

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VALERIJA PEČKO

**MAGISTRSKA NALOGA**

**MAGISTRSKI ŠTUDIJ INDUSTRIJSKE FARMACIJE**

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VALERIJA PEČKO

**UPORABA MULTIVARIATNE ANALIZE ZA MODELIRANJE VPLIVA  
FIZIKALNIH LASTNOSTI POMOŽNIH SNOVI NA SPROŠČANJE MODELNE  
ZDRAVILNE UČINKOVINE IZ PELET**

**APPLICATION OF MULTIVARIATE ANALYSIS IN MODELLING THE  
EFFECTS OF EXCIPIENTS ON DISSOLUTION RELEASE OF MODEL ACTIVE  
INGREDIENT FROM PELETS**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2017

Magistrsko naložko sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc dr. Biljana Janković, mag. farm. Meritve sem izvaljala v laboratorijih na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko tehnologijo.

### **Zahvala**

*Za strokovno pomoč, nasvete in usmerjanje med eksperimentalnim delom ter za pomoč pri izdelavi magistrske naloge se zahvaljujem mentorici doc. dr. Biljana Janković, mag. farm. Za vso pomoč in nasvete pri eksperimentalnem delu ter za posredovanjo literaturo se zahvaljujem tudi Sari Vidovič. Tatjani Hrovatič se zahvaljujem za pomoč pri delu v laboratoriju.*

*Posebna zahvala gre mojim staršem, ki so me spodbujali med študijem, in prijateljem, ki so mi nudili podporo v času celotnega študija.*

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelala pod vodstvom mentorice doc. dr. Biljana Janković, mag. farm.

Valerija Pečko

**Predsednik komisije:** izr. prof. dr. Janez Illaš, mag. farm

**Član komisije:** izr. prof. dr. Mitja Kos, mag. farm

**Mentorica:** doc. dr. Biljana Janković, mag. farm

# KAZALO VSEBINE

POVZETEK .....	I
ABSTRACT .....	III
SEZNAM OKRAJŠAV .....	V
1. UVOD.....	1
1.1 PELETE .....	1
1.1.1 Definicija in uporaba .....	1
1.1.2 Izdelava pelet.....	1
1.1.3 Uporaba mikrokristalne celuloze (MCC) kot pomožne snovi v procesu iztiskanja in krogličenja.....	2
1.1.4 Razvoj z vgrajeno kakovostjo (QbD) na primeru pelet.....	3
1.2 Smernice PAT in QbD .....	4
1.3 MIKROKRISTALNA CELULOZA (MCC).....	6
1.3.1 Struktura in lastnosti .....	6
1.4 κ - KARAGENAN .....	7
1.4.1 Struktura .....	7
1.4.2 Lastnosti .....	7
1.4.3 Tvorba gela.....	8
1.5 MULTIVARIATNA ANALIZA (MVA) .....	9
1.5.1 Metoda glavnih komponent - PCA.....	9
1.5.2 Metoda delnih najmanjših kvadratov - PLS .....	10
1.5.3 Načini obdelave podatkov s PCA in PLS metodo .....	11
1.5.4 Omejitve MVA.....	15
2. NAMEN DELA .....	16
3. MATERIALI IN METODE .....	17
3.1 MATERIALI .....	17

3.1.1 MIKROKRISTALNA CELULOZA (MCC) .....	17
3.1.2 $\kappa$ – KARAGENANI .....	17
3.1.3 OSTALE UPORABLJENE KEMIKALIJE.....	17
3.2 NAPRAVE.....	18
3.3 METODE.....	18
3.3.1 Močljivost in določanje stičnega kota z metodo sedeče kapljice .....	18
3.3.2 Določanje velikosti delcev z metodo laserske difrakcije (LD) .....	19
3.3.3 Merjenje reoloških lastnosti $\kappa$ – karagenanov .....	22
3.3.4 Statistična metoda - Multivariatna analiza.....	25
4. EKSPERIMENTALNI DEL .....	26
4.1 Razvoj MVA modela .....	26
4.2 Priprava vzorcev $\kappa$ – karagenanov in MCC ter določanje stičnega kota z metodo sedeče kapljice .....	28
4.3 Vrednotenje porazdelitve velikosti delcev $\kappa$ – karagenanov in MCC z LD .....	29
4.4 Reološko vrednotenje gelov $\kappa$ – karagenanov .....	29
4.4.1 Priprava medija za raztpljanje (disolucijski medij).....	29
4.4.2 Priprava $\kappa$ – karagenanov za določitev reoloških lastnosti .....	30
4.4.3 Izvajanje meritev na reometru Anton Paar Physica MCR 301 .....	30
5. REZULTATI IN RAZPRAVA .....	33
6. SKLEP .....	41
7. LITERATURA .....	42
Priloga I: Rezultati meritev na vzorcih $\kappa$ - karagenanov.....	VI
Priloga II: Rezultati meritev na vzorcih MCC .....	VII

# SLIKE

Slika 1: Ribji diagram z navedenimi potencialnimi faktorji na CQA pelet (8).....	4
Slika 2: Struktura MCC z označeno kristalinično in parakristalinično regijo (14) .....	6
Slika 3: Empirična formula $\kappa$ – karagenana (16).....	7
Slika 4: Nastanek 3,6-anhidrogalaktoze $\kappa$ – karagenana (a) in osnovni mehanizem nastanka gela $\kappa$ – karagenana in $\iota$ – karagenana (b) (15).....	8
Slika 5: Shematski prikaz PCA metode (10).....	10
Slika 6: Raztresen točkovni grafikon (6a), stolpčni grafikon (6b) (20).....	12
Slika 7: Raztreseni grafikon korelacijske klasifikacije podatkov (20).....	13
Slika 8: Hotelling's $T^2$ graf z obema limitama (8a) in graf opazovano proti napovedano (8b) (20).....	13
Slika 9: Naprava za merjenje stičnega kota, Drop Shape Analysis System DSA 100 Contact Angle Meter KRUSS.....	18
Slika 10: Ravnovesje sil, katerim je izpostavljena kapljica tekočine po nanosu na trdno površino (25). .....	19
Slika 11: Zgradba laserskega difraktometra Malvern instruments Mastersizer S. ....	20
Slika 12: Prikaz optične enote LD.....	21
Slika 13: Podatki iz Software Malvern Instruments (a) in pomen vrednosti $D_{10}$ , $D_{50}$ in $D_{90}$ (b). .....	22
Slika 14: Reometer Anton Paar Physica MCR 301 s senzorskim sistemom CP50-2. ....	23
Slika 15: Vsota $G'$ in $G''$ v kompleksni ravnini je $G^*$ . Naklon vektorja pa določa $\delta$ .....	24
Slika 16: Proučevane fizikalno-kemijske lastnosti na vseh vstopajočih materialih v modelno formulacijo. .....	26
Slika 17: Stopnje proizvodnega procesa s parametri, ki smo jih spremajali.....	27
Slika 18: Shematičen prikaz ročne hidravlične stiskalnice Graseby Specac.....	28
Slika 19: Uporabljene kemikalije za pripravo disolucijskega medija. ....	29
Slika 20: Prikaz $\kappa$ –karagenanov tipa GELCARIN GP-812 (K3), $\kappa$ – karagenana proizvajalca CARGIL (CAR1) in tipa GELCARIN GP-911 (K911) v 2% raztopini. ....	30
Slika 21: Senzorski sistem CP50-2.....	31
Slika 22: Slika prikazuje odvisnost dinamičnih količin $G'$ in $G''$ od $\gamma$ .....	32
Slika 23: Slika prikazuje odvisnost dinamičnih količin $G'$ in $G''$ od $\omega$ .....	32

Slika 24: Povzetek napovedi modela za hitrost sproščanja modelne zdravilne učinkovine z upoštevanjem procesnih in formulacijskih spremenljivk ( $R^2=0.673$ ; $Q^2=0.632$ ) .....	33
Slika 25: Graf koeficientov vpliva posameznih procesnih in formulacijskih spremenljivk na proučevani odziv - hitrost sproščanja ZU.....	34
Slika 26: Graf opazovanega in napovedanega odziva za hitrost raztplavljanja modelne ZU v 45 minut. Rdeča barva opisuje serije s hitrejšim raztplavljanjem, modra pa s počasnim. ....	38
Slika 27: Graf opazovanega in napovedanega odziva za hitrost raztplavljanja modelne ZU v 45 minut. Rdeča barva opisuje serije s počasnejšim raztplavljanjem, v katere je vstopal $\kappa$ – karagenan z najvišjo hitrostjo pronica vode (najhitrejše geliranje). .....	39
Slika 28: Kritične lastnosti surovin (CMA), ki smo jih definirali s pomočjo MVA modela. CMA smo označili z rdečo na ribjih diagramih. .....	40
Slika 29: Kritični procesni parametri (CPP) ki smo jih definirali s pomočjo MVA modela. CPP smo označili z rdečo na ribjih diagramih. .....	40

## PREGLEDNICE

Preglednica I: Prednosti in pomanjkljivosti metode MVA (9).....	15
Preglednica II: Fizikalno-kemijske lastnosti MCC (23).....	17
Preglednica III: Razlike med uporabljenimi κ – karagenani (24, 25). .....	17
Preglednica IV: Definirane dinamične količine (33).....	24

## POVZETEK

Pri razvoju izdelkov z vgrajeno kakovostjo (ang. *Quality by design, QbD*) je pomembno, da tekom procesa ugotovimo kritične procesne parametre (ang. *critical process parameters, CPP*) in kritične lastnosti materiala (ang. *critical material attributes, CMA*), ki vplivajo na kritične lastnosti produkta (ang. *critical quality attributes, CQA*). Na ta način zagotavljamo povezavo med bolniki, izdelkom in formulacijo/procesom, ki temelji na znanstveni osnovi. Kot osnovno QbD orodje za raziskavo vplivov procesnih in formulacijskih spremenljivk na CQA smo uporabili statistično metodo, multivariatno analizo (MVA).

Namen magistrske naloge je bil določitev vpliva fizikalno-kemijskih lastnosti materialov ( $\kappa$  – karagenan, mikrokristalna celuloza, lakoza monohidrat), ki vstopajo v izdelek (obložene pelete s takojšnjim sproščanjem) ter procesnih parametrov na kritično lastnost izdelka (hitrost sproščanja ZU iz pelet) s pomočjo MVA. V ta namen smo različnim serijam  $\kappa$  – karagenanov določili velikost delcev z lasersko difrakcijo (LD), močljivost z merilnikom stičnega kota in reološke lastnosti s pomočjo rotacijskega viskozimetra. Pri proučevanju MCC pa smo se osredotočili na vrednotenje velikosti delcev in močljivost.

Multivariatni model smo razvili s pomočjo programa SIMCA P+ 14.0. Za izgradnjo modela smo uporabili 117 spremenljivk (formulacijske in procesne spremenljivke). Na osnovi rezultatov smo ugotovili, da na hitrost sproščanja modelne ZU vpliva 15 procesnih in formulacijskih parametrov. Odziv smo opisali s prvo glavno komponento in podali napovedno moč modela z  $R^2 = 0.673$ , ki opisuje prileganja modela in z napovedjo modela  $Q^2 = 0.632$ , s čimer smo potrdili ustrezno napovedno moč modela.

Definirali smo CMA in CPP s pozitivnim in negativnim vplivom na hitrost sproščanja ZU. Negativno na hitrost sproščanja ZU vpliva velikost delcev  $\kappa$  – karagenana, MCC in lakoze, hitrost pronicanja vode v  $\kappa$  – karagenanih, izguba pri sušenju MCC in viskoznost  $\kappa$  – karagenana. Navor pri granulaciji, molekulska masa  $\kappa$  – karagenana, izguba pri sušenju  $\kappa$  – karagenana, hitrost pronicanja vode v MCC in % premajhnih pelet, so lastnosti s pozitivnim vplivom na hitrost sproščanja ZU. Na primer: pri proučevanju vpliva viskoznosti smo ugotovili, da višja viskoznost  $\kappa$  – karagenana vpliva na nastanek bolj togega gela, iz katerega se modelna ZU počasnejše razaplja. Za izboljšanje modela bi bilo

potrebno model dopolniti z dodatnimi fizikalno-kemijskimi lastnosti in ovrednotiti, ali so te kritične za hitrost raztpljanja. Prav tako bi bilo potrebno dodatno raziskati lastnosti modelne ZU, ki vstopa v formulacijo.

Ključne besede: *multivariatna analiza, razvoj izdelkov z vgrajeno kakovostjo, mikrokristalna celuloza,  $\kappa$ -karagenan, pelete.*

## ABSTRACT

In Quality by Design (QbD) development, it is important to define critical process parameters (CPP) and critical material attributes (CMA) that have impact on CQA to ensure compliance between patient, product and formulation/process based on scientific approach. As basic QBD tool to research influence of process and formulation variables on CQA we used statistical method multivariate analysis (MVA).

The main aim of the master thesis was to determine the influence of the physicochemical properties of the materials ( $\kappa$ -carrageenan, microcrystalline cellulose, lactose monohydrate) entering the product (coated pellets with immediate release) and the process parameters on the critical quality attribute (CQA) (The Active Pharmaceutical Ingredient (API) release rate) by using MVA. For this purpose, on various series of  $\kappa$  - carrageenans we measured the particle size with laser diffraction (LD), wettability with the contact angle meter and rheological properties with a rotary viscometer. In studying the MCC, we focused on the evaluation of particle size and wettability.

The multivariate model was developed using the SIMCA P + 14.0 program. 117 variables (formulation and process variables) were used to build the model. Based on the results, we found out that the model API release rate is influenced by 15 process and formulation parameters. We described the response with the first principal component and presented the predictive power of the model with a value of  $R^2 = 0.673$ , which describes the fit of the model and with the  $Q^2 = 0.632$  which describes predicted variance and confirms corresponding predictive power.

We defined CMA and CPP with a positive and negative effect on the API release rate. Properties with negative impact on API release rate are: the particle size of  $\kappa$  - carrageenan, MCC and lactose, water penetration rate in  $\kappa$  - carrageenan, loss on drying MCC and viscosity of  $\kappa$  - carrageenan. Impeller torque, molecular mass of  $\kappa$  - carrageenan, loss on drying of  $\kappa$  - carrageenan, water penetration rate in MCC and % of too small pellets are properties with a positive effect on the API release rate. For example, in studying the effect of viscosity, we found that higher viscosity of  $\kappa$ -carrageenan affects the formation of a more rigid gel from which the model API dissolves more slowly. To improve the model, the model should be supplemented with additional physicochemical properties and

evaluated whether these are critical for the dissolution rate. Further investigations are required to analyse the properties of the model API entering the formulation.

Key words: *Multivariate analysis, Quality by Design, microcrystalline cellulose,  $\kappa$  – carageenans, pellets.*

## SEZNAM OKRAJŠAV

ZU	Zdravilna učinkovina
MCC	Mikrokristalna celuloza
$\kappa$ – karagenan	Kapa karagenan
HPMC	Hidroksipropilmetil celuloza
PVP	Polvinilpirolidon
QbD	Razvoj izdelkov z vgrajeno kakovostjo (ang. <b>Quality by Design</b> )
DoE	Faktorska analiza eksperimentov (ang. <b>Design of Experiments</b> )
OTPP	Ciljni kakovostni profil izdelka (ang. <b>Quality Target Product Profile</b> )
CQA	Kritične lastnosti izdelka (ang. <b>Critical Quality Attributes</b> )
CMA	Kritične lastnosti materiala (ang. <b>Critical Material Attributes</b> )
CPP	Kritični procesni parametri (ang. <b>Critical Process Parameters</b> )
FDA	Ameriški vladni urad za zdravila in prehrano (ang. <b>Food and Drug Administration</b> )
PAT	Procesno analitična tehnologija (ang. <b>Process Analytical Technology</b> )
MVA	Multivariatna analiza (ang. <b>Multivariate Analysis</b> )
PCA	Metoda glavnih komponent (ang. <b>Principal Component Analysis</b> )
PLS	Metoda delnih najmanjših kvadratov (ang. <b>Partial Least Square</b> )
PC	Glavna komponenta (ang. <b>Principal Component</b> )
R2	Koeficient korelacije
Q2	Napoved modela
LD	Laserska difrakcija (ang. <b>Laser Diffraction</b> )
CSS	Nastavljena strižna napetost (ang. <b>Controlled Shear Stress</b> )

# 1. UVOD

## 1.1 PELETE

### 1.1.1 Definicija in uporaba

Pelete so majhni, dobro pretočni okrogli delci z gladko površino, nizko krušljivostjo in visoko gostoto. Pelete imajo ozko porazdelitev velikosti, ustrezeno trdnost in majhno poroznost. Večinoma je velikost pelet med 0,5 in 2 mm (1, 2, 3). Pelete velikokrat obložijo s polimeri in jih polnijo v trdne želatinaste kapsule (4) ali stiskajo v tablete, zaradi česar lahko pelete uvrstimo v večenotne farmacevtske oblike (5).

Pelete imajo številne terapevtske in tehnološke prednosti (5). Med tehnološke prednosti prištevamo dobre pretočne lastnosti, ki omogočajo ponovljivost polnjenja, s čimer dosežemo enakomernost vsebnosti (2). Gladka površina, okrogla oblika, ozka porazdelitev velikost in nizka krušljivost omogočajo, da so pelete primerne za filmsko oblaganje in kapsuliranje (1, 2). Pelete omogočajo združevanje različnih zdravilnih učinkovin (ZU), inkompatibilnih ZU in ZU z različnim profilom sproščanja (2). Terapevtske prednosti pelet se kažejo v doseganju manjšega koncentracijskega in časovnega nihanje maksimalne plazemske koncentracije ZU. S tem zagotovimo manjšo možnost lokalnega povišanja koncentracije ZU, zmanjšamo draženje želodčne sluznice in povečamo absorpcijo (2, 5). S peletami prav tako zmanjšamo verjetnost prehitrega sproščanje dela odmerka ZU (ang. *dose-dumping*). Glavna pomanjkljivost se kaže pri izdelavi pelet, ki je tehnično zahtevnejša, dražja in časovno potratna (5).

### 1.1.2 Izdelava pelet

Poznamo številne tehnološke postopke za izdelavo pelet (2):

- iztiskanje in krogličenje.
- Izdelava peletnih jeder z uporabo rotorske tehnologije.
- Oblaganje nevtralnih peletnih jeder z raztopinami ali disperzijami.

