

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LIDIJA KLANJŠEK

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM
INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LIDIJA KLANJŠEK

**VREDNOTENJE PROSTIH MAŠČOBNIH KISLIN V
POLISORBATHI Z JEDRSKO MAGNETNO REZONANCO
IN Z DOLOČANJEM KISLINSKEGA ŠTEVILA**

**EVALUATION OF FREE FATTY ACIDS IN
POLYSORBATES WITH NUCLEAR MAGNETIC
RESONANCE AND BY DETERMINATION OF THE ACID
VALUE**

MASTER'S STUDY PROGRAMME INDUSTRIAL PHARMACY

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvomizr. prof. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju dr. Janezu Mravljaku, mag. farm. za vso pomoč in strokovne nasvete pri izdelavi magistrske naloge.

Zahvaljujem se tudi staršem in vsem ostalim, ki so mi bili v podporo v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvomizr. prof. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm.

Lidija Klanjšek

Ljubljana, 2018

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	VI
ABSTRACT	VII
SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
1. UVOD.....	1
1.1 Površinsko aktivne snovi	2
1.1.1 Mehanizmi stabilizacije bioloških zdravil s PAS	3
1.2 Polisorbati.....	4
1.2.1 (Ne)stabilnost polisorbatov.....	7
1.2.1.1 Avtooksidacija	7
1.2.1.2 Hidroliza	9
1.2.1.3 Dejavniki za nastanek in posledice razgradnih reakcij PS	10
1.3 Metode določanja vsebnosti prostih maščobnih kislin	10
1.3.1 Jedrska magnetna resonanca ali NMR-spektroskopija.....	10
1.3.1.1 Princip delovanja	11
1.3.1.2 Kemijski premik	12
1.3.1.3 Kemijska ekvivalenca.....	13
1.3.1.4 Integral.....	13
1.3.2 Določanje kislinskega števila	13
2. NAMEN DELA	15
3. MATERIALI IN METODE	16
3.1 MATERIALI	16
3.1.1 Reagenti in topila.....	16
3.1.2 Laboratorijski material	16
3.1.3 Laboratorijska oprema.....	17
3.1.4 Vzorci	17
3.1.4.1 Sveža vzorca polisorbata 20 in polisorbata 80	17
3.1.4.2 Vzorci polisorbatov s pretečenim rokom uporabnosti.....	17
3.2 METODE	18
3.2.1 Priprava vzorcev PS 20 in PS 80 z dodatki standarda maščobne kisline	18
3.2.2 Analiza z NMR-spektroskopijo	19
3.2.3 Določanje kislinskega števila	20

3.2.3.1 Priprava raztopine fenolftaleina R1	20
3.2.3.2 Priprava in standardizacija 1 M raztopine NaOH.....	20
3.2.3.3 Priprava 0,1 M raztopine NaOH.....	21
3.2.3.4 Določanje kislinskega števila vzorcem polisorbitov.....	21
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	22
4.1 Primerjava rezultatov metod NMR in določanja kislinskega števila	22
4.1.1 Rezultati analize z NMR-spektroskopijo.....	22
4.1.2 Rezultati določanja kislinskega števila.....	37
4.1.3 Primerjava rezultatov metode NMR in določanja kislinskega števila.....	39
4.1.4 Določanje korelacije metod	40
4.2 Določanje vsebnosti prostih MK v vzorcih PS s pretečenim rokom uporabnosti	41
4.2.1 Rezultati analize z NMR-spektroskopijo.....	41
4.2.2 Rezultati določanja kislinskega števila.....	45
4.2.3 Primerjava rezultatov metode NMR in določanja kislinskega števila.....	46
5. SKLEP	49
6. LITERATURA	50
7. PRILOGE	52
7.1 Priprava vzorcev PS 20 in PS 80 z dodatki standarda MK	52
7.1.1 Vzorci PS 20.....	52
7.1.2 Vzorci PS 80.....	52
7.2 Analiza vzorcev PS s pretečenim rokom uporabnosti z metodo NMR.....	52
7.3 Standardizacija 1 M raztopine NaOH po predpisu iz <i>USP 32</i>	61
7.4 Določanje kislinskega števila vzorcem PS po predpisu iz <i>Ph.Eur 8.0</i>	61
7.4.1 Vzorci PS 20.....	61
7.4.2 Vzorci PS 80.....	62
7.4.3 Vzorci PS s pretečenim rokom uporabnosti	63

Kazalo slik

Slika 1: Shematski prikaz molekule PAS.....	2
Slika 2: Urejanje molekul PAS ob povečevanju njihove koncentracije.....	2
Slika 3: Splošna strukturna formula polisorbata.....	5
Slika 4: Strukturna formula lavrinske kisline.....	5
Slika 5: Strukturna formula oleinske kisline.....	6
Slika 6: Shematični prikaz reakcij avtooksidacije vzdolž etilenoksidnega dela PS.....	8
Slika 7: Shematični prikaz lipidne peroksidacije na verigah maščobnih kislin PS.....	9
Slika 8: Shematični prikaz kemično katalizirane hidrolize PS.....	9
Slika 9: Pretvorba zapisa nihanja iz časovne domene v frekvenčno s FT.....	12
Slika 10: Reakcija nevtralizacije kislih komponent v vzorcu.....	14
Slika 11: Ravnotežna reakcija fenolftaleina v prisotnosti vode.....	14
Slika 12: Strukturna formula molekule polisorbata 80.....	23
Slika 13: NMR-spekter svežega vzorca PS 20, posnetega v CD ₃ OD.....	23
Slika 14: NMR-spekter svežega vzorca PS 80, posnetega v CD ₃ OD.....	24
Slika 15: NMR-spektri vzorcev PS 20 z dodatki LA, posnetih v CD ₃ OD.....	26
Slika 16: NMR-spektri vzorcev PS 80 z dodatki OA, posnetih v CD ₃ OD.....	27
Slika 17: NMR-spektri vzorcev PS 20 z dodatki LA, posnetih v CDCl ₃	28
Slika 18: NMR-spektri vzorcev PS 80 z dodatki OA, posnetih v CDCl ₃	29
Slika 19: NMR-spektri vzorcev PS 20 z dodatki LA, posnetih v DMSO- <i>d</i> ₆	30
Slika 20: NMR-spektri vzorcev PS 80 z dodatki OA, posnetih v DMSO- <i>d</i> ₆	31
Slika 21: Izseki iz NMR-spektrov vzorcev PS 20 z dodatki LA, posnetih v CD ₃ OD.....	32
Slika 22: Izseki iz NMR-spektrov vzorcev PS 80 z dodatki OA, posnetih v CD ₃ OD.....	32
Slika 23: Izseki iz NMR-spektrov vzorcev PS 20 z dodatki LA, posnetih v CDCl ₃	33
Slika 24: Izseki iz NMR-spektrov vzorcev PS 80 z dodatki OA, posnetih v CDCl ₃	33
Slika 25: Izseki iz NMR-spektrov vzorcev PS 20 z dodatki LA, posnetih v DMSO- <i>d</i> ₆	34
Slika 26: Izseki iz NMR-spektrov vzorcev PS 80 z dodatki OA, posnetih v DMSO- <i>d</i> ₆	34
Slika 27: Vrednosti \int za proste MK v odvisnosti od % LA v vzorcu PS 20.....	36
Slika 28: Vrednosti \int za proste MK v odvisnosti od % OA v vzorcu PS 80.....	36
Slika 29: Vrednosti I _A v odvisnosti od % LA v vzorcu PS 20.....	38
Slika 30: Vrednosti I _A v odvisnosti od % OA v vzorcu PS 80.....	38
Slika 31: Vrednosti I _A v odvisnosti od vrednosti \int za proste MK v PS 20.....	40

