivamente sostituita dalla FM-17 per ovviare ai problemi di alta pressione in colonna risolti con il dimezzamento della concentrazione del TF; inoltre è stato scelto il flusso di 1,0 mL/min, una lunghezza d'onda di 265 nm ed un volume d'iniezione di 20 μ L. La corsa cromatografica è stata eseguita a temperatura ambiente (monitorata a 25 °C) senza termostatare il campione.

Una volta stabilita la metodica, si è proseguito con la realizzazione delle curve di calibrazione dell'IbuNa contenente il suo standard interno, caratterizzata da un range di rivelazione compreso tra 7,69 e 0,12 μ g/mL.

L'analisi è stata effettuata ad entrambe le lunghezze d'onda testate, evidenziando un diverso andamento della regressione rispetto all'analisi UV. Infatti, è risultata essere di tipo lineare ad entrambe le lunghezze d'onda (all'UV è stata ottenuta di tipo lineare per i 254 nm e per i 265 nm di lunghezza d'onda).

I risultati ottenuti sono stati soddisfacenti, infatti i valori di R-square calcolati sono molto vicini al valore 1 (Fig. 4.40).

Concludendo, è possibile confermare il raggiungimento della messa a punto di una metodica di separazione in Hplc per l'IbuNa. Il metodo prevede come vantaggio l'utilizzo di una fase mobile di semplice preparazione, che assicura una salvaguardia dello strumento nei confronti della presenza dei Sali di fosfato in fase mobile. Inoltre, fornisce tutte le indicazioni e gli accorgimenti necessari ed indispensabili per l'analisi dei campioni in situazioni di estrema precisione e accuratezza, ed in condizioni basali ripetibili e costantemente monitorate.

In aggiunta, la metodica è caratterizzata da una corsa cromatografica tale da non permettere un utilizzo eccessivo di solventi, in modo da non comportare un alto dispendio economico.

Nonostante tutto il vantaggio di maggior rilievo per la nostra linea di ricerca risulta essere sicuramente il fatto che le condizioni di analisi risultano essere molto simili a quelle esistenti nel corso dell'esperimento di veicolazione transdermica. Questo aspetto comporterebbe un trattamento minimo dei campioni, i quali potrebbero essere analizzati direttamente all'Hplc in seguito all'aggiunta dello standard interno.

6

Bibliografia

- [1] M.R. Prausnitz and R. Langer. *Transdermal drug delivery*. Nat Biotechnol. 2008 November ; 26(11): 1261–1268. doi:10.1038/nbt.1504
- [2] B. Baroli. *Skin for intracutaneous or percutaneous drug delivery?* Dalle lezioni di "legislazione e forme farmaceutiche", corso di laurea TAAF, (2009).
- [3] B. Baroli. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: fiction or reality? *Journal of pharmaceutical sciences*, 21817, (2009); pp. 1-9.
- [4] G. Ambrosi, G. Anastasi, D. Cantino, S. Capitani, R.F. Donato, A.T. Franzi, R. Geremia, M. Gulisano, M.F. Marcello, A.M. Martelli, G. Mazzotti, A. Papardelli, M. Rende, G. Zummo. *Anatomia dell'uomo*. (Edi-Ermes s.r.l., Milano, 2001); pp. 429-436.
- [5] B. Baroli. *Physiological factors affecting transdermal bioavailability: Skin Structure*. Dalle lezioni di "legislazione e forme farmaceutiche", corso di laurea TAAF., (2009).
- [6] A. Pasqualino, E. Nesci. *Anatomia umana fondamentale*. (Utet Editore, Torino, 1980); pp. 787-789.
- [7] I. Cattaneo. *Compendio di anatomia umana*. (Monduzzi Editore, Bologna, 1986, seconda edizione); pp. 69-81.
- [8] B.W. Barry. Breaching the skin's barrier to drug. *Nature Biotechnology*, 22, (2004); pp. 165-167.
- [9] B. Baroli. *Veicolazione di farmaci nella e attraverso la pelle*. Dalle lezioni di "legislazione e forme farmaceutiche", corso di laurea TAAF., (2009).
- [10] Y. Bakhbaki, S. Alfadul, A. Ajbar. *Precipitation of Ibuprofen Sodium using compressed carbon dioxide as antisolvent*. European Journal of Pharmaceutical Sciences 48 (2013) 30–39 .
- [11] D. Narayanan, Geena M.G. *Poly-(ethylene glycol) modified gelatin nanoparticles for sustained delivery of the anti-inflammatory drug Ibuprofen-Sodium: An in vitro and in vivo analysis* Nanomedjournal.com9 (2013) 818–828