### **1.1.3 Uporaba mikrokristalne celuloze (MCC) kot pomožne snovi v procesu iztiskanja in krogličenja**

MCC je zelo pogosto uporabljena pomožna snov v procesih direktnega stiskanja, vlažne granulacije (6) in pri izdelavi pelet z metodo iztiskanja in krogličenja (7). Ker ima MCC značilno specifično površino in visoko poroznost lahko absorbira velike količine vode in omogoča tvorbo plastičnega granulata, ki je predpogoj za ustreznost procesa iztiskanja in krogličenja (7). Pelete narejene iz MCC so sferične in gladke površine, z visoko gostoto, nizko krušljivostjo, z ozko porazdelitvijo velikosti delcev (2). Poznana sta dva procesa, ki opisujeta obnašanje MCC v procesu iztiskanja in krogličenja (2):

#### *a) Model »molekularne gobe«*

Delci MCC so spodbjni zadržati vodo na podoben način kot goba. Med procesom iztiskanja se iz gobe iztisne voda, ki ima funkcijo drsila. Po iztiskanju se gobi volumen poveča, goba postane bolj krhka in suha, kar olajša lomljenje ekstrudatov v začetni fazi krogličenja. Med procesom krogličenja se gobe zaradi trkov med delci, z vrtečo se ploščo in z obodom sferonizatorja zgostijo, voda se pomika proti površini nastajajoče pelete in omogoča dodatno plastičnost, kar olajša krogličenja pelet (2).

#### *b) Kristalinični – gel model*

Delci MCC se z vodo med granuliranjem in iztiskanjem lomijo na manjše delce. Nastali porozni in kristalinični delci tvorijo koherentno gelsko mrežo, kjer je visok delež netopne trdne faze. V to mrežo se ujame granulirana tekočina. Ko MCC dodamo določeno količino granularne tekočine, dobimo trdno gel strukturo, ki omogoča proces iztiskanja in krogličenja (2).

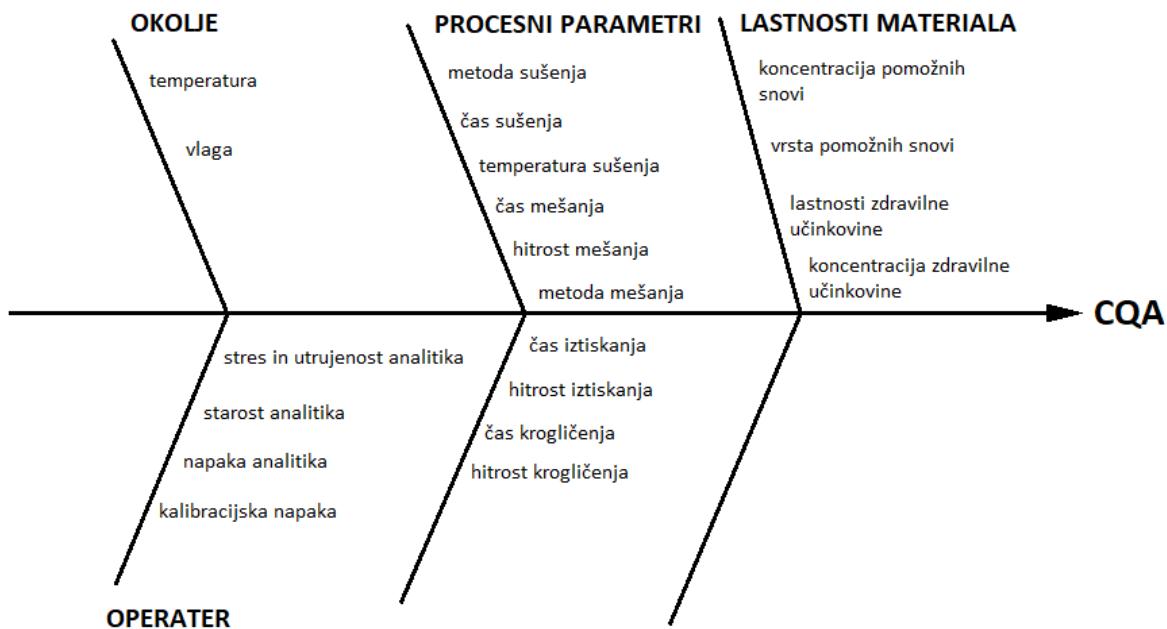
Kljub številnim prednostim MCC pri procesu iztiskanja in krogličenja, pa ima MCC tudi nekatere omejitve, kot na primer: podaljšanje sproščanja slabo topnih ZU (več MCC pomeni počasnejše sproščanje) (2). Alternativno MCC lahko uporabimo hitosan, κ – karagenane, HPMC, premrežen PVP, pektinsko kislino, polietilen oksid in nekatere derivate škroba. V literaturi lahko najdemo podatke o uporabi zgoraj naštetih pomožnih snovi v kombinaciji z MCC (2).

#### **1.1.4 Razvoj z vgrajeno kakovostjo (QbD) na primeru pelet**

Najpogostejsa in najučinkovitejsa metoda za izdelavo pelet je metoda iztiskanja in krogličenja. Prednost tega procesa je izdelava pelet majhnih velikosti z visoko vsebnostjo ZU, hkrati pa ne potrebujemo velikih količin pomožnih snovi (4). Glavni koraki tega večstopenjskega procesa so (4):

- suho mešanje prahov in pomožnih snovi.
- Vlažna granulacija za nastanek plastične mokre mase z dodatkom ustreznih veziv.
- Iztiskanje (ekstruzija) mokrega granulata in tvorba delcev cilindrične oblike.
- Krogličenje cilindričnih delcev do nastanka sferičnih delcev.
- Sušenje dobljenih pelet do željene vsebnosti vlage.

Na proces iztiskanja in krogličenja vplivajo številni faktorji, kot so: čas in hitrost mešanja, vrsta in količina veziva, hitrost iztiskanja, čas in hitrost krogličenja, način in hitrost sušenja. QbD pristop vključuje oceno tveganja in faktorsko analizo načrtov (ang. *Design of Experiments, DoE*) za pridobivanje pelet iz procesa iztiskanja in krogličenja. Ciljni kakovostni profil izdelka (ang. QTTP: *Quality target product profile*) in kritične lastnosti izdelka (ang. CQA: *Critical quality attributes*) so definirane na podlagi literature in preliminarnih študij. OTPP temelji na poznavanju lastnosti učinkovine oziroma vrednotenju referenčnega izdelka na trgu (farmacevtska oblika, način administracije zdravila, odmerek, dimenzijski pelet, razpadnost ipd.). CQA pelet so sproščanje ZU v 15 minutah, sferičnost, krušljivost in izkoristek. Faktorji, ki vplivajo na CQA in s tem na kakovost pelet, so razdeljeni v štiri skupine (vpliv okolja, vpliv operaterja, procesni parametri in lastnosti materiala) (Slika 1). Nato se izvede ocena tveganja za identifikacijo potencialnih kritičnih faktorjev (kritičnih lastnosti materiala, ang. *Critical material attributes, CMA* in kritičnih procesnih parametrov, ang. *Critical process parameters, CPP*). Kritični faktorji pri izdelavi pelet z iztiskanjem in krogličenje so: hitrost krogličenja, koncentracija razgrajevala, metoda sušenja, koncentracija močljivca, čas krogličenja, hitrost iztiskanja in koncentracija sotopila. Hitrost iztiskanja in čas krogličenja imata vpliv na izkoristek procesa in hitrost krogličenja vpliva na sferičnost pelet (8).



Slika 1: Ribji diagram z navedenimi potencialnimi faktorji na CQA pelet (8).

## 1.2 Smernice PAT in QbD

Leta 2002 je FDA izdal priporočilo za uporabo procesne analitske tehnologije (ang. *Process Analytical Technology, PAT*) pri razvoju novih izdelkov s ciljem izboljšanja kakovosti produkta in procesa v farmacevtski industriji (9, 10). FDA definira PAT kot sistem za načrtovanje, analiziranje in kontroliranje proizvodnega procesa s pomočjo časovno reguliranih meritev (ang. *in-line*) kritičnih kakovostnih in proizvodnih lastnosti materialov, ki vstopajo v proces, z namenom zagotavljanja ustrezne kakovosti izdelka. Glavno načelo PAT je, da kakovost ne more biti testirana na izdelku, ampak mora biti vgrajena v izdelek (ang. *Quality - by – Design, QbD*) (9). QbD je sistematični razvoj izdelka, ki temelji na vnaprej definiranih ciljih s poudarkom na razumevanju procesa in produkta ter definiranju kontrolne strategije (ang. *Science based approach*). Z vgrajeno kakovostjo gradimo povezavo med bolniki, izdelkom in formulacijo/procesom, ki temelji na znanstveni osnovi. Načela QbD so opisana v ICH Q8 (R2) smernicah: »Smernice za farmacevtski razvoj« (8).

Celotna QbD študija mora minimalno vključevati naslednje ključne elemente (8, 11):

- definiran ciljni kakovostni profil izdelka (ang. *Quality target product profile, Q TPP*).
- Identificirane kritične lastnosti izdelka (ang. *Critical quality attributes, CQA*). CQA je fizikalna, kemijska, mikrobiološka ali druga lastnost izdelka, ki mora imeti definirano specifikacijo (mejne vrednosti) in definira kakovost izdelka. CQA so npr.: vsebnost, enakomernost vsebnosti, razkrojni produkti, hitrost raztplavljanja. CQA lahko kontroliramo s kritično lastnostjo vstopnega materiala (ang. *Critical material attributes, CMA*) ali s (ang. *Critical process parameters, CPP*).
- Identificirane CPP.
- Identificirane CMA.
- Definirana mora biti kontrolna strategija.
- Definirana analiza tveganja za kakovost izdelka (ang. *Quality Risk management*).

Osnovna QbD orodja za raziskavo vplivov procesnih in formulacijskih spremenljivk na CQA so naslednji (11):

- statistične metode, kot sta faktorska analiza načrtov (ang. *Design of Experiments, DoE*) ter multivariatna analiza (ang. *Multivariate Analysis, MVA*).
- Analiza prostorskega načrta (ang. *Design space*): večdimensionalne kombinacije in interakcije CMA in CPP, ki preverjeno zagotavljajo ustrezeno kakovost izdelka. Spremembe na procesu oziroma surovinah, ki so ovrednotene v »prostorskem načrtu«, niso del regulatornih sprememb.
- PAT: Časovne meritve med procesom kritičnih lastnosti surovin ali medprocesnih CQA, ki zagotavljajo proizvodnjo kakovostnega izdelka.

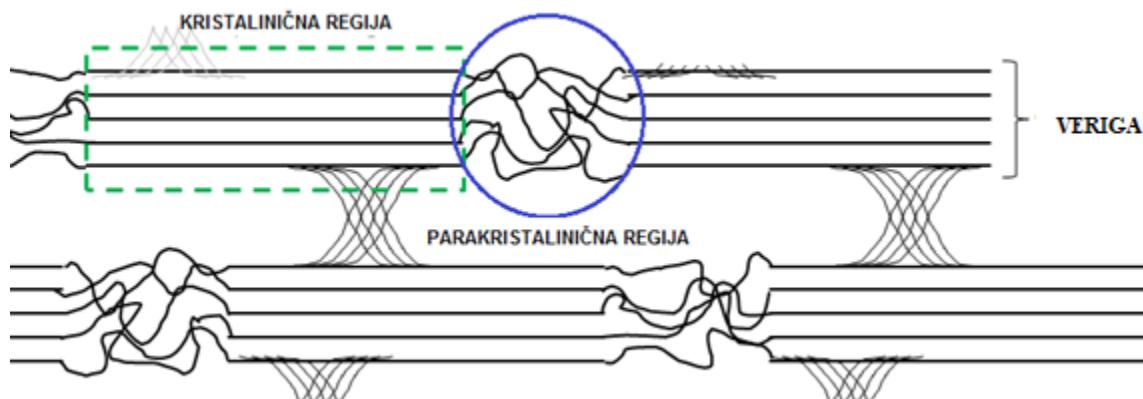
## 1.3 MIKROKRISTALNA CELULOZA (MCC)

### 1.3.1 Struktura in lastnosti

MCC je ena izmed najpogosteje uporabljenih pomožnih snovi v farmacevtski industriji (6). Je brez vonja in okusa, sestavljena iz poroznih delno kristaliziranih delcev (6) in ima relativno visoko specifično površino ter se plastično deformira (12).

Je prečiščena in delno depolimerizirana celuloza, ki jo pridobivamo iz  $\alpha$ -celuloze s kislinsko hidrolizo iz pulpe vlaknastega rastlinskega materiala. Celulozna vlakna so sestavljena iz verig, v katerih najdemo parakristalinične regije (amorfni in fleksibilni deli celuloznih verig) in kristalinične regije (rigidne in linearne celulozne verige) (Slika 2). S kontrolirano hidrolizo odstranimo večino amorfnih regij in s čiščenjem dobimo suhe in porozne mikrokristale. S kontroliranjem proizvodnega procesa in izbiro metode sušenja vplivamo na porazdelitev velikosti delcev (6).

Glede na monografijo MCC iz Ph.Eur. 8 sta potencialni s funkcionalnostjo povezani značilnosti (ang. *functionality related characteristics, FRC*) porazdelitev velikosti delcev (ang. *particle size distribution, PSD*) in pretočnost (13).

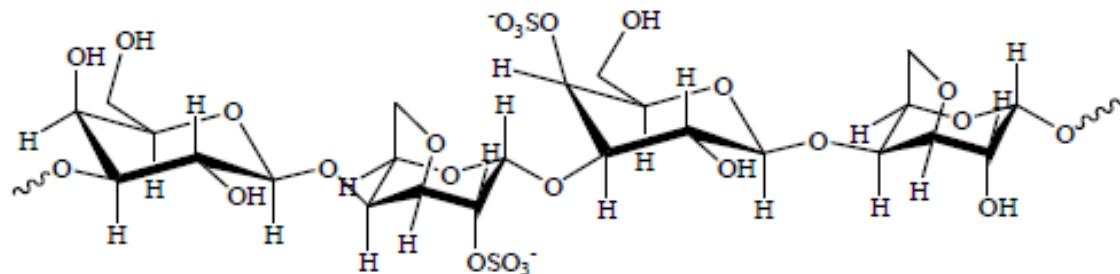


Slika 2: Struktura MCC z označeno kristalinično in parakristalinično regijo (14).

## 1.4 $\kappa$ – KARAGENAN

### 1.4.1 Struktura

$\kappa$  – karagenani so naravni, hidrofilni polisaharidi. So linearne molekule z visoko molekulsko maso (100.000–500.000 g/mol) in z delno sulfatiranim galaktoznim osnovnim skeletom. Sestavljeni so iz povezanih ponavljajočih se sulfatiranih galaktoznih enot in nesulfatiranih 3,6 – anhidrogalaktoznih enot, ki so združene s ponavljajočih se  $\alpha$ -(1-3) in  $\beta$  (1-4) glikozidnimi vezmi (15). Sulfatni ester je vezan na mestu 4 na molekuli glukoze in je lahko združen s kalijevimi, natrijevimi, kalcijevimi, magnezijevimi in amonijevimi ioni (Slika 3) (1). Pridobljeni so iz različnih vrst rdečih alg razreda Rhodophyceae. Komercialno dostopni karagenani so pridobljeni iz vrst Chondrus Crispus (irski mah), Eucheuma Cottonii, Eucheuma Spinosum in Gigartina Radula. Najbolj znani so  $\kappa$  – karagenan,  $\iota$  – karagenan in  $\lambda$  – karagenan, ki se med seboj razlikujejo po številu sulfatnih skupin, npr.  $\kappa$  – karagenan vsebuje 18–25 % (w/w) sulfatnih estrov in 34 % (w/w) 3,6 – anhidrogalaktoznih enot (15).



Slika 3: Empirična formula  $\kappa$  – karagenana (16).

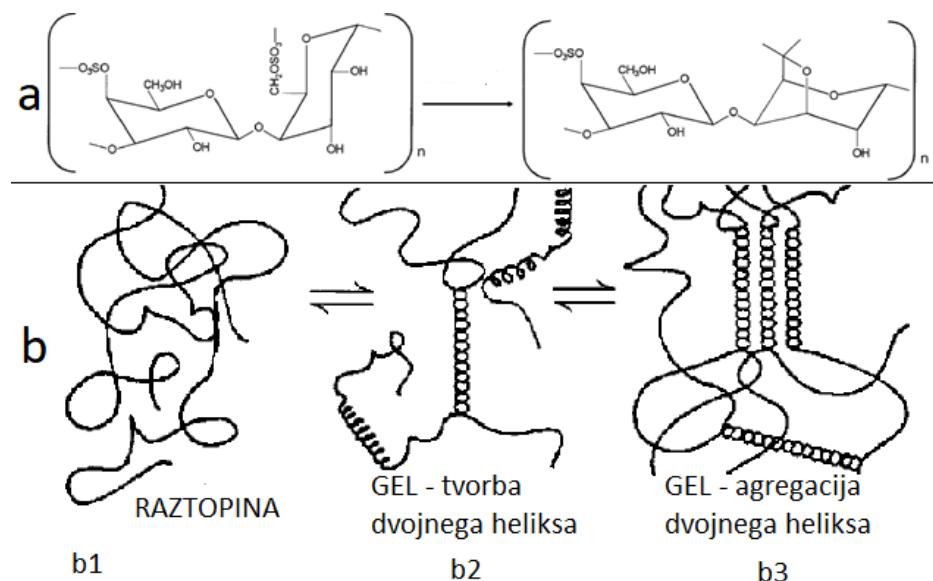
### 1.4.2 Lastnosti

$\kappa$  – karagenan je topen v vroči vodi, natrijeve soli  $\kappa$  – karagenanov pa tudi v mrzli vodi. Kalijeve in kalcijeve soli  $\kappa$  – karagenanov se v vodi ne razapljujo ampak nabrekajo. Nabrekanje je odvisno od vrste in količine kationov in od gostote delcev. Karagenani so kompatibilni s topili, ki se mešajo z vodo (npr.: alkohol, propilenglikol, glicerin). V organskih topilih so karagenani netopni (15). Viskoznost raztopin karagenanov je odvisna od koncentracije, temperature, prisotnosti drugih topljencev, vrste karagenana in od molske mase. Viskoznost eksponentno narašča s povečevanjem koncentracije ali s povečevanjem molske mase. Z ohlajanjem vroče

raztopine karagenana se viskoznost postopoma povečuje, vse do temperature geliranja. Ko je ta temperatura dosežena, pride do nenadnega in znatnega povečanja viskoznosti (17). Raztopine karagenanov izkazujejo psevdoplastične in viskoelastične lastnosti. Pod obremenitvijo suhe snovi se karagenani plastično deformirajo, hkrati pa izkazujejo visoko elastično relaksacijo. Najpogosteje se uporabljam za tabletiranje snovi občutljivih na povišan tlak stiskanja (ang. *soft tabletting*) ali kot sredstvo za krogličenje (18).