Slika 32: Vrednosti I_A v odvisnosti od vrednosti \int za proste MK v PS 80.	41
Slika 33: Celotni NMR-spektri vzorcev polisorbato 1-5.	42
Slika 34: Celotna NMR-spektra vzorcev polisorbato 6 in 7.	43
Slika 35: Izseki iz NMR-spektrov vzorcev 1-5 (polisorbati 20).	44
Slika 36: Izseka iz NMR-spektrov vzorcev 6 in 7 (polisorbata 80).	44
Slika 37: Celotni NMR-spekter vzorca 1.	54
Slika 38: Celotni NMR-spekter vzorca 2.	55
Slika 39: Celotni NMR-spekter vzorca 3.	56
Slika 40: Celotni NMR-spekter vzorca 4.	57
Slika 41: Celotni NMR-spekter vzorca 5.	58
Slika 42: Celotni NMR-spekter vzorca 6.	59
Slika 43: Celotni NMR-spekter vzorca 7.	60

Kazalo preglednic

Preglednica I: Specifikacije vsebnosti maščobnih kislin v PS 20 in PS 80 (7, 9).	6
Preglednica II: Analizirana sveža vzorca polisorbato.	17
Preglednica III: Analizirani vzorci polisorbato s pretečenim rokom uporabnosti.	17
Preglednica IV: Vrednosti \int in deležev prostih MK vzorcev PS 20 z različ. dodatki LA. ...	35
Preglednica V: Vrednosti \int in deležev prostih MK vzorcev PS 80 z različ. dodatki OA. ...	35
Preglednica VI: Vrednosti I_A vzorcev PS 20 z različnimi dodatki LA.	37
Preglednica VII: Vrednosti I_A vzorcev PS 80 z različnimi dodatki OA.	37
Preglednica VIII: Vrednosti \int in deležev prostih MK za vzorce s pretečenim rokom.	45
Preglednica IX: Vrednosti I_A za vzorce s pretečenim rokom.	45
Preglednica X: Natehtane mase vzorca PS 20 v plastičnih centrifugirkah (m_{PS}), izračunane potrebne mase standarda LA za dodatek PS 20 (potrebne m_{MK}), natehtane dodane mase standarda LA (dodane m_{MK}) in izračunane točne vsebnosti standarda LA v vzorcih PS 20 (% dodane MK).	52
Preglednica XI: Natehtane mase vzorca PS 80 v plastičnih centrifugirkah (m_{PS}), izračunane potrebne mase standarda OA za dodatek PS 80 (potrebne m_{MK}), natehtane dodane mase standarda OA (dodane m_{MK}) in izračunane točne vsebnosti standarda OA v vzorcih PS 80 (% dodane MK).	52

Preglednica XII: Natehtane mase $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ ($m_{\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4}$), volumni porabe 1 M raztopine NaOH (V_{NaOH}), izračunane točne koncentracije 1 M raztopine NaOH (c) in izračunana povprečna koncentracija 1 M raztopine NaOH (M).....	61
Preglednica XIII: Natehtane mase vzorcev PS 20 z dodatki LA (m_V), volumni porabe 0,1 M raztopine NaOH (V_{NaOH}), izračunana kislinska števila (I_A) in izračunana povprečja kislinskih števil z RSD (I_A).....	61
Preglednica XIV: Natehtane mase vzorcev PS 80 z dodatki OA (m_V), volumni porabe 0,1 M raztopine NaOH (V_{NaOH}), izračunana kislinska števila (I_A) in izračunana povprečja kislinskih števil z RSD (I_A).....	62
Preglednica XV: Natehtane mase vzorcev PS s pretečenim rokom uporabnosti (m_V), volumni porabe 0,1 M raztopine NaOH (V_{NaOH}), izračunana kislinska števila (I_A) in izračunana povprečja kislinskih števil z RSD (I_A).....	63

Kazalo enačb

Enačba 1: Izračun potrebne mase standarda MK [mg] za dodatek PS.....	19
Enačba 2: Izračun točne vsebnosti standarda MK [%] v vzorcu.....	19
Enačba 3: Izračun točne koncentracije raztopine NaOH [M].....	20
Enačba 4: Izračun kislinskega števila [/].	21
Enačba 5: Izračun deleža molekul prostih MK glede na vsebnost vseh molekul MK [%].	35
Enačba 6: Izračun množine snovi [g/mol].....	39

POVZETEK

V razvoju biološkega zdravila je eno izmed pomembnih področij vrednotenje njegove stabilnosti. Najpogostejši način za stabilizacijo proteinskih formulacij je uporaba površinsko aktivnih snovi. Dandanes se široko uporabljajo polisorbati, ki pa so zaradi funkcionalnih skupin, ki jih vsebujejo molekule, nagnjeni k razgradnji. Za farmacevtsko industrijo je torej zelo pomembna karakterizacija polisorbatov, ki so v stiku z aktivno farmacevtsko učinkovino in drugimi pomožnimi snovmi, zato so dobri analizni pristopi ter uporaba hitrih in preprostih analiznih metod ključnega pomena. Končni cilj mora biti zlasti razumevanje, predvidevanje in preprečevanje neželenega vpliva razgradnje polisorbatov na stabilnost proteinov v bioloških zdravilih.

V okviru magistrske naloge smo ovrednotili kakovost izbranih polisorbatov 20 in 80 z določanjem vsebnosti prostih maščobnih kislin, ki so lahko v polisorbatih prisotne kot sintezni intermediati ali pa kot posledica razgradnje polisorbatov z avtooksidacijo in hidrolizo estrov. Za določanje vsebnosti prostih maščobnih kislin smo uporabili metodo jedrske magnetne resonance in farmakopejsko metodo določanja kislinskega števila.

Rezultate obeh metod smo primerjali med seboj in ugotovili, da sta metodi med seboj primerljivi. Primerjali smo tudi rezultate vzorcev s pretečenim rokom uporabnosti in ugotovili, da se vsebnost prostih maščobnih kislin v polisorbatih sčasoma povečuje. Največje vrednosti smo izmerili pri najstarejšem vzorcu, najmanjše vrednosti pa smo izmerili pri najmlajšem vzorcu glede na datum proizvodnje.

Ključne besede: jedrska magnetna resonanca, kislinsko število, maščobna kislina, polisorbati, razgradnja.