- [12] K. Bhaskar, J. Anbu, V. Ravichandiran, V. Venkateswarlu and Y.M. Rao. *Lipid nanoparticles for transdermal delivery of flurbiprofen: formulation, in vitro, ex vivo and in vivo studies*. *Lipids in Health and Disease* 2009, 8:6 doi:10.1186/1476-511X-8-6
- [13] M.B. Brown, M. Hanpanitcharoen, G.P. Martin. An in vitro investigation into the effect of glycosaminoglycans on the skin partitioning and deposition of NSAIDs. *International journal of Pharmaceutics*, 225, (2001); pp. 113-121.
- [14] "Culture of Animal cells, a manual of basic technique
- [15] R.Pignatello, C. Bucolo, P. Ferrara, A. Maltese, A. Puleo, G. Puglisi. Eudragit RS100 nanosuspensions for the ophthalmic controlled delivery of ibuprofen. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 16 (2002) 53–6
- [16] A. C. Sintov, S. Botner. Transdermal drug delivery using microemulsion and aqueous systems: Influence of skin storage conditions on the in vitro permeability of diclofenac from aqueous vehicle systems *International Journal of Pharmaceutics* 311 (2006) 55–62
- [17] S. Silberblatt, R. A. Felder, and T. E. Mifflin. Optimizing Reaction Conditions of the NanoOrange®Protein Quantitation Method for Use With Microplate-based Automation *Journal of the Association for Laboratory Automation*
- [18] L.J. Jones, R. P. Haugland, and V. L. Singer. Development and Characterization of the NanoOrange ®Protein Quantitation Assay: A Fluorescence-Based Assay of Proteins in Solution. *BioTechniques* 34:850-861 (April 2003)
- [19] L. Pont, F. Benavente, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot. An update for human blood plasma pretreatment for optimized recovery of low-molecular-mass peptides prior to CE-MS and SPE-CE-MS. *J. Sep. Sci.* 2013, 36, 3896–3902
- [20] R. Mohamed, J.L. Campbell, J. Cooper-White, G. Dimeski and C. Punyadeera. The impact of saliva collection and processing methods on CRP, IgE, and Myoglobin immunoassays. *Clinical and Translational Medicine* 2012, 1:19
- [21] M. Moriarty, A. Lee, B. O'Connell, M. Lehane, H. Keeley, A. Fure. The Application and Validation of HybridSPE-Precipitation Cartridge Technology for the Rapid Clean-up of Serum Matrices (from Phospholipids) for the Clinical Analysis of Serotonin, Dopamine and Melatonin. *Chromatographia* (2012) 75:1257–1269 DOI 10.1007/s10337-012-2330-5
- [22] V. Pucci, S. Di Palma, A. Alfieri, F. Bonelli, E. Monteagudo. A novel strategy for reducing phospholipids-based matrix effect in LC-ESI-MS bioanalysis by means of HybridSPE. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 50 (2009) 867–871
- [23] S. J. Iverson, S. L. C. Lang, and M. H. Cooper. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch Methods for Total Lipid Determination in a Broad Range of Marine Tissue. *Lipids* 36, 1283–1287 (November 2001)
- [24] E. Cequier-Sanchez, C. Rodriguez, A.G. Ravelo, And R. Zarate. Dichloromethane as a Solvent for Lipid Extraction and Assessment of Lipid Classes and Fatty Acids from Samples of Different Natures. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 4297–4303
- [25] A. Hara and N. S. Radin. Lipid Extraction of Tissues with a Low-Toxicity Solvent. *Analytical Biochemistry* 90, 420-426 (1978)