### 1.4.3 Tvorba gela

Nastanek gela omogočajo 6,3 – anhidrogalaktozne enote z reorganizacijo molekul karagenana iz naključne strukture v dvojno vijačnico.  $\kappa$  – karagenani tvorijo najmočnejše gele s kalijevimi ioni. Kalijevi ioni nevtralizirajo sulfatno skupino v molekulah  $\kappa$  – karagenana, s tem pride do pretvorbe 6-sulfatne skupine v bolj linearne molekule; 3,6 – anhidrogalaktozo, kar omogoča nastanek dvojne vijačnice (Slika 4a) (15). Z ohlajanjem vzpostavimo trodimenzionalno polimerno mrežo, v kateri dvojne vijačnice predstavljajo stična območja polimernih verig (Slika 4b2). Nadaljnje ohljanje povzroči agregacijo stičnih območij, s čimer nastane trodimenzionalna struktura gela (Slika 4b3) (17).



Slika 4: Nastanek 3,6-anhidrogalaktoze  $\kappa$  – karagenana (a) in osnovni mehanizem nastanka gela  $\kappa$  – karagenana in  $\iota$  – karagenana (b) (15).

Agregirane kristalinične regije lomijo svetlobo, zato je gel rahlo moten. Čez čas se gel »zakrči« in pride do destabilizacije vode in do iztiska le-te iz gela, kar imenujemo sinereza. Ta pojav poveča trdnost gela (15). Geli, ki se tvorijo, so termoreverzibilni, ob segrevanju nad temperaturo taljenja postanejo tekoči, ob ohlajanju pa ponovno preidejo v gel z ohranjenimi mehanskimi lastnostmi (18).

## 1.5 MULTIVARIATNA ANALIZA (MVA)

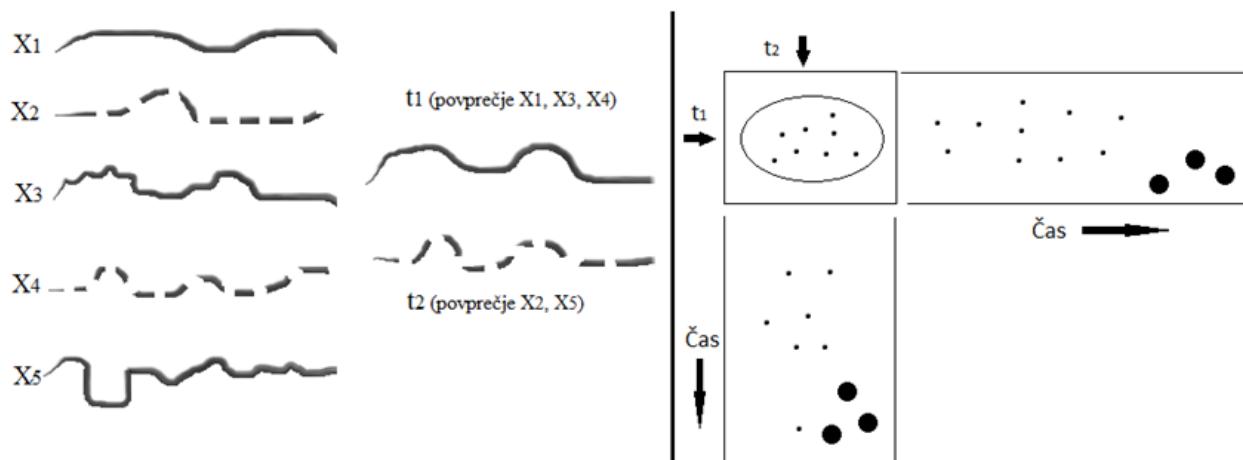
MVA je komplet statističnih tehnik za sistematično vrednotenje vpliva večjega števila spremenljivk (od 10 do 1000) z namenom razumevanja povezav, ki obstajajo med njimi. MVA obsega številne metode za analiziranje podatkov, med katerimi sta najpomembnejši: metoda glavnih komponent (ang. *Principal component analysis, PCA*) in metoda delnih najmanjših kvadratov (ang. *Partial least squares regression, PLS*) (9).

### 1.5.1 Metoda glavnih komponent - PCA

PCA je matematičen postopek, katerega glavni namen je zmanjšanje števila spremenljivk in vzpostavitev novih faktorjev, ki jih imenujemo glavne komponente (ang. *Principal Components, PC*) (9).

Slika 5 je shematski prikaz PCA metode. Predpostavimo, da imamo meritve zajete iz petih spremenljivk iz neprekinjenega procesa skozi določeno časovno obdobje. Predpostavimo, da so spremenljivke  $x_1$ ,  $x_3$  in  $x_4$  med seboj povezane, prav tako pa sta spremenljivki  $x_2$  in  $x_5$  med seboj povezani. Komponente (faktorji) so izračunane s pomočjo MVA z uporabo metode PCA. Prva glavna komponenta ( $t_1$ ) je povprečje  $x_1$ ,  $x_3$  in  $x_4$ , druga glavna komponenta ( $t_2$ ) pa je povprečje spremenljivk  $x_2$  in  $x_5$ . S pomočjo PCA klasificiramo glavne dogodke, ki vplivajo na odziv (npr. proces, CQA) (10). Komponente so urejene po pomembnosti (od najpomembnejše do najmanj pomembne), kjer pomembnost pomeni, da prva glavna komponenta pojasnjuje največ razpršenosti osnovnih podatkov oziroma opisuje vpliv največjega števila faktorjev na odziv (10). Glavni komponenti  $t_1$  in  $t_2$  uporabljata povezanost vseh petih spremenljivk in ločujeta proces na dva pravokotna dogodka. Grafično lahko ti glavni komponenti prikažemo drugo proti drugi in pretvorimo sistem petih spremenljivk v dvodimenzionalno ravnino. Zato lahko metodo PCA prištevamo med projekcijske metode. Vsaka točka na ravnini povzema obnašanje vseh petih

spremenljivk. Kadar je proces stabilen, so točke znotraj kontrolne meje (3 sigma razpršenost). V primeru izrednih dogodkov, so vrednosti faktorjev izven 3 sigma meje oziroma elipse (10). V primeru evalvacije proizvodnih procesov (npr. tabletiranje, granulacija, oblaganje) PCA metoda služi za ugotovitve značilnih vzorcev podatkov v časovnem zaporedju, kot so premiki (ang. *shift*), oscilacije, trendi, izredni dogodki (ang. *outlier*) in združevanje podatkov (ang. *clustering*) (9).



Slika 5: Shematski prikaz PCA metode (10).

### 1.5.2 Metoda delnih najmanjših kvadratov - PLS

PLS je tehnika, ki se uporablja za iskanje povezave med dvema sklopoma podatkov (običajno med neodvisno spremenljivko X in odvisno spremenljivko Y). Podatki, ki jih vključimo kot X spremenljivke, ne smejo biti v medsebojni korelaciji. Namen metode je poiskati faktorje, ki imajo najvišjo stopnjo korelacije z poučevanim odzivom (9). Prednost te metode je, da izvaja modeliranje na obeh sklopih podatkov (X, Y). Z določitvijo posameznih faktorjev postaja razlika med dejansko in napovedano kvantitativno vrednostjo vse manjša (zmanjšajo se reziduali, in se poveča napoved modela - Q<sub>2</sub>). Na osnovi korelacije med proučevanimi spremenljivkami in odzivi, se le-ti razvrstijo po stopnji vpliva (višina variacija za vsak posamezni faktor – ang. *Coefficients plot*) (19).

Za definiranje kakovosti (R<sub>2</sub>) in napovedi modela (Q<sub>2</sub>) izberemo le spremenljivke s statistično značilnim vplivom (odziv je večji kot razpršenost). V primeru nezadostnega števila spremenljivk bo kalibracija zajela premalo podatkov in zato je napoved napake večja. V primeru opisa

variabilnosti sistema s prevelikim številom spremenljivk (ang. *overfitting*) se model preveč prilega kalibracijskim podatkom in je nediskriminatoren (19).

Optimalno število faktorjev določimo s pomočjo notranje validacije (navzkrižne validacije), ki zaporedno odstranjuje podatke iz podatkovnih baz in računa model iz preostalih vzorcev, iz katerega poda napoved (9).

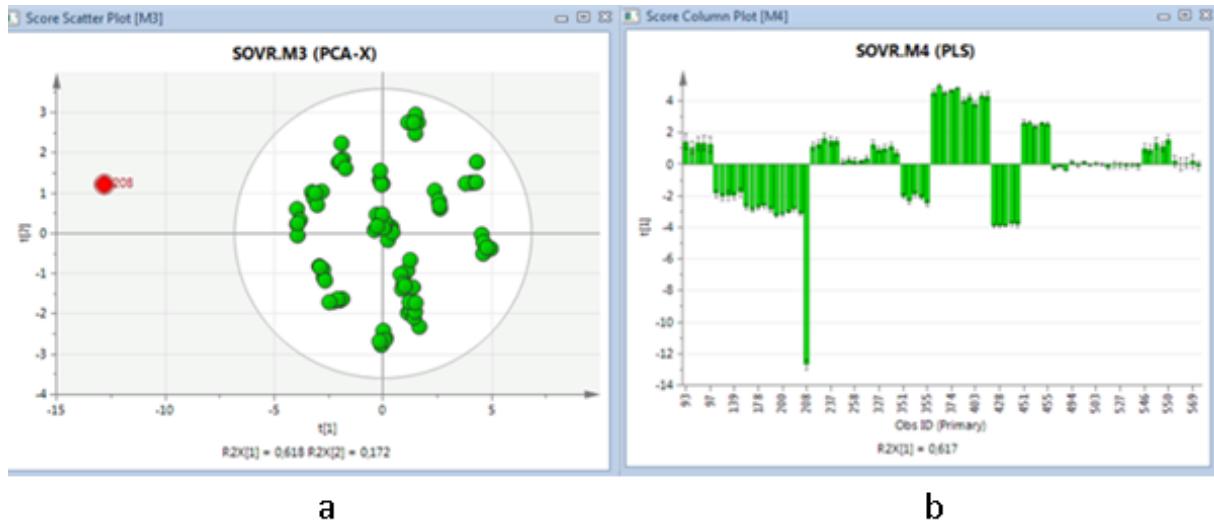
### 1.5.3 Načini obdelave podatkov s PCA in PLS metodo

**1. Opis variabilnosti sistema (ang. Variance explained):** vrednost variance opisuje, kako dobro znamo opisati model. Vrednost nam pove, v kakšni meri se model ujema s podatki. Izražena je lahko kot število med 0 in 1 ali v odstotkih. Npr. vrednost 0.7 pomeni, da 70 % variabilnosti opišemo z modelom (9).

**2. Točkovni grafikon (ang. Scores plot):** grafikon prikazuje projekcijo vzorca/vrednosti spremenljivk v glavni komponenti (20). Ta grafikon se najbolj pogosto uporablja v obliki raztresenega grafikona (ang. *Scatter plot*), ki pokaže razmerje med spremenljivkami glede na njihovo relativno pozicijo na grafikonu (9). X os predstavlja prvo glavno komponento  $t_1$ , Y os pa drugo glavno komponento  $t_2$ . Kontrolne meje v obliki elipse so prikazane na grafu in predstavljajo območje stabilnosti (99.73 % podatkov se nahaja znotraj elipse) (20). Grafikon se običajno uporablja za identifikacijo združevanja podatkov – množica točk (ang. *clustering*), izrednih dogodkov (ang. *outliers*) in trendov (Slika 6a). Pri diplomi smo uporabili programski paket Simca Umetrics, ki omogoča prikaz kategorizacije podatkov v štirih različnih grafikonih: raztreseni grafikon, črtni grafikon, stolpčni grafikon in 3D grafikon (20):

#### **2.1. Stolpčni raztreseni grafikon (ang. Score Column Plot):**

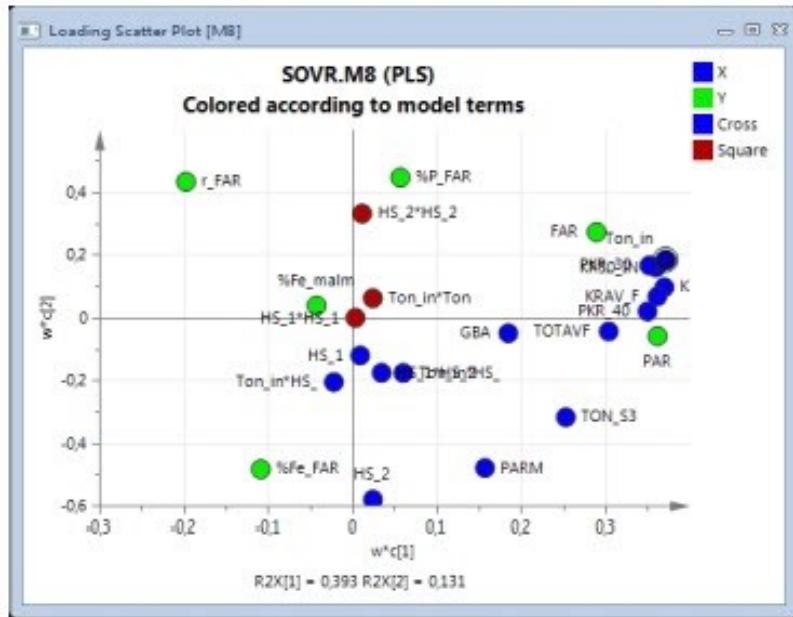
Stolpčni raztreseni grafikon povzame vpliv spremenljivk na najpogosteje prvo glavno komponento (Slika 6b) (20).



Slika 6: Raztresen točkovni grafikon (6a), stolpčni grafikon (6b) (20).

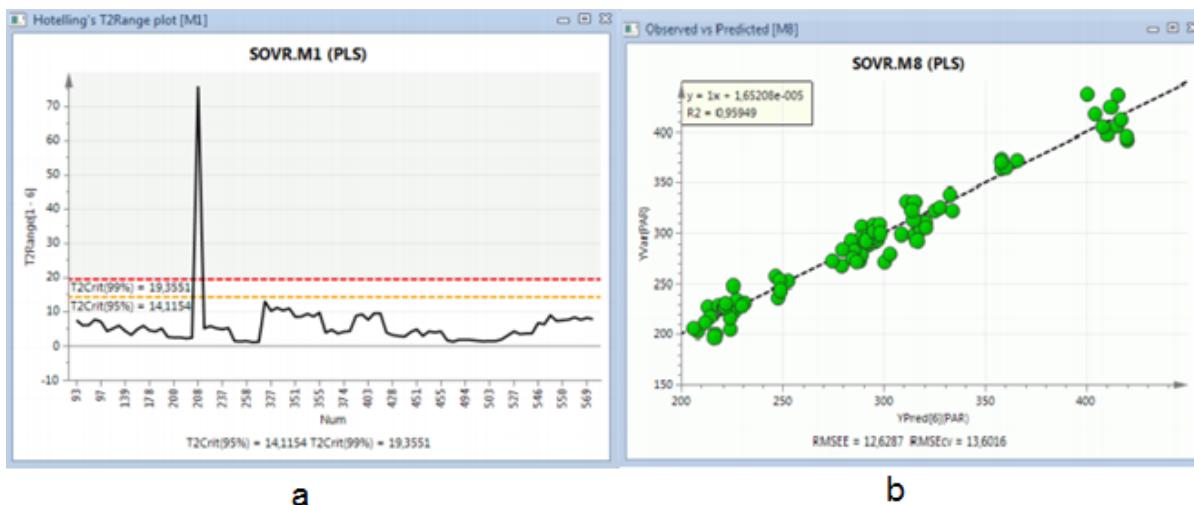
**3. Grafikon korelacijske klasifikacije podatkov (ang. Loadings plot):** grafikon predstavlja stopnjo vpliva spremenljivke na določeno glavno komponento. Spremenljivke z visoko pozitivno ali negativno utežjo (ang. *loadings*) imajo statistično značilen vpliv na izbrano glavno komponento.

Utež X spremenljivke (w) pojasnjuje pomembnost teh spremenljivk k napovedi proučevanega Y. Utež Y spremenljivke (c) navaja, katere Y spremenljivke so modelirane v PLS dimenzionalnem modelu. Ko so koeficienti v  $w^*c$  grafu, dobimo sliko, kakšen je odnos med spremenljivkama X in Y, katere X spremenljivke so pomembne in katere Y spremenljivke so povezane s katerimi X spremenljivkami. Podatke lahko prikažemo v štirih različnih grafikonih: raztreseni grafikon (Slika 7), črni grafikon, stolpčni grafikon in 3D grafikon (20).



Slika 7: Raztreseni grafikon korelacijske klasifikacije podatkov (20).

**4. Hotelling's  $T^2$**  spada med diagnostična statistična orodja in prikazuje razdaljo vzorca od centra modela (9). Slika 8a prikazuje Hotelling's  $T^2$  graf, na katerem sta prikazani dve limiti. Vrednosti nad 3 sigma mejo predstavljajo izredne dogodke v sistemu (ang. *outliers*), ki imajo velik vpliv na napoved modela. Ti podatki bistveno odstopajo od množice in lahko negativno vplivajo na prilaganje modela (Q2) (20).



Slika 8: Hotelling's  $T^2$  graf z obema limitama (8a) in graf opazovano proti napovedano (8b) (20).

**5. *DModX grafikon:*** grafikon uporabljam za detekcijo izrednih dogodkov izven 2 sigma meje (izven 95 % podatkov) (ang. *weak outliers*). Za razliko od Hotelling's T<sup>2</sup> grafikona, DModx oceni variabilnost v sistemu, ki je ne znamo pojasniti (21).

**6. *Opazovano proti napovedano (ang. Observed vs. Predicted):*** slika 8b prikazuje grafikon, ki kaže dejansko vrednost proti opazovani vrednosti, ki jo model predvideva za izbrano spremenljivko odziva (Y) (20).

**7. *Koeficienti (ang. Coefficients):*** SIMCA iz PLC modela izračuna regresijske koeficiente za vsako Y spremenljivko (20). PLS model je lahko predstavljen kot večkratna regresijska enačba ( $Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots$ ), kjer  $b_1, b_2, \dots$  predstavljajo regresijske koeficiente za vsako spremenljivko v celotnem modelu (9). Regresijski koeficienti se nanašajo na centrirane in normalizirane X spremenljivke. Normaliziranje koeficientov je pomembno za ugotavljanje, katera spremenljivka je bolj pomembna za model in katera spremenljivka ima močnejšo povezavo z odvisno spremenljivko Y. Velikost koeficienta predstavlja spremembo spremenljivke Y, vrednost spremenljivke X pa je med 0 in 1. Interval zaupanja koeficienta je določen s črto napake. SIMCA nam omogoča predstavitev koeficientov v obliki tabele ali v obliki stolpčnega grafikona (20).