ABSTRACT

One of the important areas of evaluation during the development of biopharmaceutical is its stability. The most common way to stabilize protein formulations is the use of surfactants. Polysorbates are widely used but due to its functional groups they are prone to decomposition. Therefore, is very important the characterization of polysorbates, which are in contact with the active pharmaceutical ingredient and other excipients. For pharmaceutical industry good analytical approaches and the use of rapid and simple analytical methods are of key importance. The ultimate goal should be understanding, anticipating and preventing the undesirable effect of the degradation of polysorbates on the stability of proteins in biopharmaceuticals.

The topic of the master's thesis was evaluation of the quality of selected polysorbates 20 and 80 by determining the free fatty acid content that can be present in the polysorbates as synthetic intermediates or as a result of degradation of polysorbates by autooxidation and hydrolysis of esters. To determine the free fatty acid content, nuclear magnetic resonance and the pharmacopoeia method for determining the acid number were used.

The results of both methods were compared and found that the methods are interchangeable. The results of elapsed shelf life samples of polysorbates showed that the free fatty acid content in polysorbates increased over time. The highest values were measured at the oldest sample and the lowest values were measured at the youngest sample according to the date of production.

Key words: nuclear magnetic resonance, acid number, fatty acid, polysorbates, decomposition.

SEZNAM OKRAJŠAV

CMC	kritična micelarna koncentracija (ang. » <i>Critical Micelle Concentration</i> «)
DMSO-<i>d</i>₆	devteriran dimetilsulfoksid
FID	signal proste precesije (ang. » <i>Free Induction Decay</i> «)
FT	Fourierjeva transformacija
I_A	kislinsko število (ang. » <i>Acid Value</i> «)
LA	lavrinska kislina (ang. » <i>Lauric Acid</i> «)
MK	maščobna kislina
MM	molekulska masa
NMR	jedrska magnetna resonanca (ang. » <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> «)
OA	oleinska kislina (ang. » <i>Oleic Acid</i> «)
PAS	površinsko aktivna snov
POE	polioksietilen
PS 20	polisorbat 20 (Tween® 20)
PS 80	polisorbat 80 (Tween® 80)
PS	polisorbat
RSD	relativni standardni odklon (ang. » <i>Relative Standard Deviation</i> «)
TMS	tetrametilsilan
∫	integral
δ	kemijski premik

1. UVOD

Pri razvijanju bioloških zdravil je tako kot pri drugih farmacevtskih izdelkih razvoj formulacije eden od ključnih korakov. Pravilna formulacija farmacevtskih izdelkov je namreč bistvena za dolgoročno stabilnost in ponovljivo aktivnost proteinov kot terapevtskih učinkovin ter uspešno dostavo parenteralnih zdravil (1, 2).

Razvoj stabilnih proteinskih formulacij je lahko precej zahteven zaradi kompleksne zgradbe proteinov in njihove občutljive strukturne stabilnosti. Za ohranjanje biološke aktivnosti je treba proteine na splošno vzdrževati v specifični tridimenzionalni konformaciji. Ta konformacija je le rahlo stabilna in zato sorazmerno manjše stresne sile lahko motijo strukturo proteinov, povzročijo izgubo biološke aktivnosti ali imunološki odziv. Na takšne motnje pogosto naletimo med proizvodnjo z industrijskimi postopki, kot so mešanje, filtriranje, segrevanje, zamrzovanje, odtajevanje, liofilizacija in sušenje z razprševanjem, ter med shranjevanjem, transportom in dostavo terapevtskih izdelkov pacientom. Pri tem so proteinske učinkovine nenehno izpostavljene številnim površinam vsebnikov (npr. notranjim stenam katetrskih cevi ali brizg), kot so steklo, plastični polimeri in nerjavno jeklo, ter medfazam, kot so zrak, kristali ledu in silikonsko olje. To lahko privede do adsorpcije, denaturacije in agregacije proteinov ter s tem izgube konformacijske celovitosti in posledično zmanjšanja koncentracije terapevtsko učinkovite oblike (1, 3, 4).

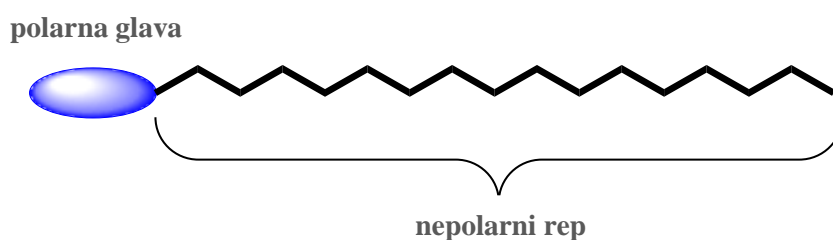
Na splošno se biološka zdravila razvijejo pod predpostavko, da bo med proizvodnjo in shranjevanjem prišlo do določene stopnje fizikalno-kemijskih sprememb. Ker je nemogoče razviti povsem stabilno formulacijo, postane glavni cilj ohranjanje ustrezne varnosti in učinkovitosti izdelka (3).

Za preprečevanje fizičnih poškodb proteinov med proizvodnimi procesi in njihovo stabilizacijo v izdelku se proteinskim farmacevtskim izdelkom pogosto dodaja **površinsko aktivne snovi (PAS)** ali surfaktante. Kot stabilizator za preprečevanje površinske adsorpcije v številnih proteinskih formulacijah se je prvotno uporabljal humani serumski albumin (HSA). Kot nadomestki HSA pa se danes vse bolj uporabljajo **polisorbati**. Vendar jih je treba uporabljati previdno, saj lahko pri nekaterih razmerah njihova razgradnja povzroči zmanjšano sposobnost za zaščito formulacije pred združevanjem medfaz in nastanek razgradnih produktov. To pa lahko potencialno vpliva na kemične spremembe proteinov in interakcije z nekaterimi proteini, kar lahko privede do konformacijskih

sprememb z neznanimi posledicami. Da bi se izognili tovrstnim težavam, je pomembno razumeti vprašanja, povezana z uporabo polisorbitov, vključno z njihovo strukturo, stabilnostjo in mehanizmi, prek katerih lahko interagirajo s proteini (1, 3, 5).