- [26] C. Chiappe, F. D'Andrea. *Tecniche spettroscopiche e identificazione di composti organici*. (Edizioni ETS, Milano, 2005).
- [27] Sito web di Wikipedia. *Definizione di HPLC*.
<http://www.wikipedia.org/wiki/cromatografia_liquida_ad_alta_prestazione>.
Consultato: Novembre 2013.
- [28] *Shimadzu high performance liquid chromatograph, LC-2010 AHT/2010CHT*. Manuale di istruzioni, installazione e manutenzione dello strumento, Shimadzu; pp. 52-53.
- [29] *Columns & Supplies Catalogue*. Catalogo descrittivo sulle colonne cromatografiche, Macherey-Nagel; pp. 120-122.
- [30] *Decades of experience and innovation in chromatography; reversed phase HPLC*. Manuale sull'HPLC in fase inversa, Macherey-Nagel; pp. 28, 29.
- [31] Sito web Wikipedia. *Definizione dell'indice di rifrazione*.
<http://www.wikipedia.org/wiki/indice_di_rifrazione>. Consultato: Novembre 2013.
- [32] *Laboratory Product Guide*. Manuale Whatman®; pp.18.
- [33] Sito web per il test dell'Epa.
<<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1311.pdf>>. Consultato: Febbraio 2013
- [34] *Corning® and Costar® brand science products catalog*. Catalogo della Corning; pp. 107-109.
- [35] *Laboratory Product Guide*. Manuale Whatman®; pp.32-33.
- [36] Sito web della Sigma-Aldrich. *Certificato d'analisi dell'Ibuprofene sale sodico*.
<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/CertOfAnalysisPage.do?symbol=I1892&LotNo=038K0755&brandTest=FLUKA>>. Consultato: Aprile 2012.
- [37] Sito web della Sigma-Aldrich. *Certificato d'analisi dell'Ibuprofene sale sodico*.
<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/CertOfAnalysisPage.do?symbol=I1892&LotNo=BCBF3173V&brandTest=FLUKA>>. Consultato: Aprile 2012.
- [38] Sito web della Sigma-Aldrich. *Certificato d'analisi del Diclofenac sale sodico*.
<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/CertOfAnalysisPage.do?symbol=D6899&LotNo=BCBD6672V&brandTest=FLUKA>>. Consultato: Aprile 2012.
- [39] Medicamenta, parte monografica Vol. 4. (Cooperativa farmaceutica, Milano, 1994, settima edizione). Ibuprofene; pp. 1232-1235.
- [40] Medicamenta, parte monografica Vol. 4. (Cooperativa farmaceutica, Milano, 1994, settima edizione). Diclofenac sale sodico; pp.129-132.
- [41] Sito web della Buchi.
< http://www.buchi.it/fileadmin/upload_it/Assistente5.pdf>. Consultato: Novembre 2013
- [42] Lee, Tu and Wang, Yeh Wen. Initial Salt Screening Procedures for Manufacturing Ibuprofen. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 35(5), (2009); pp. 555-567