**8. *Prileganja modela (R<sub>2</sub>):*** vrednost nam pove koliko skupne variance odvisne spremenljivke Y je vključene (razložene) z modelom (9). Ugotovimo, kako dobro se model prilega podatkom. Visok R<sub>2</sub> (blizu 1) je pogoj za dober model (20).

**9. *Napovedovanja modela (Q<sub>2</sub>):*** vrednost nam pove, koliko skupne variance odvisne spremenljivke Y je moč napovedati z modelom glede na navzkrižno validacijo (9). Pri navzkrižni validaciji se model ustvari na osnovi 85 % podatkov in se poskuša na preostalih 15 % napovedati. Uspešnost napovedi se kvantitativno predstavi s Q<sub>2</sub>. Q<sub>2</sub> večji kot 0.5 ima zadostno napovedno moč (21).

**10. *Povprečna napaka kvadratnega korena (ang. Root mean square error – RMSE):*** primerja napovedane in izmerjene vrednosti odvisne spremenljivke Y. Visoka napaka pomeni šibek model. RMSE se izračuna za kalibracijo (RMSEC) in navzkrižno validacijo (RMSECV) (9).

#### **1.5.4 Omejitve MVA**

V preglednici I so prikazane prednosti in pomanjkljivosti MVA.

*Preglednica I: Prednosti in pomanjkljivosti metode MVA (9).*

MULTIVARIATNA ANALIZA	
PREDNOSTI	POMANKLJIVOSTI
Omogoča pridobivanje informacij iz večje podatkovne baze.	Pomanjkanje potrjenih praks in metod (zahteva do regulatorne spremembe).
Omogoča prilagajanje procesa glede na variabilnosti vstopnih spremenljivk (ang. <i>online MVA</i> ).	Temeljni matematični modeli so lahko napačno razloženi.
Omogoča diagnostično statistiko in postavitev odločitev za spremembe v procesu ali materialu.	MVA metoda temelji na podlagi zajetih podatkov in je veljavna le znotraj poznanega območja, ekstrapolacija izven tega območja je lahko netočna.
Prispeva k poglabljanju znanja iz proučevanega procesa.	Metoda lahko zgleda preveč kompleksna.
Zmanjša število neustreznih serij izdelka.	Potrebna je sprememba pristopanja k reševanju problema.

## 2. NAMEN DELA

Namen magistrske naloge je določitev vpliva fizikalno-kemijskih lastnosti surovin ( $\kappa$  – karagenan, mikrokristalne celuloza, lakoza monohidrat), ki vstopajo v izdelek (obložene pelete s takojšnjim sproščanjem) ter procesnih parametrov na kritično lastnost izdelka (hitrost sproščanja ZU) s pomočjo MVA. Spremenljivke s statistično značilnim vplivom bomo definirali kot kritične lastnosti surovin (ang. *critical material attributes, CMA*) oziroma kritične procesne parametre (ang. *critical process parameters, CPP*). Model upošteva specifikacije lastnosti vstopajočih surovin (MCC,  $\kappa$  – karagenan, Mg-stearat, lakoza monohidrat, natrijev lavril sulfat in modelna ZU) (Slika 16), kot tudi dodatno ovrednotene fizikalno-kemijske lastnosti MCC in  $\kappa$  – karagenana, ki so bile predmet te magistrske naloge. Hkrati bomo v postavitvi modela vključili potencialne kritične procesne parametre iz vsake stopnje tehnološkega postopka (Slika 17).

Za vzpostavitev modela bomo uporabili MVA analizo, ki definira spremenljivke, ki so pomembne za skupno variabilnost sistema, hkrati pa omogoča ugotavljanje korelacije med njimi (PLS metoda).

Z magistrsko nalogo želimo kategorizirati kritičnost fizikalno-kemijskih lastnosti vseh testiranih serij pomožnih snovi s pomočjo MVA in ugotoviti njihov vpliv na hitrost sproščanja modelne ZU iz pelet. V ta namen bomo različnim serijam  $\kappa$  – karagenanov določili velikost delcev z lasersko difrakcijo (LD), močljivost z merilnikom stičnega kota in reološke lastnosti s pomočjo rotacijskega viskozimetra. Pri proučevanju MCC se bomo osredotočili na vrednotenje velikosti delcev in močljivost.

## 3. MATERIALI IN METODE

### 3.1 MATERIALI

#### 3.1.1 MIKROKRISTALNA CELULOZA (MCC)

MCC zasledimo v različnih oblikah, med seboj se razlikujejo po velikosti in obliki delcev, nasipni gostoti ter po vsebnosti vlage (6). Preglednica II prikazuje razlike med uporabljenimi MCC (22).

*Preglednica II: Fizikalno-kemijske lastnosti MCC (22).*

	Avicel® Ph 101	Avicel® Ph 112	Avicel® Ph 200
Povprečna velikost delcev [ $\mu\text{m}$ ]	50	100	180
Vsebnost vlage [%]	3,0–5,0	ne več kot 1,5	2,0–5,0
Nasipna gostota [g/cc]	0,26–0,31	0,28–0,34	0,29–0,36

#### 3.1.2 $\kappa$ – KARAGENANI

Preglednica III prikazuje razlike med uporabljenimi  $\kappa$  – karagenani.

*Preglednica III: Razlike med uporabljenimi  $\kappa$  – karagenani (23, 24).*

	GELCARIN GP-812, CARGIL	GELCARIN GP-911
Viskoznost [mPas]	5	5
Tvorba gela [g]	750–050	700–1000
pH(1,5% raztopina)	8,0–10,5	8,0–10,5

#### 3.1.3 OSTALE UPORABLJENE KEMIKALIJE

*Medij za raztapljanje*

Za pripravo fosfatnega pufra z 1 % natrijevim dodecil sulfatom (NaLS) ( $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$ ) smo uporabili prečiščeno vodo, trinatrijev fosfat dodekahidrat ( $\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ ) in NaLS, obe spojini sta proizvajalca Merck KGaA, Nemčija. Uporabili smo tudi 1M natrijev hidroksid (NaOH) in 1M klorovodikovo kislino (HCl), ki sta bili pripravljeni v laboratoriju.

*Topila*

2-propanol (Merck KGaA, Nemčija)

## 3.2 NAPRAVE

- Laboratorijska steklovina (čaše, steklena palčka, merilni valji, petrijevke ipd.)
- Dodaten laboratorijski pribor (parafilm, aluminijasta folija)
- Precizna tehnica Lotrič, A&d Instruments LTD, GH-300-EC, Slovenija
- Magnetna mešala: IKA RCT basic, IKA RH basic KT/C, ROTAMIX 560 MMH, Nemčija
- pH meter Metter Toledo Seven Compact, Švica
- Ultrazvočna kopel Branson 1510, Branson Ultrasonic Corp., ZDA
- Ročna hidravlična stiskalnica, Graseby Specac, Velika Britanija
- Naprava za merjenje stičnega kota, Drop Shape Analyzer, DSA 100, KRUSS, Nemčija
- Laserski difraktometer, Malvern instruments Mastersizer S, UK
- Reometer Anton Paar Physica MCR 301, Avstrija

## 3.3 METODE

### 3.3.1 Močljivost in določanje stičnega kota z metodo sedeče kapljice

DSA 100 (Slika 9) je naprava, ki omogoča merjenje stičnega kota in proste površinske energije. Naprava sestoji iz ročno premične mizice po oseh x, y in z, na katero položimo ploščico, iz kamere z 1200 x 800 px pri 200 fps do 90 x 60 px pri 2000 fps ločljivosti objektiva s sedemkratno povečavo, LED osvetlitve, dozirno enoto (iglo), ki je regulirana s Software Drop Shape analyzer (25).

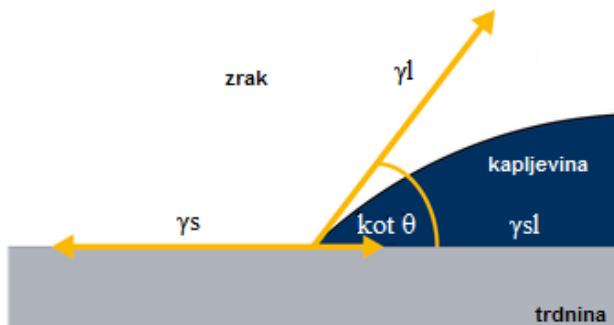


Slika 9: Naprava za merjenje stičnega kota, Drop Shape Analysis System DSA 100 Contact Angle Meter KRUSS.

Močljivost je sposobnost tekočine, da se razprostira po površini tekočine ali trdne snovi, ampak v njej ni topna in se z njo ne meša. Merilo za močljivost trdnih snovi je stični kot oziroma kot močenja ( $\theta$ ). Ko kapnemo kapljevino na trdno podlago in se kapljevina umiri, oklepa tangenta na gladino kapljevine ob stiku s trdnino kot močenja (Slika 10) (26). V primeru absolutnega močenja trdnine je stični kot  $0^\circ$ . Kadar je stični kot  $< 90^\circ$  oz.  $\cos\theta > 0$ , takrat kapljevina moči trdnino. Stični kot  $180^\circ$  pa pomeni, da kapljevina ne moči trdnine (25).

Youngova enačba pojasnjuje povezavo med stičnim kotom, površinsko napetostjo kapljevine ( $\gamma_l$ ), medfazno napetostjo med kapljevino in zrakom ( $\gamma_{sl}$ ) in površinsko prosto energijo trdnine ( $\gamma_s$ ) (25). Ko se rob kapljevine v vodoravni smeri ne premika, je vsota vseh površinskih sil, ki delujejo nanj, enaka nič, takrat velja *Enačba 1* (26):

$$\gamma_s = \gamma_{sl} + \gamma_l * \cos\theta \quad \text{Enačba 1}$$

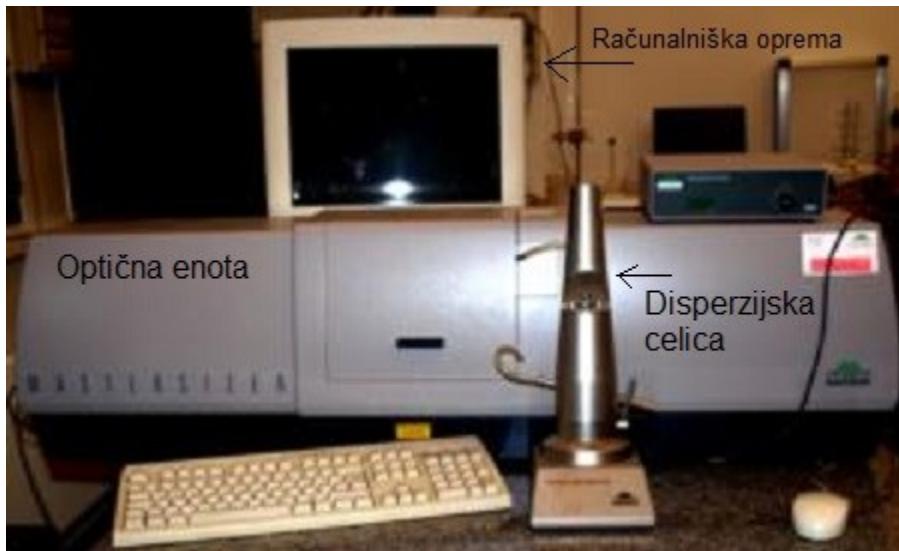


Slika 10: Ravnovesje sil, katerim je izpostavljena kapljica tekočine po nanosu na trdno površino (25).

### 3.3.2 Določanje velikosti delcev z metodo laserske difrakcije (LD)

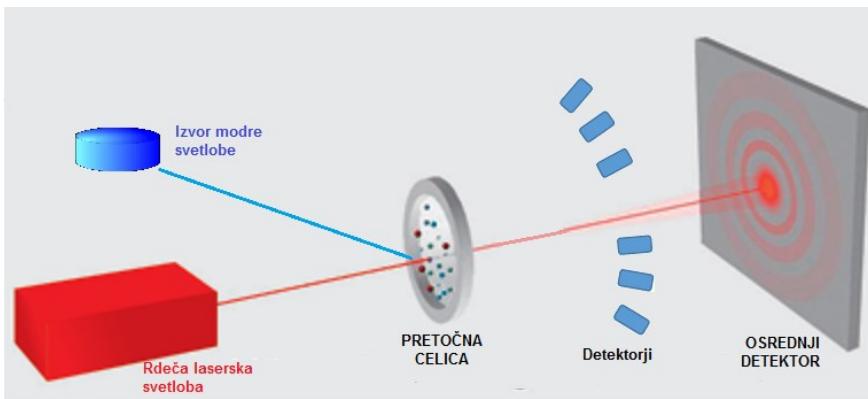
LD je metoda, ki se uporablja za določevanje velikosti delcev. Metoda je široko uporabljena, saj omogoča meritve vzorcev v različnih fizikalnih stanjih (emulzije, suspenzije, praški), primerna je za merjenje majhnih količin vzorca (nekaj mg do g) in omogoča meritve velikosti delcev v širokem razponu. Analize so ponovljive in hitre. Za LD je značilna volumska porazdelitev velikosti delcev. Princip merjenja z LD temelji na predpostavki, da so delci okrogle oblike (27).

Na sliki 11 je naprava laserski difraktometer, Malvern instruments Mastersizer S, ki je sestavljena iz optične enote (laser), disperzijske celice, detektorja in računalniške programske opreme in omogoča merjenje velikosti delcev v območju (0.05–3500 µm). Aparatura omogoča merjenje praškov v toku zraka (suha metoda), lahko pa substance dispergiramo v vodi ali nevodnih topilih (mokra metoda) (28).



Slika 11: Zgradba laserskega difraktometra Malvern instruments Mastersizer S.

Laser kot izvor monokromatske svetlobe generira primarno rdečo lasersko svetlobo z valovno dolžino 633 nm (za delce, ki so večji od 1 μm). Novejše različice instrumentov, in sicer Malvern 2000 in 3000, pa generirajo tudi sekundarno modro lasersko svetlobo z valovno dolžino 466 nm (za delce, ki so manjši od 1 μm) (27, 29). Svetlobni žarek potuje skozi pretočno celico, kjer je dispergiran vzorec; svetloba zadane ob delce v vzorcu in zato se ukloni pod različnimi koti. Velikost kota in intenziteta svetlobe sta odvisni od velikosti delcev. Manjši kot so delci, večji je kot sipanja in manjša je intenziteta svetlobe (27). Za pretočno celico je detektor (silicijeva ploščica, na kateri je več manjših detektorjev od 16 do 32), ki pretvori svetlobni signal v električnega. Osrednji detektor pa izračuna optično koncentracijo delcev (zatemitev; ang. *obscuration*). To je razlika med najvišjo izmerjeno intenziteto laserskega žarka in intenzitetu svetlobe, ki so jo sipali delci (29). Slika 12 prikazuje optično enoto, kjer poteka LD. Razpršene vzorce svetlobe detektorji s pomočjo optično-matematičnega modela pretvorijo v volumsko porazdelitev (28).



Slika 12: Prikaz optične enote LD.

Kot rezultat meritev smo podali vrednosti  $D_{10}$ ,  $D_{50}$  in  $D_{90}$ , ki pomenijo (27):

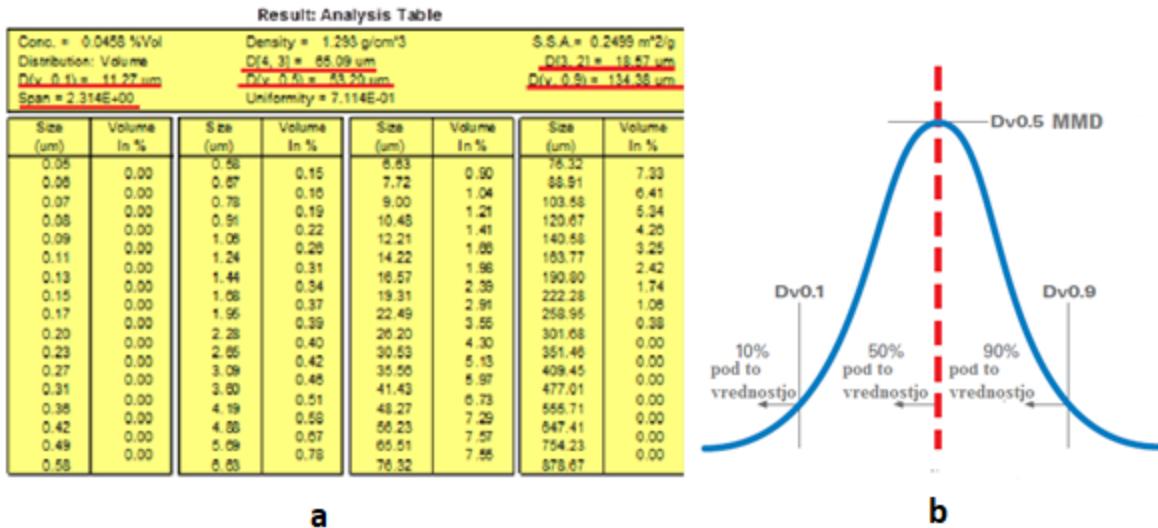
- $D_{10}$  ali  $D_{v0.1} = 10\%$  delcev je manjših od dobljene vrednosti.
- $D_{50}$  ali  $D_{v0.5} = 50\%$  delcev je manjših od dobljene vrednosti. Vrednost se imenuje tudi srednji masni premer (MMD).
- $D_{90}$  ali  $D_{v0.9} = 90\%$  delcev je manjših od dobljene vrednosti.

Povprečna velikost delcev je podana z  $D_{[4,3]}$  (volumski povprečni premer delcev), ki predstavlja velikost delcev, ki tvorijo glavnino volumna vzorca in  $D_{[3,2]}$  (površinski povprečni premer delcev), ki predstavlja prisotnost drobnih delcev (27).

Pomemben je tudi razpon (ang. *Span*) vrednost, ki predstavlja širino porazdelitve oziroma razpršenost. Večji kot je razpon, širša je porazdelitev delcev. Razpon se računa po spodaj navedeni Enačbi 2 (29):

$$SPAN = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}} \quad \text{Enačba 2}$$

Slika 13a prikazuje pridobljene podatke iz Software Malvern Instruments, na Sliki 13b pa je prikazan pomen vrednosti  $D_{10}$ ,  $D_{50}$  in  $D_{90}$ .