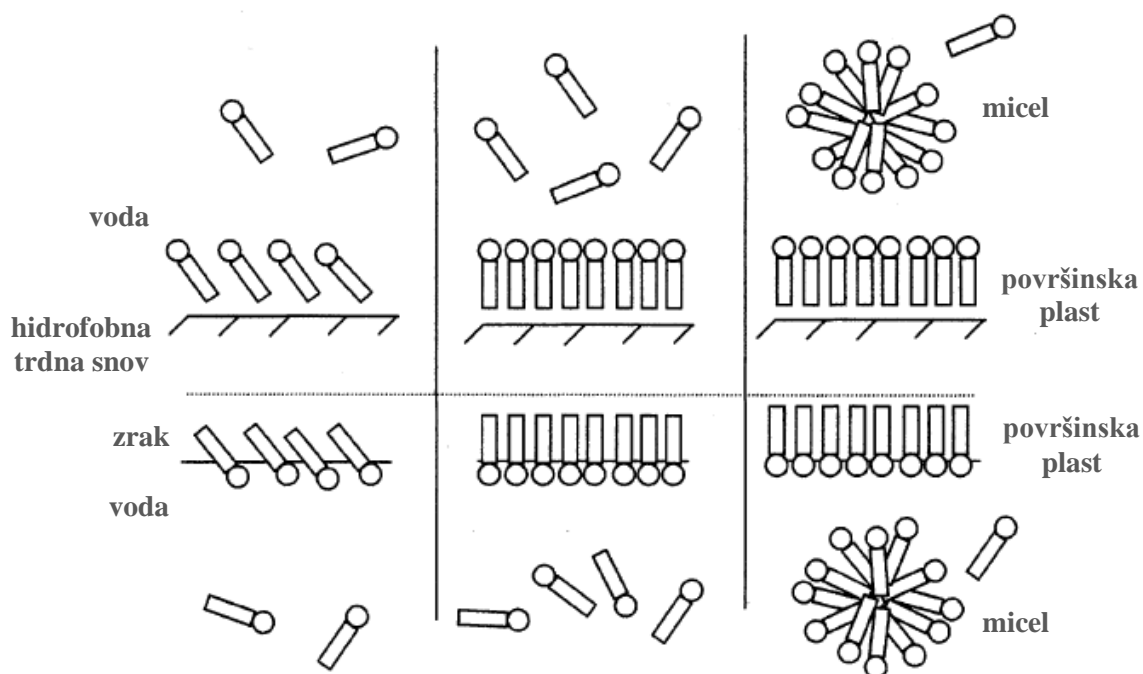
1.1 Površinsko aktivne snovi

Površinsko aktivne snovi (PAS), ki se uporabljajo kot stabilizatorji v proteinskih formulacijah, so tipično neionogene. Molekule so amfifilne, kar pomeni, da so sestavljene iz polarne oz. hidrofilne glave in nepolarnega oz. hidrofobnega repa, prikazano na sliki 1 (1).



Slika 1: Shematski prikaz molekule PAS (1).

Ta dvojna hidrofobno-hidrofilna narava omogoča specifično orientacijo molekul na medfazah, kar je prikazano na sliki 2 (3).



Slika 2: Urejanje molekul PAS ob povečevanju njihove koncentracije (3).

V sistemih, ki vsebujejo medfaze hidrofobno/hidrofilno oz. zrak/voda, se molekule PAS nagibajo k razporejanju na medfazne površine in s tem zmanjšajo površinsko napetost. Ob tem se molekule usmerjajo tako, da so hidrofilne skupine obrnjene proti vodni fazi, hidrofobne skupine pa proti zraku ali hidrofobni trdni snovi, kar tvori površinsko plast. Opisani pojav imenujemo hidrofobni učinek. Ob povečevanju koncentracije PAS se na medfaze adsorbira vedno več molekul, v neki točki pa površine postanejo nasičene, zato se molekule PAS začnejo povezovati v sferične agregate, imenovane miceli, ki imajo hidrofilne dele obrnjene navzven proti okoliški raztopini, hidrofobni deli pa so obrnjeni navznoter proti središču in stran od vode. Koncentracija, pri kateri se to zgodi, se imenuje kritična micelarna koncentracija (ang. »Critical Micelle Concentration«, CMC) (1, 3).

1.1.1 Mehanizmi stabilizacije bioloških zdravil s PAS

Čeprav molekulske podrobnosti stabilizacije bioloških zdravil z neionogenimi PAS še niso popolnoma razumljive, je znano, da je površinsko aktivno delovanje glavna značilnost, s katero PAS vplivajo na fizikalno stabilnost proteinov (3, 4).

Tako kot molekule PAS, tudi molekule proteinov kažejo površinsko aktivnost in se kot take nagibajo k orientiranju in adsorbiranju na medfaze trdno/voda, ki so značilno prisotne v vialah, brizgah ter drugih steklenih in plastičnih vsebnikih za shranjevanje in aplikacijo bioloških zdravil. V tem primeru delujejo PAS kot stabilizatorji preko **kompetitivne adsorpcije na hidrofobne medfaze**, saj kažejo večjo adsorpcijsko energijo na enoto površine kot proteini, s čimer jim učinkovito konkurirajo in tako zmanjšujejo oz. preprečujejo možnost vezave proteina na isto medfazo (površino) (1, 3, 6).

Poleg tega lahko neionogene PAS tudi neposredno vplivajo na proteine z **direktno vezavo na proteinske molekule**. Pri tem se hidrofobni deli molekul PAS vežejo na hidrofobne predele proteinov, kar povzroči urejanje kompleksov protein-PAS tako, da so hidrofilne skupine izpostavljene topilu in posledično v raztopini pride do »preobrata hidrofobnosti«. To pomeni, da je kompleks bolj hidrofilen kot molekule PAS ali molekule proteinov same, s čimer se učinkovito poveča topnost kompleksa. Prav tako PAS z vezavo na proteine izboljšujejo njihovo stabilnost v raztopini, saj zmanjšajo interakcije med proteini in posledično nagnjenost k tvorbi agregatov višjega reda (3, 4, 6).

Kateri od teh dveh mehanizmov stabilizacije prevladuje v sistemu, pa je odvisno od PAS in proteina. Nekatere študije so pokazale, da je povezava med molekulami zanemarljiva, kar nakazuje na to, da poteka stabilizacija zlasti prek mehanizma kompetitivne adsorpcije (4).

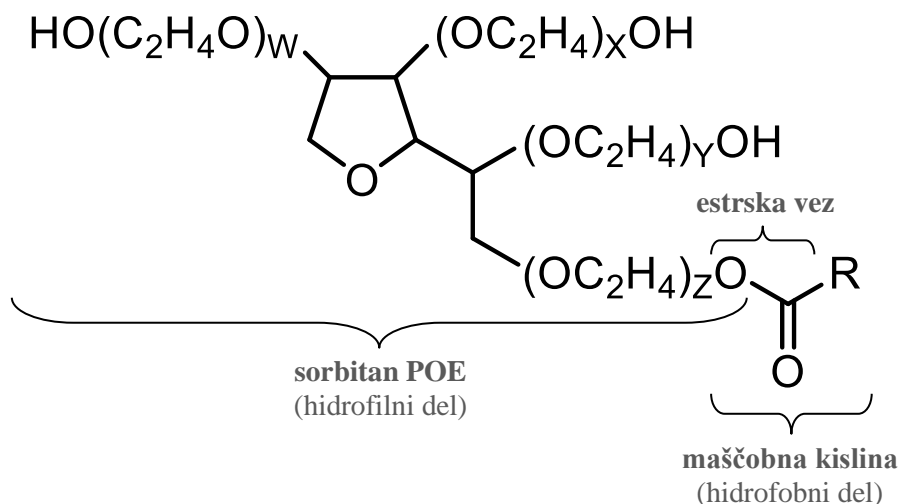
1.2 Polisorbati

Med mnogimi drugimi pomožnimi snovmi se kot najpogostejše neionogene površinsko aktivne snovi za stabilizacijo pred združevanjem medfaz in zaščito proteinov pred površinsko adsorpcijo v biofarmacevtskih izdelkih uporabljajo **polisorbati (PS)**. Zaradi svoje biokompatibilnosti in majhne toksičnosti so prednostno uporabljena pomožna snov. Dokaz temu je dejstvo, da je večina bioloških zdravil, ki vsebujejo peptide, proteine, protitelesa in cepiva, formuliranih s PS. Najbolj znana in najpogosteje uporabljena sta **polisorbat 20 (PS 20)** in **polisorbat 80 (PS 80)**, ki se prodajata pod tržnim imenom **Tween® 20** in **Tween® 80**. Njun prispevek k stabilizaciji proteinov je dobro sprejet, oba pa sta pomožni snovi za uporabo v parenteralnih aplikacijah, ki so ju odobrile regulativne agencije (1, 2, 4, 5).