- [43] R. Censi, V. Martena, E. Hoti, L. Malaj, P. Di Martino. Sodium ibuprofen di-hydrate and anhydrous. Study of the dehydration and hydration mechanisms. *Journal of thermal analysis and calorimetry*, 111, (2013); pp. 2009-2018.
- [44] R.M. Silverstain, F.X. Webster, D.J. Kiemle. *Identificazione di composti organici*. (Casa editrice Ambrosiana, 2010, seconda edizione). Spettrometria infrarossa; pp. 83-109.
- [45] L.M. Oberoi, K.S. Alexander & A.T. Riga. Study of interaction between ibuprofen and nicotinamide using differential scanning calorimetry, spectroscopy, and microscopy and formulation of a fast-acting and possibly better ibuprofen suspension for osteoarthritis patients. *Journal of pharmaceutical sciences*, 94, (2005); pp. 93–101.
- [46] N.B. Colthup, L.H. Daly & S.E. Wiberley. *Carbonyl compounds*. In *Introduction to infrared and Raman spectroscopy*. 1990; 3rd ed., chap. 9; pp. 317–319.
- [47] R.M. Silverstain, F.X. Webster, D.J. Kiemle. *Identificazione di composti organici*. (Casa editrice Ambrosiana, 2010, seconda edizione). Spettrometria NMR protonica; pp. 198-177
- [48] *Decades of experience and innovation in chromatography; reversed phase HPLC*. Manuale sull'HPLC in fase inversa. Macherey-Nagel, pag.30.
- [49] Tecnico specializzato della Sigma-Aldrich. 05/07/2013; email.
- [50] Tecnico specializzato della Macherey-Nagel. 10/07/2013; email.
- [51] *Transgenomic® the power of discovery*. User guide for organic acids analysis column. Pag. 9 (3.3).
- [52] *Decades of experience and innovation in chromatography; reversed phase HPLC*. Manuale sull'HPLC in fase inversa. Macherey-Nagel, pag.21.
- [53] Assistenza del tecnico specializzato della Shimadzu. 14/06/2012; intervento personale allo strumento.
- [54] *Decades of experience and innovation in chromatography; reversed phase HPLC*. Manuale sull'HPLC in fase inversa. Macherey-Nagel, pp.36-37.
- [55] *Shimadzu high performance liquid chromatograph, LC-2010 AHT/2010CHT*. Manuale di istruzioni, installazione e manutenzione dello strumento, Shimadzu; pag. 62.
- [56] *Shimadzu high performance liquid chromatograph, LC-2010 AHT/2010CHT*. Manuale di istruzioni, installazione e manutenzione dello strumento, Shimadzu; pag. 33.
- [57] Sito web < http://www.laball.co.kr/uploads/Resistance_PEEK_Polymers.pdf > consultato il 22/07/2013.
- [58] A.P.Schellinger and P.W.Carr. *Aqueous–Organic Eluents for Reversed-Phase Liquid Chromatography*. June 2004; volume 22, numero 6, Pp.544 - 548.
- [59] H.A.Claessens, M.A. van Straten, J.J. Kirkland. *Effect of buffers on silica-based column stability in reversed-phase high-performance liquid chromatography*. *Journal of Chromatography A*. 1996, pp.259-270.

- [60] *Decades of experience and innovation in chromatography; reversed phase HPLC.* Manuale sull'HPLC in fase inversa. Macherey-Nagel, pag.40.
- [61] M. Ganesan, K. S. Rauthan, Y. Pandey and P. Tripathi *Determination Of Ibuprofen In Human Plasma With Minimal Sample Pretreatment.* IJPSR (2010), Vol. 1, Issue 5.
- [62] C. Arcelloni, R. Lanzi, S. Pedercini, G. Molteni, I. Fermo, A. Pontiroli, R. Paroni. High-performance liquid chromatographic determination of diclofenac in human plasma after solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B*, 763 (2001) 195–200.
- [63] S.M. Al-saidan *Transdermal self-permeation enhancement of ibuprofen.* *Journal of Controlled Release* 100 (2004) 199 – 209
- [64] P. R. Battu and MS Reddy. *RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Paracetamol and Ibuprofen in Tablets.* *Asian J. Research Chem.* 2(1): Jan.-March, 2009.
- [65] X. Yuan, A. C. Capomacchia. *Influence of Physicochemical Properties on the In Vitro Skin Permeation of the Enantiomers, Racemate, and Eutectics of Ibuprofen for Enhanced Transdermal Drug Delivery.* Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/jps.23548.
- [66] A. Dâas and O. Hamdaoui. *Removal of non-steroidal anti-inflammatory drugs ibuprofen and ketoprofen from water by emulsion liquid membrane.* *Environ Sci Pollut Res* DOI 10.1007/s11356-013-2140-9.