Slika 13: Podatki iz Software Malvern Instruments (a) in pomen vrednosti  $D_{10}$ ,  $D_{50}$  in  $D_{90}$  (b).

Tako kot druge metode ima tudi LD svoje omejitve. Vzorčenje vzorca za analizo mora biti reprezentativno, če želimo zagotavljati kakovostne podatkov. To je še posebej pomembno pri vzorcih z velikostjo delcev večjo od 70 µm, saj večji delci zavzamejo večji volumen v primerjavi z manjšimi (en 100 µm delec zavzame enak volumen kot milijon 1 µm delcev) in to lahko vodi v veliko odstopanje rezultatov (30). Pri t.i. mokri metodi pa je za natančnost meritev zelo pomembna tudi izbira disperznega medija, v katerem se delci dispergirane substance ne smejo obarjati ali raztapljati. Pomembna pa je tudi koncentracija vzorca. V primeru previsoke koncentracije lahko pride do večkratnega razprševanja svetlobe (angl. *multiple scattering*) in lažnega pomika rezultatov k nižjim vrednostim (28, 29).

### 3.3.3 Merjenje reoloških lastnosti $\kappa$ – karagenanov

Reometer Anton Paar Physica MCR 301 je rotacijski reometer z nastavljivo strižno napetostjo (ang. *Controlled shear stress, CSS*), ki mogoča širok spekter dinamičnih in statičnih meritev: testi lezenja in obnove, amplitudni testi, frekvenčni testi, časovno odvisni in temperaturno odvisni testi (31). Neodvisna (nastavljava) spremenljivka je strižna napetost, merimo pa strižno hitrost ali strižno deformacijo. Reometri so enosni, to pomeni da se odvija vnos navora in strižna deformacija (hitrost rotiranja senzorja) na isti pogonski osi. Motor poganja rotirajoči del senzorskega sistema z nastavljenim vrednostjo navora. Električen vnos moči je linearno povezan z

vrednostjo navora (31). Elektronski krmilnik pošlje primeren tok ( $I$ ) na motor, ki proizvede ustrezен navor ( $M$ ). Posledično nastopi vztrajnostni ali odpornostni moment, saj se vzorec upira navoru motorja. Deformacijo kota izmerimo s pomočjo digitalnega optičnega kodirnika (32). Ta lahko zabeleži zelo majhne odmike od začetne lege senzorja (npr. do  $10^{-6}$  rad) in tudi visoke kotne hitrosti (npr. večje od  $10^3$  rad/s). Strižno deformacijo in strižno hitrost pa izračuna na podlagi geometrijskih karakteristik senzorskega sistema (31). Slika 14 prikazuje reometer Anton Paar Physica MCR 301 s senzorskimi sistemom CP50-2 in nanešenim vzorcem.



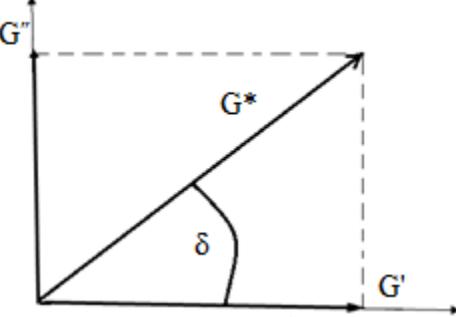
*Slika 14: Reometer Anton Paar Physica MCR 301 s senzorskim sistemom CP50-2.*

Če želimo ustrezno opisati reološke lastnosti tekočine, moramo meritve izvajati v pogojih enostavnega strižnega toka (laminaren tok), saj le v tem območju lahko kontroliramo deformacijske in tokovne pogoje. Enostavni strižni tok smo dosegli s senzorskim sistemom stožec-ploščica (31). Glavne prednosti senzorskega sistema stožec-ploščica so majhne količine vzorca, enostavno dodajanje vzorca in enostavno čiščenje sistema. Prednost je tudi, da se znebimo zračnih mehurčkov v vzorcu zaradi koničaste oblike (32). Sistem pa ima tudi določene slabosti, kot so možnost pojava robnega efekta, ki povzroči deformacijo proste površine tekočine, kar vpliva na vrednost navora (31), temperaturne spremembe vzorca (32) in možnost prehoda iz laminarnega v turbolenten tok zaradi delovanja centrifugalnih sil (31).

### 3.3.3.1 Dinamični testi – oscilatorni testi

Oscilatorno testiranje z majhno amplitudo deformacije omogoča določitev viskozne in elastične komponente k skupni viskoelastičnosti pri nedesturktivnih strižnih pogojih (to je v območju linearnega viskoelastičnega odziva). Pri meritvi se strižna deformacija s časom sinusno spreminja z določeno frekvenco in amplitudo. Kot posledica časovno odvisne deformacije se v snovi vzpostavi časovno odvisna napetost (31). Preglednica IV prikazuje definirane dinamične količine (31):

Preglednica IV: Definirane dinamične količine (31).

$G'$	Modul akumulacije energije [Pa], elastični modul (ang. <i>storage modulus</i> )
	Merilo elastičnega obnašanja sistema in karakterizira njegovo upiranje preoblikovanju. Podaja količino energije, ki jo sistem reverzibilno shrani in je ob koncu obremenitve v celoti na voljo za vzpostavitev prvotne oblike vzorca.
$G''$	Modul energetskih izgub [Pa], viskozni modul, plastični modul (ang. <i>loss modulus</i> )
	Opisuje viskozno obnašanje sistema in podaja količino energije, ki jo sistem irreverzibilno odda okolici in je za sistem to izgubljena energija.
$G^*$	Kompleksni strižni modul [Pa] (ang. <i>Complex shear modulus</i> )
	$ G^*  = \sqrt{ G' ^2 +  G'' ^2} \quad \text{Enačba 3}$ $\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad \text{Enačba 4}$ <p><math>G^*</math> je vektorska vsota elastičnega in plastičnega modula (Enačba 3). Za idealno tekočino je: <math>G' = 0</math> in <math>\delta = 90^\circ</math>, kar pomeni, da je <math>G^* = G''</math> in <math>G''/\omega = \eta</math> (Enačba 4).</p>
$\delta$	Fazni zamik [brez enote] (ang. <i>Phase shift angle</i> )

Slika 15: Vsota  $G'$  in  $G''$  v kompleksni ravnini je  $G^*$ . Naklon vektorja pa določa  $\delta$ .

Tanges faznega zamika je enak kvocientu med viskoznim in elastičnim modulom. Za viskoelastične snovi velja, da je  $0^\circ < \delta < 90^\circ$ .

---

$\eta^*$	Kompleksna viskoznost [Pa.s] (ang. <i>Complex viscosity</i> )
----------	---

Kompleksna viskoznost predstavlja celoten odpor snovi proti toku.

$$\eta^* = \frac{\tau a}{\gamma a \cdot \omega} = \frac{G^*}{\omega} \quad Enačba\ 5$$

$\tau a$  in  $\gamma a$  predstavljata amplitudi strižne napetosti in deformacije, produkt  $(\gamma a \cdot \omega)$  pa maksimalno strižno hitrost pri dinamičnem testu.

$\eta'$	Dinamična viskoznost (ang. <i>Dynamic viscosity</i> )
---------	---

$$\eta' = \frac{G''}{\omega} = \left( \frac{\tau a}{\gamma a \cdot \omega} \right) \cdot \sin \delta \quad Enačba\ 6$$

Z oscilatornimi testi dobimo podatke o strukturiranosti in jakosti nastalih gelov. S povečevanjem števila in moči interakcij med molekulami polimera se povečujejo vrednosti dinamičnih modulov. Ti morajo biti izmerjeni v območju linearnega viskoelastičnega odziva, saj je le v tem območju struktura polimera ohranjena. V tem območju sta parametra  $G'$  in  $G''$  konstantna. Če pridemo izven območja linearnega viskoelastičnega odziva sta parametra odvisna od deformacije in časa (31).

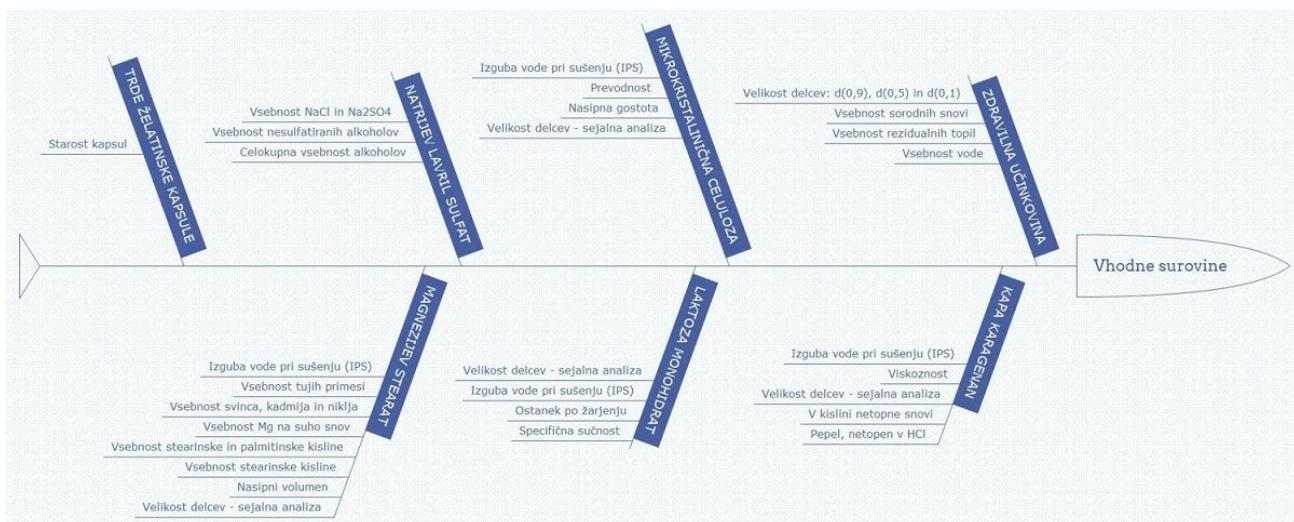
### 3.3.4 Statistična metoda - Multivariatna analiza

Multivariatni model smo razvili s pomočjo SIMCA P+ 14.0 programa (Umetrics, Umeå, Sweden). Osnove MVA so opisane v uvodnem delu.

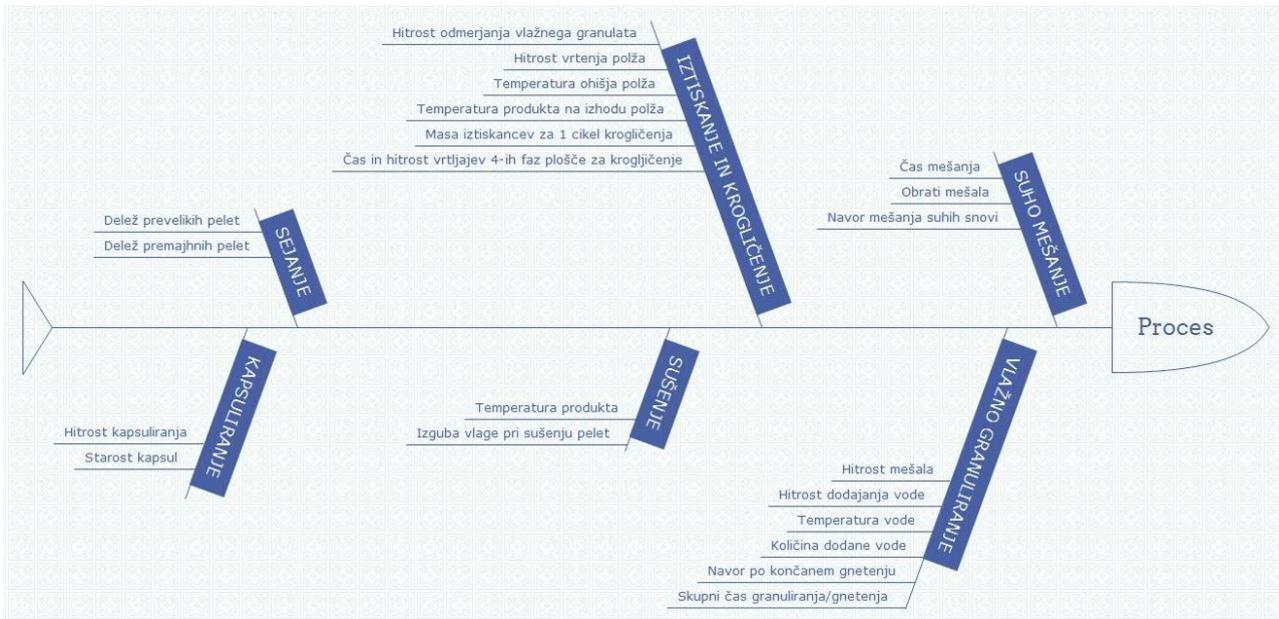
## 4. EKSPERIMENTALNI DEL

### 4.1 Razvoj MVA modela

Z MVA modelom smo določili potencialne kritične fizikalno-kemijske lastnosti vstopnih materialov v modelno formulacijo. Določili smo tudi potencialne kritične procesne parametre, ki vplivajo na sproščanje modelne ZU iz pelet. V ta namen smo popisali parametre proizvodnih serij, in sicer: vhodnih materialov (specifikacijski parametri) in procesnih parametrov. Slika 16 prikazuje vse kritične lastnosti materialov, ki so vstopali v modelno formulacijo. Slika 17 pa prikazuje posamezne stopnje proizvodnega procesa in katere procesne parametre smo spremljali na vsakem procesnem koraku. Magistrska naloga zajema podatke, ki smo jih pridobili v okviru nadaljnje raziskave, s katero smo želeli dodatno proučiti kritične fizikalno-kemijske lastnosti pomožnih snovi z najvišjim vplivom na dissolucijo. Na MCC smo dodatno proučevali: volumsko porazdelitev velikosti delcev in močljivost. Na  $\kappa$  – karagenanih pa smo dodatno proučili močljivost, reološke lastnosti, volumsko porazdelitev velikost delcev. V okviru nadaljnje raziskave so bile na vzorcih  $\kappa$  – karagenanov proučevane še: molekulska masa in porazdelitev velikosti molekulske mase, vsebnost kalijevih ionov in površinska energija.



Slika 16: Proučevane fizikalno-kemijske lastnosti na vseh vstopajočih materialih v modelno formulacijo.



Slika 17: Stopnje proizvodnega procesa s parametri, ki smo jih spremljali.

Multivariatni model smo razvili s pomočjo SIMCA P+ 14.0 programa (Umetrics, Umeå, Sweden). Kot odzive smo uporabili podatke iz proizvodnih serij izdelka ter izgradili PLS model (nehierarhičen). V korelacijski preglednici smo ugotavljali korelacije med posameznimi spremenljivkami. Če je korelacijski faktor večji od 0,5, pomeni, da je merjena lastnost pomembna in da vpliva na proces. Lastnosti s korelacijskim faktorjem nižjim od 0,5 smo iz modela izločili. Hkrati smo med medsebojno koreliranimi parametri izbrali le enega, s katerim smo poskušali pojasniti variabilnost v modelu. Upoštevali smo dobro napoved modela s Q<sub>2</sub> več kot 0.5.

Rezultate smo podali s pomočjo različnih grafov:

1. Graf prileganja modela (R<sub>2</sub>) in graf napovedovanja modela (Q<sub>2</sub>)
2. Graf koeficientov
3. Graf opazovanega in napovedanega odziva proti napovedano

Za namen definiranja CMA in CPP smo uporabili nehierarhični MVA model in smo poskušali opisati vpliv (pozitiven, negativen) proučevanih faktorjev na hitrost raztapljanja v 45 minut.

## 4.2 Priprava vzorcev κ – karagenanov in MCC ter določanje stičnega kota z metodo sedeče kapljice

Z ročno hidravlično stiskalnico Graseby Specac smo izdelali 0.2000 g ploščice κ – karagenanov in MCC (Slika 18). Stiskali smo ročno s silo 5 ton 30 sekund. Vzorec smo vsuli v kovinsko matrico, ki smo jo omejili z dvema pečatoma. Stični kot smo merili zmeraj na strani ploščice, ki je bila v stiku s spodnjim pečatom, na zgornji pečati pa smo dovajali silo.



Slika 18: Shematičen prikaz ročne hidravlične stiskalnice Graseby Specac.

Stični kot smo merili po metodi sedeče kapljice z napravo DSA 100, meritve smo izvajali pri sobni temperaturi. Za medij smo uporabili prečiščeno vodo, volumen kapljice, ki smo jo kanili na površino ploščice, je bil  $1\mu\text{L}$ . S pomočjo Software Drop Shape Analyzer smo snemali stik kapljice prečiščene vode s površino ploščice. Na vsakem vzorcu smo naredili od 3 do 5 meritev. S pomočjo programske opreme smo določili čas geliranja κ-karagenanov in adsorptivne lastnosti MMC.

Merili smo hitrost pronicanja vode v material ter podatke predstavili s pomočjo naklona premice spremembe stičnega kota v času (Origin Pro 8, OriginLab USA). Podatki so prikazani v *Prilogi I in II*.

## 4.3 Vrednotenje porazdelitve velikosti delcev $\kappa$ – karagenanov in MCC z LD

Za izvajanje meritve smo uporabili Malvern Mastersizer S analizator, ki deluje po principu LD. Za meritve smo uporabili mokro metodo, ki omogoča meritve večje količine grobih delcev. V našem primeru je bila optična enota povezana z disperzijsko celico. Meritve za  $\kappa$ -karagenane smo izvajali v nevodnem mediju – izopropanolu, medtem ko smo meritve za MCC izvajali v vodi. V disperzijsko celico smo najprej nalili izopropanol ali vodo in dodali praškast vzorec. Na dnu posode je mešalo, ki enakomerno meša vzorec. Hitrost vrtenja mešala smo nastavili na 1500 obratov. Disperzijska celica je povezana z optično enoto, kjer poteče meritve. Po končani meritvi smo disperzijsko celico spraznili in večkrat izpirali pred naslednjo meritvijo. Rezultati  $D_{10}$ ,  $D_{50}$ ,  $D_{90}$  in Span so prikazani v *Prilogi I in II*.