Velika vrednost hidrofilno-lipofilnega ravnovesja (16,7 za PS 20 in 15 za PS 80) in majhna kritična micelarna koncentracija (8×10^{-4} M za PS 20 in $1,2 \times 10^{-5}$ M za PS 80) se kažeta v močnem površinsko aktivnem delovanju PS tudi pri uporabi majhnih koncentracij. Tipične koncentracije PS v biofarmacevtskih izdelkih so med 0,001 % in 0,1 % (m/V), kar ustreza 0,01 in 1 mg/mL. Minimalna koncentracija PS, potrebna za zaščito proteinov v biološkem zdravilu tudi v primeru razgradnje PS, se določi eksperimentalno med razvojem formulacije. Navadna praksa pa je dodatek presežka PS za zagotovitev, da v formulaciji ostane dovolj funkcionalne PAS do konca roka uporabnosti izdelka. Vendar je treba posebno pozornost nameniti preprečevanju nepotrebnega presežka, saj ne želimo nastanka micelov v formulaciji, poleg tega pa presežek sčasoma lahko pospeši nastanek razgradnih produktov (1, 4, 6).

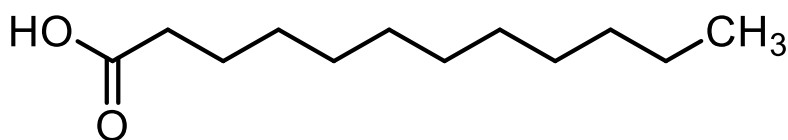
Polisorbati so zmesi amfifilnih molekul, sestavljenih iz estrov višjih maščobnih kislin in polioksietilen sorbitana. Splošna strukturna formula je prikazana na sliki 3. Skupno ogrodje polisorbatov predstavlja sorbitanski obroč, kamor je na vsako od 4 hidroksilnih skupin vezana polioksietilenska (POE) veriga. Slednji del zagotavlja hidrofilno naravo molekule. Na vsakem položaju se število ponavljajočih podenot elementov etilenoksida spreminja, njihovo skupno število ($W+X+Y+Z$) pa je 20 in je nespremenljivo za vsak

polisorbata. Spremenljiv del molekule PS pa predstavlja stranska veriga maščobne kisline (MK), ki je pritrjena preko estrske vezi na etilenoksidni kisik na položaju Z. Verige maščobnih kislin zagotavljajo hidrofobnost molekule (1, 4, 6).



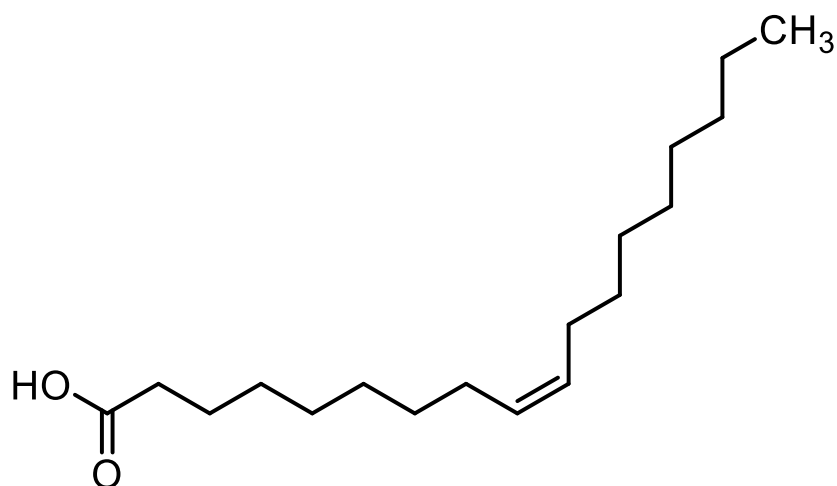
Slika 3: Splošna strukturna formula polisorbata.

Polisorbat 20 je kemijsko polioksietilen-20-sorbitan monolavrat, kar pomeni, da stransko verigo maščobne kisline predstavlja **lavrinska kislina** (ang. »Lauric Acid«, LA). Strukturna formula lavrinske kisline je prikazana na sliki 4. LA ali sistematično poimenovana dodekanojska kislina z molekulsko formulo $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$ in molsko maso 200,32 g/mol je klasificirana kot nasičena MK, kar pomeni, da v alifatski verigi nima nobene dvojne ali trojne vezi (1, 4, 7, 8).



Slika 4: Strukturna formula lavrinske kisline.

Polisorbat 80 je kemijsko polioksietilen-20-sorbitan monooleat, kar pomeni, da stransko verigo maščobne kisline predstavlja **oleinska kislina** (ang. »Oleic Acid«, OA). Strukturna formula oleinske kisline je prikazana na sliki 5. OA ali sistematično poimenovana (Z)-9-oktadecenojska kislina z molekulsko formulo $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ in molsko maso 282,47 g/mol je klasificirana kot enkrat nenasičena (ω -9) MK, kar pomeni, da je na 9. atomu ogljika gledano iz oddaljenega (ω) konca verige prisotna dvojna vez (1, 4, 9, 10).



Slika 5: Strukturna formula oleinske kisline.

Polisorbati 20 in 80 za formulacije biofarmaceutvskih izdelkov so kemijsko raznovrstne zmesi različnih estrov maščobnih kislin. Evropska farmakopeja določa odstotek posameznih estrov MK, ki mora biti oz. je lahko prisoten v posameznem PS. Specifikacije vsebnosti maščobnih kislin v PS 20 in PS 80 so podane v preglednici I. Monolavratni delež v PS 20 mora predstavljati 40 – 60 % zmesi, monooleatni delež v PS 80 pa vsaj 58 % zmesi ali več. Drugi delež pa je zmes estrov tako nasičenih, kot nenasičenih MK s kaprnsko, kaprilno, kaprinsko in lavrinsko kislino, ki so prisotne samo v PS 20, palmitoleinsko in linolensko kislino, ki sta prisotni samo v PS 80, ter miristinsko, palmitinsko, stearinsko, oleinsko in linolno kislino, ki so prisotne tako v PS 20, kot tudi v PS 80 (1, 5, 7, 9).

Preglednica I: Specifikacije vsebnosti maščobnih kislin v PS 20 in PS 80 (7, 9).

Maščobna kislina	Nasičenost MK	PS 20 (%)	PS 80 (%)
kapronska	nasičena	≤ 1	
kaprilna	nasičena	≤ 10	
kaprinska	nasičena	≤ 10	
lavrinska	nasičena	40 – 60	
miristinska	nasičena	14 – 25	≤ 5
palmitinska	nasičena	7 – 15	≤ 16
palmitoleinska	1 × nenasičena		≤ 8
stearinska	nasičena	≤ 7	≤ 6
oleinska	1 × nenasičena	≤ 11	≥ 58
linolna	2 × nenasičena	≤ 3	≤ 18
linolenska	3 × nenasičena		≤ 4

Poleg zmesi različnih estrov MK polisorbati vsebujejo tudi dodatne stranske proizvode sinteze in izhodne spojine, ki niso reagirale. To so na primer POE, POE sorbitani in proste MK (2).

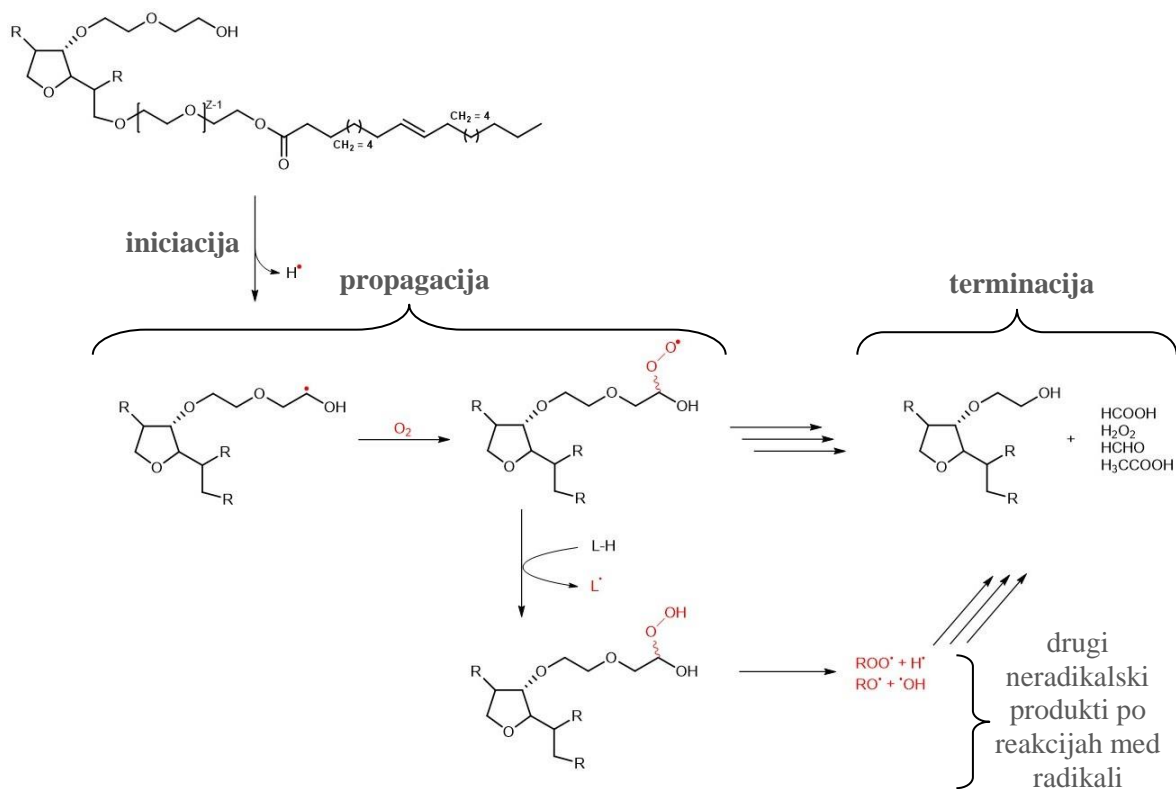
1.2.1 (Ne)stabilnost polisorbato

Še eno pomembno vprašanje poleg stabilnosti terapevtskih proteinov je tudi kemijska stabilnost polisorbato. Kljub njihovi uspešni uporabi v bioloških zdravilih so PS lahko izpostavljeni številnim reakcijam razgradnje, zato je treba ohranjati tudi njihovo stabilnost do roka uporabnosti zdravila vsaj s funkcionalnega vidika. Razgradnja polisorbato namreč lahko povzroči ne le slabšo učinkovitost ali izgubo funkcionalnih lastnosti v formulaciji zaradi zmanjšanja koncentracije PS, ampak tudi nastanek in porast razgradnih produktov, od katerih so nekateri slabo topni, kar bi potencialno lahko vplivalo na stabilnost proteina. Zadnje je najbolj vprašljivo področje, ker se agregati in kemično modificirane proteinske molekule štejejo za kritične lastnosti kakovosti, saj so lahko povezani s povečano imunogenostjo, poleg tega pa lahko razgradnja PS povzroči tudi prisotnost neželenih netopnih delcev (1, 4, 5).

Nestabilnost polisorbato je povezana z dvema osnovnima mehanizmoma razgradnje: avtooksidacijo in hidrolizo (5).

1.2.1.1 Avtooksidacija

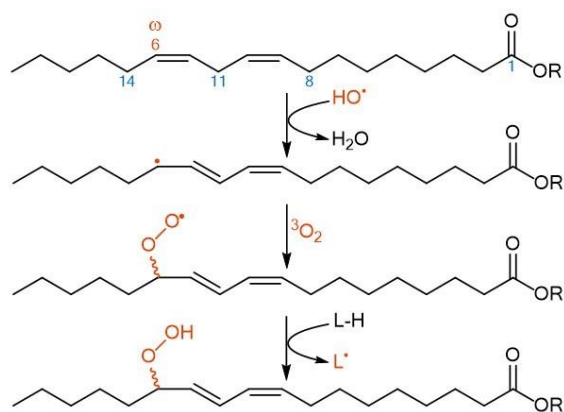
Avtooksidacija polisorbato v glavnem poteka vzdolž etilenoksidnega dela molekul. V prvi fazi (inicijacija ali začetek) nastanejo radikali pod vplivom svetlobe ali katalizatorja, ki povzroči nastanek radikala na ogljiku. V drugi fazi (propagacija ali širjenje) tečejo reakcije nastalih radikalov s kisikom, kar vodi v nastanek organskih peroksilnih radikalov, čemur sledi odtegnitev vodika, tako da se tvorijo organski hidroperoksidi in novi ogljikovi radikali, kar omogoča širjenje radikalskih reakcij. Nazadnje v tretji fazi (terminacija ali zaključek) pa se radikalske reakcije prekinajo s »samogašenjem« radikalov zaradi bimolekulskih reakcij (dva radikala reagirata med seboj). Postopek avtooksidacije vključuje homolizno cepitev vezi C-O in C-C, kar vodi v nastanek kratkoverižnih kislin, kot sta metanojska ali mravljinčna kislina in etanojska ali očetna kislina. Do tega prihaja v glavnem v bližini koncev polioksietilenskih verig, kar ima za posledico krajšanje verig. Nastajanje vodikovega peroksida pa lahko naprej povzroča oksidacijo proteinov. Shematični prikaz opisanih reakcij avtooksidacije je prikazan na sliki 6 (1).