## 4.4 Reološko vrednotenje gelov $\kappa$ – karagenanov

### 4.4.1 Priprava medija za razapljanje (disolucijski medij)

0,04 M trinatrijev fosfat z 1% NaLS ( $r = 1,007 \text{ mg/mL}$ )

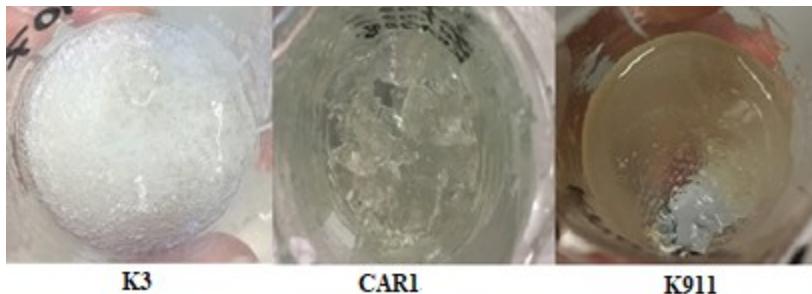
V 800 mL vode smo raztopili 15,21 g  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$  in mu dodali 9 mL 1M HCl. Raztopino smo premešali in ji uravnali pH na  $12,0 \pm 0,05$  z 1M HCl oz. 1M NaOH. Nato smo jo prelili v 1000 mL bučko in dopolni do oznake z vodo. V 1000 mL medija smo na koncu dodali še 10,0 g NaLS ( $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$ ) in mešali na magnetnem mešalu, da se je NaLS popolnoma raztopil. Slika 19 shematično prikazuje vse uporabljeni kemikaliji.



Slika 19: Uporabljeni kemikaliji za pripravo disolucijskega medija.

#### 4.4.2 Priprava $\kappa$ – karagenanov za določitev reoloških lastnosti

Za reološke meritve smo uporabljali 2 % raztopine (Slika 20).  $\kappa$  – karagenane smo raztopili v dissolucijskem mediju (m/m), jih nekaj časa mešali s stekleno palčko, nato pa mešali še na magnetnem mešalu tri ure. Vzorce smo prekrili s para filmom in aluminijasto folijo ter jih hranili en dan v temi, nato pa smo izvedli meritve na reometru v treh paralelkah za vsak posamezen vzorec.



Slika 20: Prikaz  $\kappa$  –karagenanov tipa GELCARIN GP-812 (K3),  $\kappa$  – karagenana proizvajalca CARGIL (CAR1) in tipa GELCARIN GP-911 (K911) v 2% raztopini.

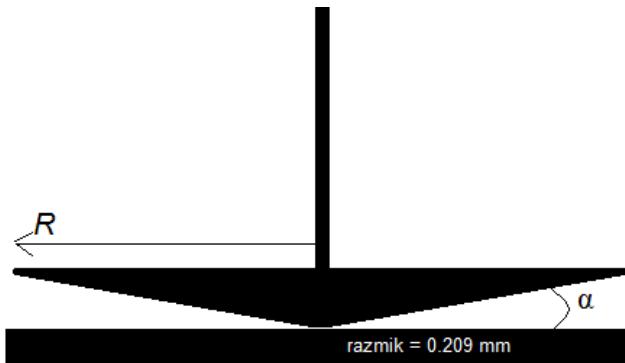
#### 4.4.3 Izvajanje meritev na reometru Anton Paar Physica MCR 301

Za reološke meritve smo uporabili reometer Anton Paar Physica MCR 301 s senzorskim sistemom CP50-2 22764. Z oscilacijskim merjenjem dinamične viskoznosti in viskoelastičnih modulov določamo jakost povezav med molekulami polimerov. Pri meritvah je bilo pomembno, da smo izpolnjevali spodaj navedene pogoje, da smo karagene ustrezno reološko opredelili (31):

- meritve smo izvajali v pogojih laminarnega toka;
- med meritvami smo zagotovili izotermne pogoje;
- preprečevanje zdrsa na meji tekočina – trdna snov;
- izogibanje vplivom robnih efektov.

Meritve smo izvajali pri konstantnih pogojih, pri temperaturi 25 °C, vzorce pa smo pred meritvijo še temperirali 5 min na reometru (z uporabo funkcije "waiting time"). Vzorce smo na ploščico nanašali s plastično palčko, in s to enako palčko presežek vzorca pred meritvijo tudi odstranili. Pri meritvah smo uporabili senzorski sistem stožca in ploščice CP50-2, s katerim smo dosegli enostavni strižni tok. Dimenziije stožca so definirane s polmerom R in kotom  $\alpha$ . Število 50 je polmer stožca, število 2 pa kot med stožcem in ploščico. Vzorec smo nanašali na ploščico

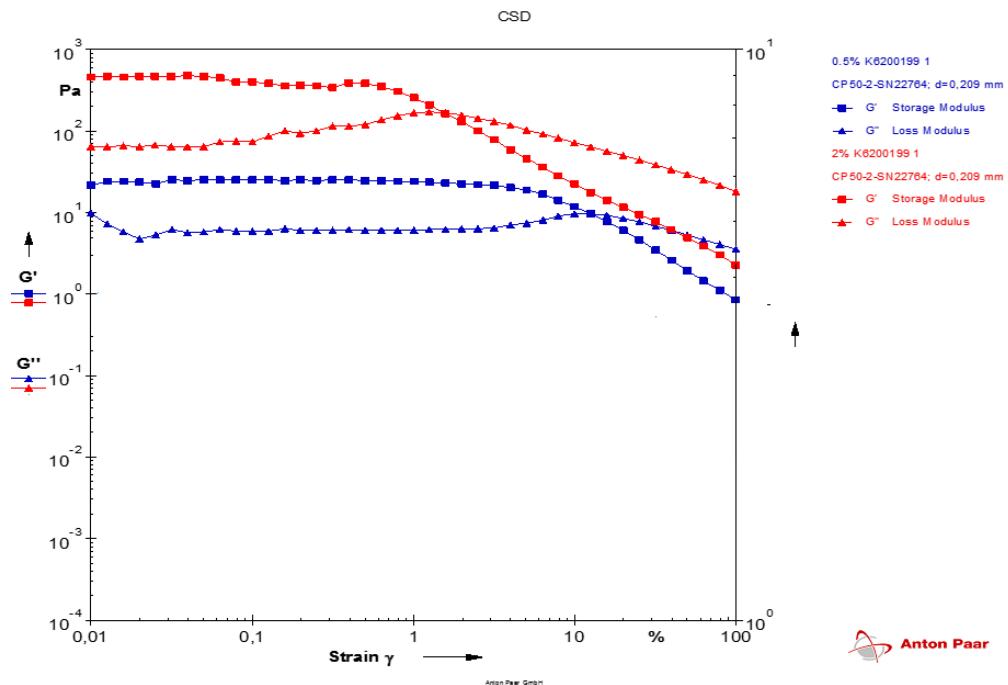
(miruje), na katero je deloval stožec (se giblje), razmik med ploščico in stožcem je bil 0.209 mm. Slika 21 prikazuje uporabljen senzorski sistem CP50-2.



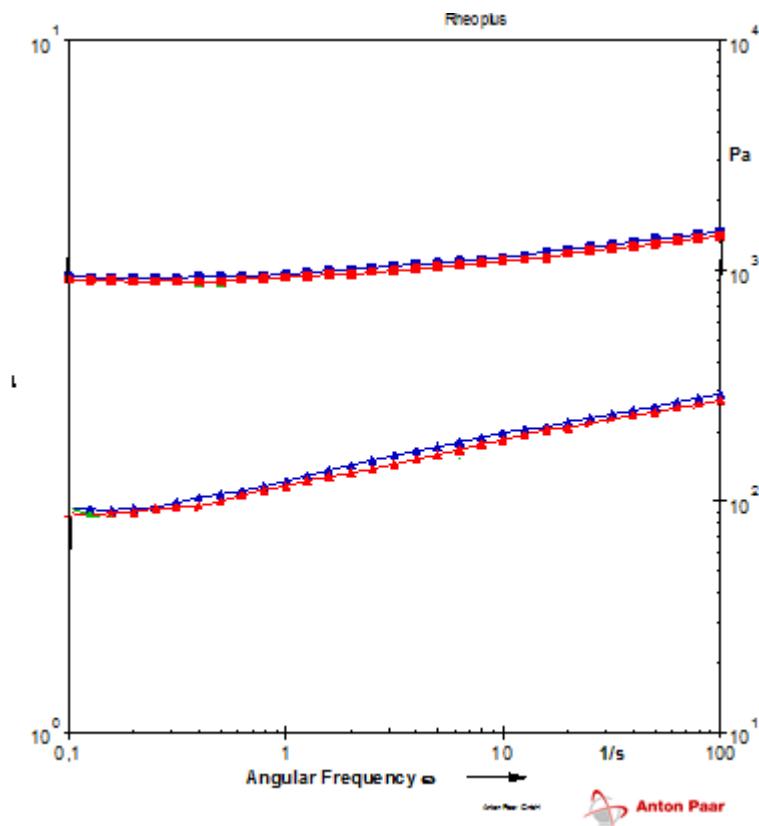
Slika 21: Senzorski sistem CP50-2.

Namen meritev je bil določitev deleža viskoznega in elastičnega doprinosha v viskoelastičnemu odzivu. Meritve smo izvajali s pomočjo dinamičnih – oscilacijskih testov (amplitudni in frekvenčni test). Najprej smo naredili amplitudni test in z njim določili območje linearnosti (območje nedestruktivnih strižnih pogojev – pogoji majhnih strižnih deformacij). Določili smo amplitudo deformacije  $\gamma = 0.2$ . Pri amplitudnem testu je frekvenca oscilacije stožca konstantna, spreminja se kot nihanja, in sicer v našem primeru od 0.01 do 100 %. Ugotovili smo, da so reološke lastnosti  $\kappa$  - karagenanov do neke meje neodvisne od amplitude deformacije  $\gamma$ . Nad to mejo pa prično vrednosti dinamičnih količin  $G^*$ ,  $G'$ ,  $G''$ ,  $\eta^*$  in  $\eta'$  z naraščajočo amplitudo deformacije  $\gamma$  padati. To pomeni, da je reološko obnašanje prešlo iz linearnega v nelinearen viskoelastičen odziv. Slika 22 prikazuje odvisnost dinamičnih količin  $G'$  in  $G''$  od  $\gamma$  (31).

Ko smo določili linearno območje smo začeli z izvajanjem frekvenčnih testov. Za te teste je značilno, da kot nihanja ostaja konstanten, frekvenca oscilacije pa se spreminja, in sicer mi smo jo zmanjševali od 100 do  $0.1 \text{ s}^{-1}$ . Na tak način smo določevali frekvenčno odvisnost dinamičnih količin, v pogojih ko se notranja struktura karagenanov ne podre (nedestruktivni strižni pogoji). Med meritvami smo spremenjali frekvenco oscilacije in s tem tudi hitrost vnesene strižne deformacije. Frekvenčna odvisnost nam predstavlja spekter odzivov snovi (viskoznih in elastičnih) na časovni potek eksperimenta. Slika 23 prikazuje odvisnost dinamičnih količin  $G'$  in  $G''$  od hitrosti frekvence oscilacije (kotna hitrost) (31). Vrednosti  $G'$  in  $G''$  za posamezne vzorce so prikazane v *Prilogi I*.



Slika 22: Slika prikazuje odvisnost dinamičnih količin  $G'$  in  $G''$  od  $\gamma$ .

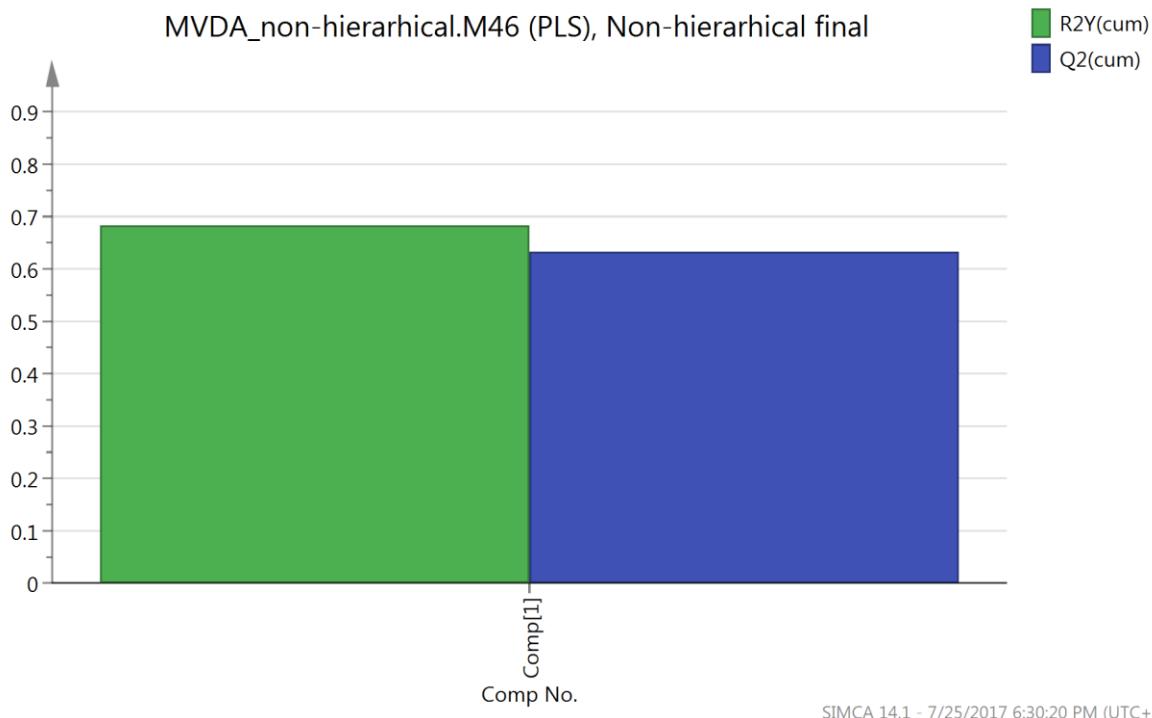


Slika 23: Slika prikazuje odvisnost dinamičnih količin  $G'$  in  $G''$  od  $\omega$ .

## 5. REZULTATI IN RAZPRAVA

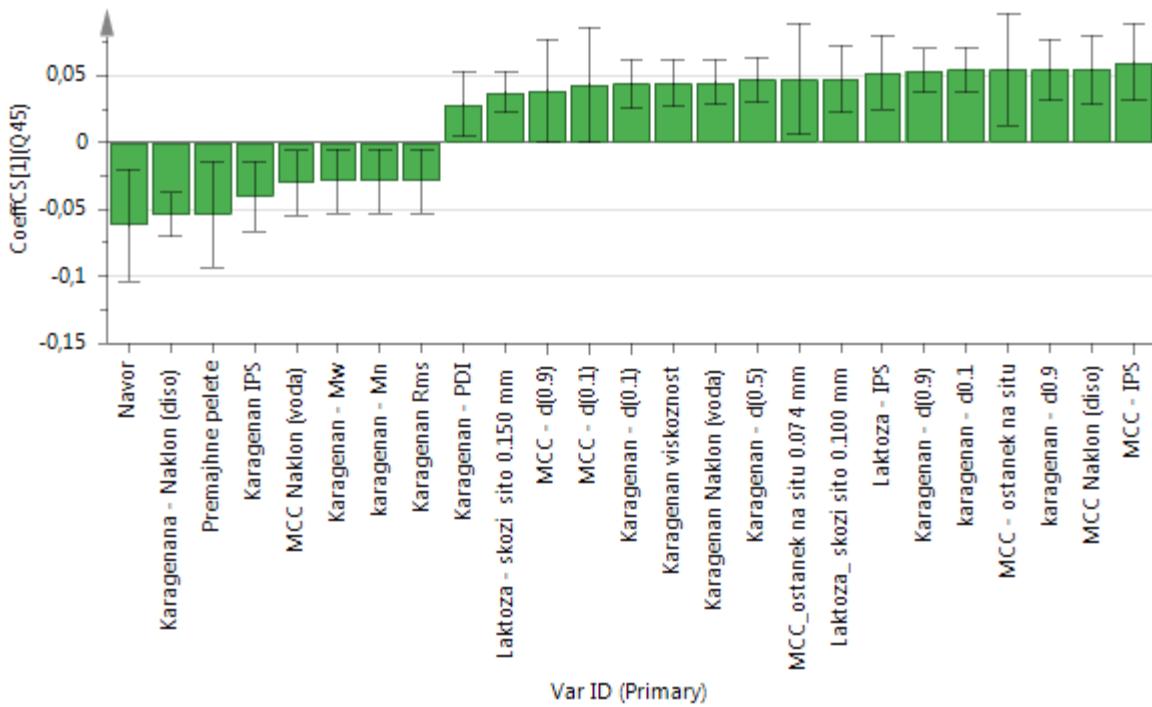
V magistrski nalogi smo proučevali vpliv fizikalno-kemijskih lastnosti pomožnih snovi, kot sta MCC in  $\kappa$ -karagenan ter procesnih parametrov pri izdelavi pelet z metodo iztiskanja in krogličenja. Za izgradnjo modela smo uporabili 117 spremenljivk (formulacijske in procesne spremenljivke) ter rezultate hitrosti sproščanja modelne ZU iz proizvodnih serij izdelka.

Model vpliva potencialnih CMA-jev in CPP-jev lahko opišemo z eno komponento (največji % variabilnosti lahko ponazorimo s prvo glavno komponento) (Slika 24).



Slika 24: Povzetek napovedi modela za hitrost sproščanja modelne zdravilne učinkovine z upoštevanjem procesnih in formulacijskih spremenljivk ( $R^2=0.673$ ;  $Q^2=0.632$ ).

Iz modela smo izključili faktorje, ki nimajo statistično značilnega vpliva ter tudi tiste, ki so medsebojno korelirani. Na osnovi rezultatov lahko zaključimo, da na hitrost sproščanja modelne ZU vpliva 15 procesnih in formulacijskih parametrov. Določeni parametri opisujejo enako fizikalno lastnost surovin, kot je npr. velikost delcev (podatki iz metode LD in sejalne analize) in smo jih upoštevali kot eno spremenljivko.



Slika 25: Graf koeficientov vpliva posameznih procesnih in formulacijskih spremenljivk na proučevani odziv - hitrost sproščanja ZU.

### Legenda:

- Navor – končna točka granulacije
- MCC naklon in  $\kappa$  – karagenan naklon (diso) – stopnja nabrekanja v disolucijskem mediju (0,04 M trinatrijiev fosfat z 1% NaLS)
- Premajhne pelete – % pelet pod sitom
- IPS – izguba pri sušenju  $\kappa$  – kareganana, MCC in laktoze
- MCC naklon in  $\kappa$  – karagenan naklon – stopnja nabrekanja v vodi (hitrost pronicanja vode v material)
- $\kappa$  – karagenan Mw – utežno povprečje molekulske mase
- $\kappa$  – karagenan Mn – številčno povprečje molekulske mase
- $\kappa$  – karagenan Rms – radij sukanja (ang. *radius of rotation*)
- $\kappa$  – karagenan PDI – širina porazdelitve molekulske mase

- Laktoza skozi sito 0.100 mm in 0.150 mm – delci laktoze manjši od 0.100 mm in od 0.150 mm
- vrednosti  $D_{10}$ ,  $D_{50}$  in  $D_{90}$  – porazdelitev velikost delcev MCC in  $\kappa$  – karagenanov
- $\kappa$  – karagenan viskoznost – specifikacijski parameter določen s pomočjo Brukfildovega viskozimetra
- MCC ostanek na situ 0.074 mm – delci MCC večji od 0.074 mm

Uporabili smo logaritemsko skalo za prikaz odziva (CQA – hitrost raztpljanja ZU v 45 minut), zato imajo vse spremenljivke inverzni vpliv na proučevani CQA.

### ***1. Negativen vpliv na hitrost sproščanja ZU***

Negativen vpliv na hitrost sproščanja imajo naslednji parametri:

- velikost delcev  $\kappa$  – karagenana ( $D_{10}$ ,  $D_{50}$ ,  $D_{90}$ ),
- velikost delcev MCC ( $D_{10}$ ,  $D_{50}$ ,  $D_{90}$ ),
- velikosti delcev MCC in laktoze iz sejalne analize,
- hitrost pronicanja vode v  $\kappa$  – karagenanih (ovrednoten s pomočjo vode ali dissolucijskega medija),
- viskoznost  $\kappa$  – karagenana,
- izguba pri sušenju laktoza,
- izguba pri sušenju MCC,
- širina porazdelitve molekulske mase  $\kappa$  – karagenana.

Zmanjševanje velikosti delcev je eden izmed starejših pristopov za pospeševanje raztpljana ZU. Z zmanjšanjem velikosti delcev povečamo specifično površino in s tem izboljšamo interakcije med ZU in topilom (33). Večji delci  $\kappa$  – karagenana in MCC vplivajo na upočasnjevanje hitrosti raztpljanja ZU zaradi manjše površine, ki je na voljo za nabrekanje. Hidratiranost  $\kappa$  – karagenana je ključna pri povezovanju verig, saj se na tak način zmanjšajo odbojne sile med verigami polimerov, kar vodi v nastanek gelske strukture (34). Torej ob hitrejšem pronicanju vode v strukturo  $\kappa$  – karagenana pride do nastanka gela, ki upočasnuje hitrost raztpljanja modelne ZU iz pelet.

Viskoznost je odvisna od molekulske mase. Višja viskoznost  $\kappa$  – karagenana vpliva na nastanek bolj togega gela, iz katerega se modelna ZU počasnejše razaplja. Širša kot je porazdelitev  $M_w$ , počasnejše je razapljanje ZU iz pelet zaradi bolj kompaktnega prepletanja polimernih verig ter nastanka rigidnega gela (35).

Laktoza v strukturi pelet ima vlogo tvorilca por. Laktoza se raztopi in posledično ustvari pore, kar vpliva na povečan vdor vode v peletno jedro. S povečevanjem koncentracije laktoze v formulaciji, se povečuje tudi vdor vode, kar se kaže v povečanem nabrekanju (36). Na osnovi MVA modela manjši kot so delci laktoze, manjši je % raztopljene ZU v času. To lahko pojasnimo s hitrejšim vdorom vode v peletna jedra, kar omogoča hitrejšo tvorbo gela (hitrejše nabrekanje  $\kappa$  – karagenana in MCC). Iz znanstvene literature je razvidno, da večji delci MCC in višji % vlage v materialu omogočata počasnejše sproščanje ZU, kar smo tudi potrdili z MVA modelom (37, 38).

## **2. Pozitiven vpliv na hitrost sproščanje ZU**

Pozitiven vpliv na hitrost sproščanja imajo naslednji parametri:

- navor pri granulaciji,
- molekulska masa  $\kappa$  – karagenana,
- radij sukanja  $\kappa$  – karagenana
- izguba pri sušenju  $\kappa$  – karagenana,
- hitrost pronicanja vode v MCC
- % premajhnih pelet.

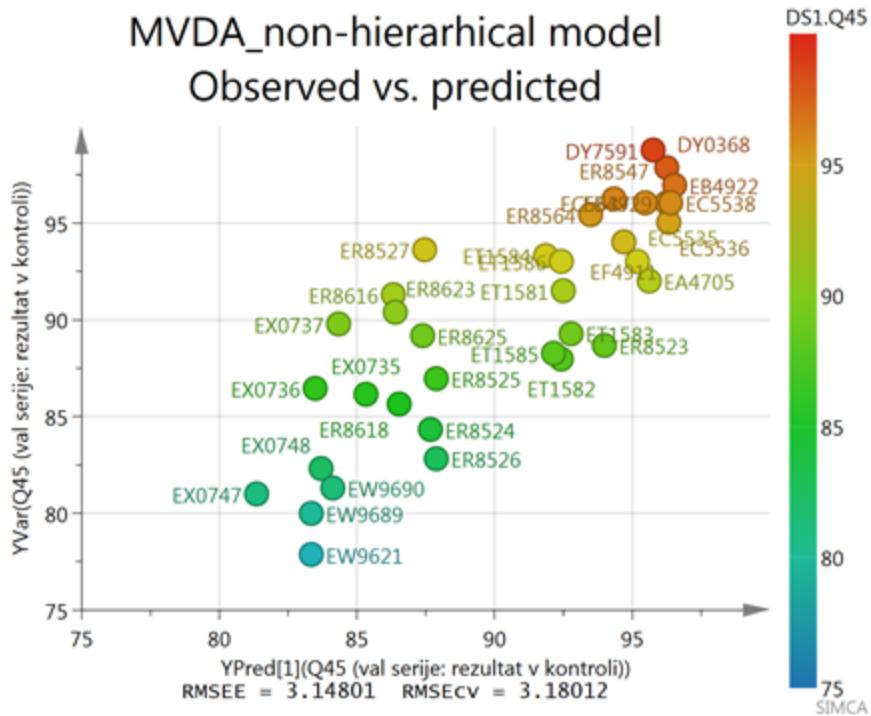
Spremljanje navora v fazi vlažne granulacije omogoča dobro kontrolo procesa. Višji navor pri granulaciji potencira hitrost razapljanja modelne ZU zaradi boljšega močenja oziroma ustrezeno aglomerirane slabo topne ZU s pomočjo granulacijske raztopine močljivca (natrijev lavril sulfat). Večji % premajhnih pelet omogoča hitrejše razapljanje modelne ZU, zaradi večje površine, ki je na voljo za razapljanje ZU (33). Hitrejše pronicanje vode v MCC (večji kot je naklon premice) omogoča hitrejše nabrekanje MCC, kar vpliva na hitrejše močenje ZU in s tem v povezavi hitrejše razapljanje (36).

Molekulska masa polimera in porazdelitev le-te vpliva na sproščanje ZU, saj je povezana z viskoznostjo in močjo nastalega gela ter ima odločilno vlogo pri prehodu vode v peletno jedro med nabrekanjem polimernih verig. Molekulska masa je določena z dolžino polimerne verige. Porazdelitev dolžin verig  $\kappa$  – karagenana opišemo s PDI, ki je definiran kot razmerje med  $M_w$  in  $M_n$ . Večja kot je vrednost PDI, širšo porazdelitev molekulskih masi ima  $\kappa$  – karagenan. Višja molekulska masa pomeni višjo stopnjo nabrekanja, s tem se tvori močnejši in bolj gost gel, ki vpliva na počasnejše sproščanje ZU (35). Vpliv  $M_w \kappa$  – karagenana iz MVA modela ni v skladu z literaturnimi podatki. Višja  $M_w$  pomeni večjo viskoznost  $\kappa$  – karagenana ter posledično počasnejše sproščanje modelne ZU (35). Rezultat bomo dodatno raziskali ter ga primerjali z obstoječimi literaturnimi podatki.

Radius sukanja polimerne verige  $\kappa$  – karagenana ima pozitiven vpliv na hitrost raztpljanja modelne ZU, saj definira večjo velikost por ter posledično hitrejše močenje ZU in raztpljanje (39).

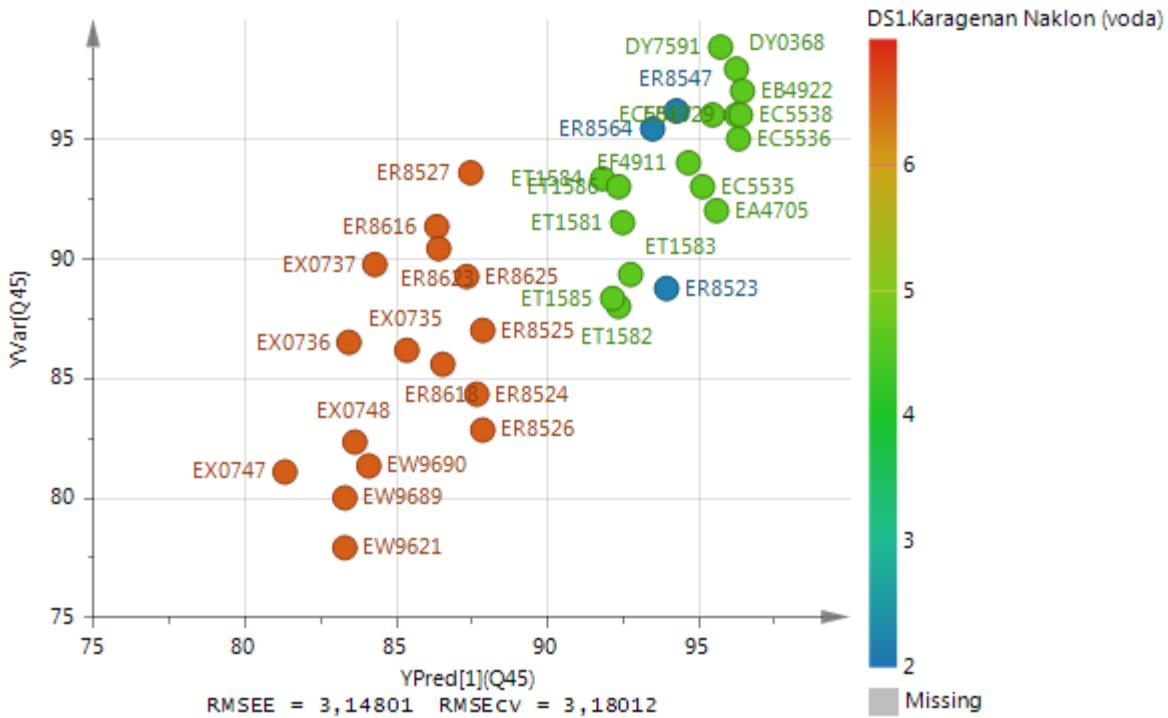
Vsebnost vlage v  $\kappa$  – karagenanih se določa s pomočjo izgube pri sušenju. Večja izguba pomeni večjo vsebnost vlage v strukturi  $\kappa$  – karagenana. Molekule  $\kappa$  – karagenana tvorijo vodikove vezi z molekulami ZU. Ob povišani vsebnosti vlage, absorbirane molekule vode prekinejo vodikove vezi med  $\kappa$  – karagenanom in ZU, kar se kaže v hitrejšem sproščanju ZU iz peletnega jedra (40).

Kljub temu, da v formulacijo izdelka vstopa modelna ZU v visokem procentu, njene lastnosti nismo potrdili kot kritične (CMA). To lahko pojasnimo s pomanjkljivostjo podatkov o relevantnih fizikalno-kemijskih lastnosti, ki so v povezavi s proučevanim odzivom (hitrost raztpljanja) na trenutni specifikaciji izdelka. Iz tega razloga bomo model dopolnili z dodatnimi fizikalno-kemijskimi lastnosti in ovrednotili, ali so te kritične za hitrost raztpljanja.



Slika 26: Graf opazovanega in napovedanega odziva za hitrost raztopljanja modelne ZU v 45 minut. Rdeča barva opisuje serije s hitrejšim raztopljanjem, modra pa s počasnim.

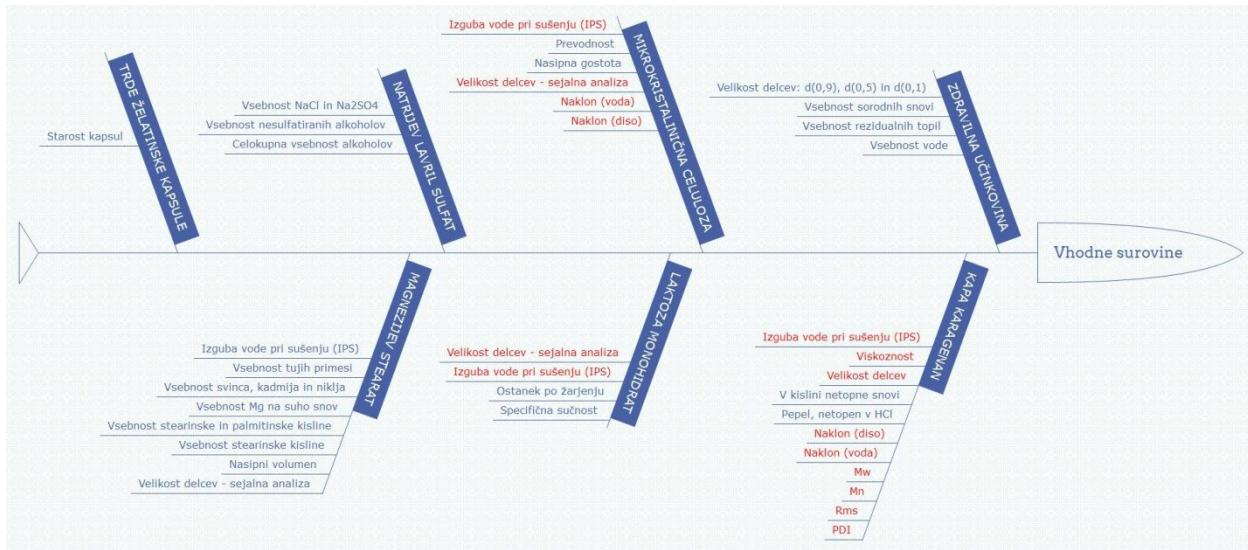
Graf odvisnosti opazovanega in napovedanega odziva je prikazan na sliki 26. Na osnovi rezultatov lahko sklepamo na dobro napovedno moč modela saj se podatka RMSEE (primerja napovedane in izmerjene vrednosti ter opisuje, ali je model zmožen opisati odziv – hitrost raztopljanja) in RMSECV (parameter RMSEE, pridobljen z navzkrižno validacijo) ujemata.



Slika 27: Graf opazovanega in napovedanega odziva za hitrost raztpljanja modelne ZU v 45 minut. Rdeča barva opisuje serije s počasnejšim raztpljanjem, v katere je vstopal  $\kappa$  – karagenan z najvišjo hitrostjo pronicanja vode (najhitrejše geliranje).

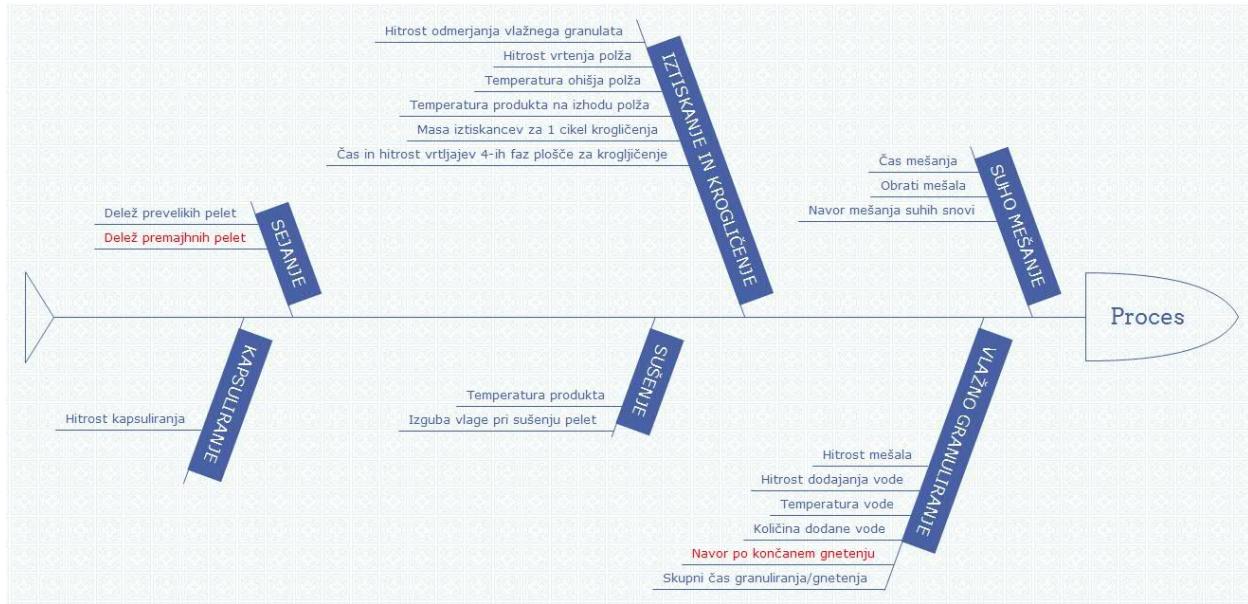
Na osnovi podatkov smo uspeli ugotoviti skupine serij, ki so imele podoben odziv – upočasnjeno raztpljanje ZU (rdeče označene na grafu opazovanega in napovedanega odziva). Pri izdelavi teh serij je vstopal  $\kappa$  – karagenan z najvišjo hitrostjo pronicanja vode oziroma najhitrejšim geliranjem. Intenzivno geliranje rezultira k upočasnjevanju hitrosti raztpljanja modelne ZU v 45 minut.

Na osnovi trenutnih rezultatov MVA modela smo definirali naslednje CMA (rdeča označeni na ribjem diagramu): **MCC** - IPS, velikost delcev MCC, hitrost pronicanja vode;  **$\kappa$  – karagenan** – IPS, viskoznost, velikost delcev, hitrost pronicanja vode,  $M_w$ , PDI, Rms; **laktoza monohidrat** – velikost delcev, IPS (Slika 28).



Slika 28: Kritične lastnosti surovin (CMA), ki smo jih definirali s pomočjo MVA modela. CMA smo označili z rdečo na ribjih diagramih.