Slika 6: Shematični prikaz reakcij avtooksidacije vzdolž etilenoksidnega dela PS.

Avtooksidacija pa lahko poteka tudi na verigah maščobnih kislin, ki vsebujejo izolirane dvojne vezi. Tudi v tem primeru je verižna reakcija nastanka radikalov sestavljena iz iniciacije, propagacije in terminacije. Ključni dogodek pri iniciaciji je nastanek lipidnega radikala R^\bullet , ki se lahko pojavi zaradi homolizne cepitve $R-H$ vezi ali zaradi odvzema atoma vodika iz $R-H$ zaradi reakcije z nekim drugim reaktivnim radikalom. Proces propagacije omogoča tripletni kisik, ki v prvi stopnji vstopa v reakcijo z R^\bullet in tvori peroksilni radikal ROO^\bullet , ki naprej v drugi stopnji odvzame vodikov atom iz $R-H$, kar vodi do nastanka organskega hidroperoksida ($ROOH$) in drugega R^\bullet . Verižne reakcije se tudi v tem primeru ustavijo s »samogašenjem« radikalov zaradi bimolekulskih reakcij, ker radikali reagirajo med seboj. To vrsto oksidacije imenujemo lipidna peroksidacija, ki je prikazana na sliki 7. Bolj verjetna je pri PS 80, saj v povprečju vsebujejo od 50 do 87 % oleinske kisline ter do 20 % linolne in linolenske kisline, ki so nenasičene MK. Več kot je dvojnih vezi v molekuli MK, večja je dovzetnost za oksidacijo z radikalskimi reakcijami (1, 5).

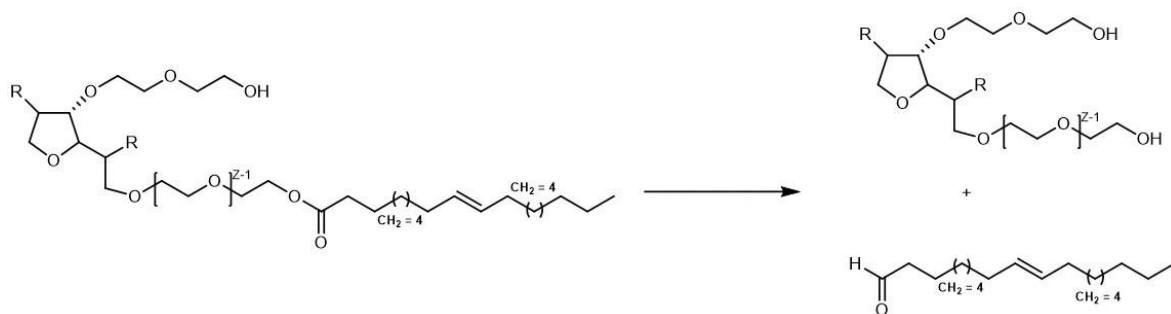
Glavni razpadni produkti, ki izhajajo iz oksidacije, so torej peroksidi in kratkoverižne organske kisline ter v manjšem obsegu tudi aldehidi, alkani in ketoni (4).



Slika 7: Shematični prikaz lipidne peroksidacije na verigah maščobnih kislin PS.

1.2.1.2 Hidroliza

Polisorbati so znani tudi po hidrolizi estrske vezi maščobnih kislin. Ker so formulacije polisorbatov rahlo kisle (pH 5,5 – 6), je mehanizem razgradnje kislinsko katalizirana termodinamična reakcija, pri kateri nukleofil (npr. voda) napade ogljik v karbonilni skupini estra. V kislem okolju se karbonilna skupina protonira, kar olajša nukleofilni napad. Pri tem molekula razpade na dva dela, pri čemer se v en del vgradi hidroksilna skupina, v drugi del pa vodik. Hidroliza polisorbata ima za posledico tvorbo dolgoveržnih maščobnih kislin – lavrinske kisline pri PS 20 in oleinske kisline pri PS 80 ter tvorbo nezaestrenih sorbitanov s POE verigami. Tovrstno hidrolizo imenujemo kemično katalizirana hidroliza, ki je prikazana na sliki 8 (1, 5).



Slika 8: Shematični prikaz kemično katalizirane hidrolize PS.

Čeprav se večina neionogenih PAS šteje za kemično inertne pomožne snovi v formulaciji, pa lahko pride tudi do specifičnih kemijskih interakcij med proteini. Posebna previdnost je nujna pri pripravi proteinov z esterazami, za katere je bilo ugotovljeno, da izkazujejo hidrolizno aktivnost na PS, kar imenujemo encimsko katalizirana hidroliza (3).

1.2.1.3 Dejavniki za nastanek in posledice razgradnih reakcij PS

Reakcije razgradnje so odvisne od temperature, pH raztopine, svetlobe, prisotnosti kisika, peroksidov in kovinskih ionov. Nižje temperature shranjevanja (od 25 do 40 °C) dajejo prednost hidrolizi estrske vezi, ki vodi v dolgoverižne MK s pK_a vrednostjo okoli 4,9, višje temperature (nad 40 °C) pa vodijo tudi do avtooksidacije in nastanka kratkoverižnih kislin s pK_a vrednostjo okoli 3,6. Prisotnost prehodnih kovin, kot je baker, pa vpliva na razgradnjo polisorbata po mehanizmu radikalskih reakcij. Razgradnjo PS je tako mogoče preprečiti s shranjevanjem raztopine pri nižjih temperaturah, zaščiteno pred svetlobo in v prisotnosti dušika, kemijsko stabilnost pa lahko izboljšamo tudi z dodatkom majhnih koncentracij antioksidantov, kot je npr. butilhidroksitoluen (1, 11).

Pri razgradnji PS krajšanje POE verige zaradi avtooksidacije lahko pomeni spremembo v hidrofilno-lipofilnem razmerju PAS oz. spremembo fizikalnih lastnosti PS, kot je na primer vrednost CMC. Pri avtooksidaciji se vsebnost peroksidov najprej povečuje in nato sčasoma upade. Zaradi nastanka večjih količin kislin tudi kislost raztopin konstantno narašča, kar vodi do zmanjšanja pH-vrednosti. Odvisno od temperature shranjevanja lahko pH-vrednost pade na okoli 2 – 4, medtem ko imajo raztopine nerazgrajenega PS pH-vrednost okoli 6 – 7 (1, 11).