CPP predstavljata delež premajhnih pelet pri sejanju ter navor pri granulaciji (Slika 29).



Slika 29: Kritični procesni parametri (CPP) ki smo jih definirali s pomočjo MVA modela. CPP smo označili z rdečo na ribjih diagramih.

## 6. SKLEP

V magistrski nalogi smo proučevali vpliv CMA vstopnih surovin in CPP (proces vlažne granulacije ter priprave pelet z metodo iztiskanja in krogličenja) na CQA (hitrost raztpljanja modelne ZU). V ta namen smo različnim serijam MCC in  $\kappa$  – karagenanom določili različne fizikalno-kemijske lastnosti, ki so relevantne za proučevani odziv.  $\kappa$  – karagenanom smo določili velikost delcev, močljivost, reološke lastnosti in molekularne lastnosti (molekulska masa, porazdelitev molekulske mase, radij sukanja). Pri proučevanju MCC pa smo se osredotočili na vrednotenje velikosti delcev in močljivost.

Multivariatni model smo razvili s pomočjo SIMCA P+ 14.0 programa, v katerega smo vključili še druge potencialne CPP in CMA. Za izgradnjo modela smo uporabili 117 spremenljivk (formulacijske in procesne spremenljivke). Na osnovi rezultatov smo ugotovili, da na hitrost sproščanja modelne ZU vpliva 15 procesnih in formulacijskih parametrov. Model, ki smo ga razvili je imel zadostno napovedno moč ( $R^2 = 0.673$  in  $Q^2 = 0.632$ ).

Definirali smo CMA in CPP s pozitivnim in negativnim vplivom na hitrost sproščanja ZU. Negativno na hitrost sproščanja ZU vpliva velikost delcev  $\kappa$  – karagenana, MCC in laktoze, hitrost pronicaanja vode v  $\kappa$  – karagenanih, izguba pri sušenju MCC in viskoznost  $\kappa$  – karagenana. Navor pri granulaciji, molekulska masa  $\kappa$  – karagenana, izguba pri sušenju  $\kappa$  – karagenana, hitrost pronicaanja vode v MCC in % premajhnih pelet so lastnosti s pozitivnim vplivom na hitrost sproščanja ZU. Vsi poučevani vplivi predstavljajo dejansko CMA ali CPP in kot takšni morajo biti kontrolirani s specifikacijo vstopnih surovin ali z operativnim rangom procesnega parametra v tehnološkem postopku.

Iz MVA modela nismo pridobili pričakovanega vpliva Mw  $\kappa$  – karagenana na hitrost sproščanja. Višja Mw pomeni večjo viskoznost  $\kappa$  – karagenana ter posledično počasnejše sproščanje modelne ZU (38). Naši rezultati pa kažejo pozitiven vpliv na sproščanje. Vpliv Mw bo dodatno raziskan. Lastnosti ZU trenutno nismo potrdili kot CMA, kar lahko pojasnimo s pomanjkljivostjo podatkov o relevantnih fizikalno-kemijskih lastnostih, ki so povezani s hitrostjo raztpljanja, na trenutni specifikaciji izdelka. Iz tega razloga bomo model dopolnili z dodatnimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi in ovrednotili, ali so te kritične za hitrost raztpljanja.

## 7. LITERATURA

- [1] Thommes M, Kleinebudde P: Use of  $\kappa$  – carrageenan as alternative pelletisation aid to microcrystalline cellulose in extrusion/spheronisation. I. Influence of type and fraction of filler. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2006; 63: 59-67.
- [2] Dukič-Ott A, Thommes M, Remon J.P, Kleinebudde P, Vervaet C: Production of pellets via extrusion-spheronisation without the incorporation of microcrystalline cellulose: A critical review. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2009; 71: 38-46.
- [3] Bornhöft M, Thommes M, Kleinebudde P: Preliminary assessment of carrageenan as excipient for extrusion/spheronisation. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2005; 59: 127-131.
- [4] Aulton A.E: Aulton's pharmaceutics: the design and manufacture of medicines, 3nd ed., Churchill Livingstone Elsevier, Edinburgh, New York, 2007: 419-421.
- [5] Soh J.L.P, Sarkar S, Heng P.W.S, Liew C.V: Pelletization Techniques. Encyclopedia of Pharmaceutical Science and Technology 2013; IV: 2515 – 2524.
- [6] Celik M: Pharmaceutical Powder Compaction Technology, 2nd ed., Informa Healthcare, New York, 2011: 151-154.
- [7] Kleinebudde P: The Crystallite-Gel-Model for Microcrystalline Cellulose in Wet-Granulation, Extrusion and Spheronization. Pharmaceutical Research 1997; 14(6): 804-809.
- [8] Wang J, Kan S, Chen T, Liu J: Application of quality by design (QbD) to formulation and processing of naproxen pellets by extrusion – spheronization. Pharmaceutical Development and Technology 2015; 20(2): 246-256.

- [9] Ferreira P.A, Tobyn M: Multivariate analysis in the pharmaceutical industry: enabling process understanding and improvement in the PAT and QbD era. Pharmaceutical Development and Technology 2015; 20(5): 513-527.
- [10] Kourti T: The Process Analytical Technology initiative and multivariate process analysis, monitoring and control. Anal Bioanal Chem 2006; 384: 1043-1048.
- [11] Yu LX: Pharmaceutical Quality by Design: Product and Process Development Understanding, and Control. Pharmaceutical Research 2008; 25(4): 781-791.
- [12] Thoorens G, Krier F, Leclercq B, Carlin B, Evrard B: Microcrystalline cellulose, a direct compression binder in a quality by design environment—A review. International Journal of Pharmaceutics 2014; 473: 64-72.
- [13] European Pharmacopoeia, 8nd. edition. Strasbourg: Council of Europe; 2013. Strasbourg : Council of Europe, cop. 2013
- [14] Poletto M, Ornaghi H.L: Cellulose - Fundamental Aspects and Current Trends, InTech, Rijeka, 2015: 159-191.
- [15] Carrageenan - FMC BioPolymer (PDF):  
[http://www.fmcbiopolymer.com/Portals/Pharm/Content/Docs/PS/13a\\_Carrageenan\\_an.pdf](http://www.fmcbiopolymer.com/Portals/Pharm/Content/Docs/PS/13a_Carrageenan_an.pdf) (Dostop: 01.02.2017).
- [16] Obreza A, Bevc B, Baumgartner S, Sollner Dolenc M, Humar M: Pomožne snovi v farmaciji: od njihovega poimenovanja do vloge v zdravilu. Spletni učbenik za študente farmacije, industrijske farmacije in kozmetologije, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2015.
- [17] AGARGEL: Carrageenan:  
<http://www.agargel.com.br/carrageenan-tec.html> (Dostop: 14.03.2017).
- [18] Picker-Freyer K.M: Carrageenans in Solid Dosage Form Design. Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Institute of Pharmacy, Halle (Saale), Germany, 2008: 469-492.

- [19] Miller J.N, Miller J.C: Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, 6nd Edition. Prentice Hall/Pearson, Harlow (England), 2010: 221-224.
- [20] MKS Umetrics AB: User Guide to Simca, Version 13, MKS Umetrics AB, Švedska 2012.
- [21] Umetrics: SIMCA – P and Multivariate Analysis, Frequently Asked Questions: [http://umetrics.com/sites/default/files/kb/multivariate\\_faq.pdf](http://umetrics.com/sites/default/files/kb/multivariate_faq.pdf) (Dostop: 28.08.2017).
- [22] FMC: Avicel: <http://www.fmcbiopolymer.com/Pharmaceutical/Products/Avicelforsoliddoseform.aspx> (Dostop: 14.03.2017).
- [23] FMC BioPolymer: Product Specification Bulletin: <http://www.signetchem.com/Content/Upload/Y9kKF9GelcarinPH812Specification.pdf> (Dostop: 29.08.2017).
- [24] FMC BioPolymer: Product Specification Bulletin: <http://www.signetchem.com/Content/Upload/95vn9kGelcarinPH911Specification.pdf> (Dostop: 29.08.2017).
- [25] KRÜSS: Products: <https://www.kruss.de/products/contact-angle/dsa100/drop-shape-analyzer-dsa100s/> (Dostop: 14.03.2017).
- [26] Yuehua Y, Randall Lee T: Contact Angle and Wetting Properties. Surface Science Techniques 2013; Springer Series in Surface Sciences 51: 3-34.
- [27] Horiba: A Guidebook to particle size analysis: [https://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/eMag/PSA/Guidebook/pdf/PSA\\_Guidebook.pdf](https://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/eMag/PSA/Guidebook/pdf/PSA_Guidebook.pdf) (Dostop: 01.02.2017).

- [28] Malvern Instruments Ltd: Software Reference:  
[https://www.labmerchant.com/cmsAdmin/uploads/mastersizer\\_s\\_and\\_micro\\_software\\_reference\\_manual\\_-\\_man0102.pdf](https://www.labmerchant.com/cmsAdmin/uploads/mastersizer_s_and_micro_software_reference_manual_-_man0102.pdf) (Dostop: 01.02.2017)
- [29] Mastersizer 2000: User Manual: [https://www2.warwick.ac.uk/fac/cross\\_fac/sciencecity/programmes/internal/themes/am2/booking/particlesize/mastersizer\\_2000\\_main\\_manual.pdf](https://www2.warwick.ac.uk/fac/cross_fac/sciencecity/programmes/internal/themes/am2/booking/particlesize/mastersizer_2000_main_manual.pdf) (Dostop: 01.02.2017)
- [30] ISO/DIS 13320: 1996(E): Particle size analysis – Guidance on laser diffraction methods: 1-15.
- [31] Zupančič Valant A: Uvod v reologijo, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 2007: 7-59.
- [32] Mezger G.T: The Rheology Handbook, For users of rotational and oscillatory rheometers, 2nd Edition, Vincentz, Hannover, 2006.
- [33] Maleki Dizaj S, Vazifehas Zh, Salatin S, Adibkia Kh, Javadzadeh Y: Nanosizing of drugs: Effect on dissolution rate. Research in Pharmaceutical Sciences 2015; 10(2): 95-108
- [34] Yuguchi Y, Urakawa H, Kajiwara K: Structural characteristics of carrageenan gels: various types of counter ions. Food Hydrocolloids 2003; 17 (4): 481-485.
- [35] Cowie J.M.G, Arrighi V: Introduction. In: Polymers: chemistry and physics of modern materials. CRC Press 2007: 1-28.
- [36] Tukaram B. N, Rajagopalan I. V, Ikumar Shartchandra P.S: The Effects of Lactose, Microcrystalline Cellulose and Dicalcium Phosphate on Swelling and Erosion of Compressed HPMC Matrix Tablets: Texture Analyzer. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 2010; 9(4): 349-358.
- [37] Tomer G, Patel H, Podczeck F, Newton J. M: Measuring the water retention capacities (MRC) of different microcrystalline cellulose grades. European Journal of Pharmaceutical Sciences 2001;12:321-325.

- [38] Railkar A. M, Schwartz J. B: The effects of formulation factors on the moist granulation technique for controlled-release tablets. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2001; 27(9): 893-898.
- [39] Govedarica B, Sovány T, Pintye-Hódi K, Skarabot M, Baumgartner S, Muševič I, Srčič S: Addressing potent single molecule AFM study in prediction of swelling and dissolution rate in polymer matrix tablets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2012; 80(1): 217-252.
- [40] Szakonyi G, Zelkó R: The effect of water on the solid state characteristics of pharmaceutical excipients: Molecular mechanisms, measurement techniques, and quality aspects of final dosage form. *International Journal of Pharmaceutical Investigation* 2012; 2(1): 18-25.

## Priloga I: Rezultati meritev na vzorcih κ - karagenanov

VZOREC	$\kappa \pm SD$	D <sub>10</sub>	D <sub>50</sub>	D <sub>90</sub>	Razpon	G'	G"
K1	$14,0 \pm 2,0$	17,20	68,62	176,80	2,33	$416,0 \pm 36,1$	$61,4 \pm 5,4$
K2	$6,6 \pm 1,7$	14,66	65,37	170,06	2,38	$453,9 \pm 17,5$	$66,4 \pm 3,0$
K3	$2,3 \pm 0,6$	13,57	68,36	173,06	2,44	$279,6 \pm 36,2$	$38,9 \pm 5,2$
K4	$11,4 \pm 1,8$	13,95	63,56	166,06	2,40	$562,1 \pm 7,6$	$82,0 \pm 1,2$
K5	$7,4 \pm 1,1$	14,73	68,30	167,87	2,25	$314,6 \pm 29,8$	$49,3 \pm 4,8$
K6	$11,7 \pm 1,5$	12,44	63,30	170,51	2,50	$1131,0 \pm 70,5$	$155,5 \pm 11,6$
K7	$10,6 \pm 1,8$	13,08	65,37	160,03	2,25	$923,1 \pm 10,9$	$140,3 \pm 2,8$
K8	$13,5 \pm 2,1$	12,90	43,39	92,96	1,85	/	/
K9	$19,6 \pm 2,3$	17,42	67,11	166,06	2,21	/	/
K10	$19,9 \pm 3,0$	16,96	63,90	160,85	2,25	/	/
K11	$9,7 \pm 1,1$	11,61	52,50	136,69	2,38	/	/
K12	$14,0 \pm 1,9$	18,79	71,78	178,42	2,22	$449,4 \pm 27,0$	$55,0 \pm 4,0$
K13	$12,2 \pm 1,8$	17,44	64,41	163,10	2,26	/	/
K14	$178,0 \pm 3,0$	12,81	56,71	147,53	2,37	/	/
K15	$10,2 \pm 0,9$	11,93	53,94	140,55	2,38	$370,6 \pm 8,7$	$55,0 \pm 1,4$
K16	$8,5 \pm 3,4$	11,75	52,62	137,98	2,40	$330,7 \pm 7,7$	$45,6 \pm 2,0$
K17	$2,1 \pm 0,7$	12,62	59,95	157,18	2,41	$755,8 \pm 16,6$	$119,6 \pm 1,9$
K18	$7,0 \pm 0,9$	16,71	67,85	167,52	2,22	$342,3 \pm 15,7$	$49,6 \pm 3,3$
K19	$5,5 \pm 0,8$	10,29	51,21	134,93	2,43	$312,2 \pm 41,4$	$39,1 \pm 4,6$
K20	$4,7 \pm 1,0$	13,85	62,86	158,90	2,31	$262,9 \pm 12,4$	$39,5 \pm 2,7$
K21	$10,4 \pm 1,0$	15,12	66,20	169,26	2,32	$215,0 \pm 9,0$	$33,7 \pm 3,7$
K22	$7,2 \pm 0,4$	15,74	68,74	173,15	2,29	$327,9 \pm 13,9$	$50,1 \pm 1,8$
K23	$3,7 \pm 1,3$	13,27	59,35	161,00	2,49	$930,2 \pm 46,4$	$142,2 \pm 7,0$
CAR1	$47,1 \pm 2,5$	14,83	80,00	217,77	2,54	$3008,1 \pm 195,7$	$364,4 \pm 20,5$
CAR2	$30,1 \pm 4,4$	13,17	78,34	214,68	2,57	$1084,4 \pm 42,4$	$154,3 \pm 5,3$
CAR3	$40,8 \pm 5,2$	12,56	76,99	210,03	2,57	$323,8 \pm 33,0$	$38,7 \pm 4,2$
CAR4	$40,0 \pm 4,5$	21,46	106,22	248,95	2,14	/	/
K911	$19,7 \pm 2,9$	11,58	56,28	144,29	2,36	$2036,2 \pm 38,0$	$216,7 \pm 3,1$

Opomba: S črko K so označeni κ –karagenani tipa GELCARIN GP-812, z oznako CAR so označeni κ –karagenani proizvajalca CARGIL (tip GP-812) in z oznako K911 je označen κ –karagenan GELCARIN GP-911.

## Priloga II: Rezultati meritev na vzorcih MCC

VZOREC	k ± SD	D <sub>10</sub>	D <sub>50</sub>	D <sub>90</sub>	Razpon
MCC101-1	1,26 ± 0,14	22,55	66,06	136,11	1,72
MCC101-2	1,07 ± 0,09	22,49	67,23	138,08	1,72
MCC101-3	1,10 ± 0,07	23,74	68,57	137,13	1,65
MCC101-4	0,60 ± 0,03	22,48	67,63	150,09	1,89
MCC101-5	0,89 ± 0,09	23,43	70,29	139,12	1,65
MCC101-6	0,97 ± 0,14	24,53	69,19	139,81	1,67
MCC101-7	0,74 ± 0,05	20,86	62,99	127,39	1,69
MCC101-8	0,84 ± 0,12	21,72	68,40	144,28	1,79
MCC101-9	0,65 ± 0,03	19,75	67,35	141,19	1,80
MCC101-10	0,66 ± 0,08	23,00	68,94	141,00	1,71
MCC101-11	0,61 ± 0,07	22,37	69,75	144,21	1,75
MCC101-12	0,66 ± 0,03	21,20	68,78	142,00	1,76
MCC101-13	0,78 ± 0,03	20,40	62,60	136,54	1,86
MCC101-14	0,65 ± 0,06	21,38	66,23	137,23	1,75
MCC101-15	0,54 ± 0,08	23,53	68,13	138,36	1,69
MCC101-16	0,74 ± 0,03	22,58	66,73	131,68	1,64
MCC101-17	0,69 ± 0,05	23,62	69,17	141,88	1,71
MCC101-18	0,61 ± 0,06	23,03	68,60	140,39	1,71
MCC101-19	0,79 ± 0,06	22,34	66,91	134,77	1,68
MCC101-20	0,65 ± 0,06	21,70	67,74	140,80	1,76
MCC101-21	0,67 ± 0,11	23,10	68,85	143,50	1,75
MCC101-22	0,67 ± 0,03	20,85	68,54	143,68	1,79
MCC101-23	0,70 ± 0,13	21,83	65,52	136,21	1,75
MCC101-24	0,73 ± 0,09	22,31	70,48	149,95	1,81
MCC101-25	0,72 ± 0,02	17,33	60,68	136,54	1,97
MCC112-1	0,74 ± 0,04	34,86	112,74	237,32	1,80
MCC112-2	0,56 ± 0,02	29,38	118,37	273,06	2,06
MCC112-3	0,56 ± 0,08	22,83	97,54	237,84	2,21
MCC200-1	0,67 ± 0,08	46,41	154,97	314,78	1,73
MCC200-2	0,67 ± 0,01	112,69	249,13	418,54	1,23

Opomba: Z oznako MCC101 so označene MCC Ph101, z MCC112 oznako MCC Ph112 in z MCC200 oznako MCC Ph200.