1.3 Metode določanja vsebnosti prostih maščobnih kislin

Eno izmed področij vrednotenja kakovosti, ki je pomemben kazalnik stopnje razgradnje, je vsebnost kislin. Tvorbo kislin lahko hitro izmerimo s spremembo pH-vrednosti raztopine ali pa z **določanjem skupne vsebnosti prostih MK**. Te se ne testira neposredno, ampak posredno preko farmakopejske metode določanja kislinskega števila ali preko standardnih metod analize PS. Mednje sodi tudi metoda jedrske magnetne resonance (6, 11).

1.3.1 Jedrska magnetna resonanca ali NMR-spektroskopija

Jedrska magnetna resonanca (ang. »*Nuclear Magnetic Resonance*«, NMR) spada med najbolj uporabljane spektroskopske tehnike v organski kemiji in je ena izmed najpomembnejših metod za proučevanje strukturnih in dinamičnih lastnosti spojin, saj lahko dobimo iz NMR-spektrov daleč največ podatkov o zgradbi molekul. Z njeno uporabo lahko opazujemo prisotnost in količino atomov določenih elementov v molekulah ter določamo njihove fizikalne, kemijske in elektronske lastnosti. NMR-spektroskopija je

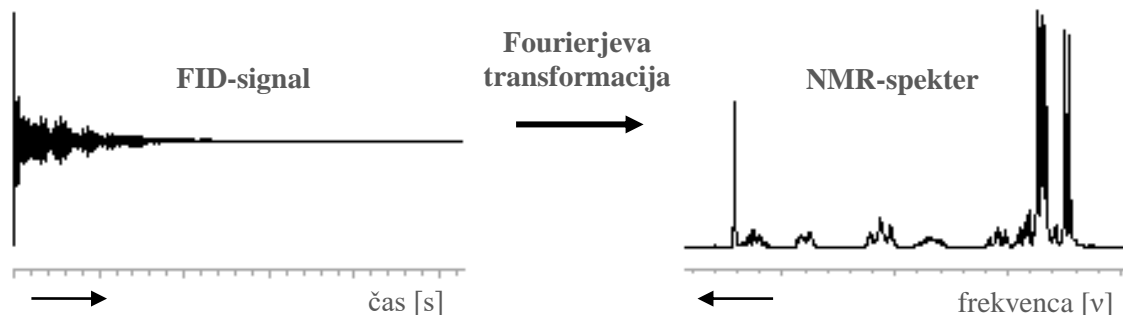
fizikalni pojav, ki izkorišča magnetne lastnosti nekaterih atomskih jeder in opisuje interakcijo med njimi. Temelji na merjenju elektromagnetnega valovanja, ki ga posamezne komponente v vzorcu absorbirajo in izsevajo (12, 13, 14).

Atomska jedra imajo pozitiven naboj, nekatera pa imajo poleg tega tudi lastnost, imenovano spin, kar si lahko predstavljamo kot vrtenje delca okoli svoje osi. Pri tem nastane majhno magnetno polje, s katerim dobijo jedra magnetne lastnosti. To je značilno za jedra, ki imajo liho število protonov, nevtronov ali pa obeh, torej za jedra, ki imajo od nič različen magnetni moment. Najpogostejša takšna jedra so ^1H , ^2H , ^{13}C , ^{14}N in ^{19}F . Tovrstna atomska jedra obstajajo v več različnih spinskih stanjih, pri čemer imajo v odsotnosti zunanjega magnetnega polja vsa enako energijo. Če pa vzorec postavimo v magnetno polje, se magnetno aktivna jedra začnejo urejati in posamezna spinska stanja zasedejo različne energijske nivoje. Jedrska magnetna resonanca temelji prav na vzbujanju prehodov atomskih jeder z nižjega energijskega stanja v višje z uporabo sodobnih inštrumentov, tj. NMR-spektrometer oz. pulzni inštrument s Fourierjevo transformacijo. Energija, ki je potrebna za prehod jedra iz osnovnega v vzbujeno stanje, je odvisna od moči zunanjega magnetnega polja in od lastnosti opazovanega jedra. Frekvenca valovanja, pri kateri vzbudimo vsa jedra določenih atomov, se imenuje **resonančna frekvenca** jedra oz. **Larmorjeva frekvenca** (12, 13, 14).

1.3.1.1 Princip delovanja

Vzorec, ki vsebuje magnetno aktivna atomska jedra, postavimo v magnetno polje in ga obsevamo z močnim kratkim pulzom elektromagnetnega valovanja v radiofrekvenčnem območju (60 – 1000 MHz), s katerim vzbudimo vsa jedra v vzorcu, da preidejo iz osnovnega v vzbujeno stanje oz. iz nivoja z manjšo energijo na nivo z večjo energijo. Po določenem času se vzbujena jedra počasi iznihavajo (relaksirajo oz. vračajo v svoje osnovno spinsko stanje na nižji energetske nivo) in ob tem izsevajo elektromagnetno valovanje, ki ga zaznamo z detektorsko tuljavo. Pri tem merimo, kolikšen del prejete energije so jedra izsevala nazaj in po kolikšnem času. Na ta način nastane signal, imenovan **signal proste precesije** (ang. »*Free Induction Decay*«, FID), ki vsebuje informacijo o intenziteti izsevanega elektromagnetnega valovanja vseh jeder v odvisnosti od časa. Nato s **Fourierjevo transformacijo** (FT) pretvorimo zapis nihanja iz časovne domene v frekvenčno, s čimer dobimo zapis, ki prikazuje intenziteto izsevanega elektromagnetnega valovanja v odvisnosti od frekvence, kar je prikazano na sliki 9 (12, 13, 14).

Občutljivost metode jedrske magnetne resonance je relativno majhna, saj je število jeder, ki jih lahko vzbujamo v vzorcu, zelo majhno, posledično pa so tudi signali šibki, zato je velika koncentracija vzorcev in večkratno ponavljanje snemanja nujno (12).



Slika 9: Pretvorba zapisa nihanja iz časovne domene v frekvenčno s FT.

1.3.1.2 Kemijski premik

Pri jedrski magnetni resonanci je ključno dejstvo, da nimajo vsa jedra v molekuli enakih resonančnih frekvenc, saj je elektronska gostota okrog protonov, ki so v različnih kemijskih okoljih, različna. Resonančnih frekvenc jeder ne podajamo absolutno (v Hz), ampak relativno glede na dogovorjen standard, torej kot razliko med resonančno frekvenco protona v vzorcu in resonančno frekvenco protona v referenčni spojini, ki se jo doda vzorcu. Kot najpogostejša referenčna spojina se uporablja tetrametilsilan (TMS) z molekulsko formulo $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ (12, 13).

Resonančna frekvenca jeder je odvisna tudi od gostote zunanjega magnetnega polja, kar pomeni, da bi na različnih NMR-spektrometrih istovrstna jedra resonirala pri drugačni frekvenci. Z namenom lažje primerjave NMR-spektrov, posnetih z inštrumenti, ki delujejo pri različnih osnovnih frekvencah, je bil kot enota na x-osi NMR-spektra uveden parameter **kemijski premik** (δ), ki ga dobimo, če razliko med resonančnima frekvencama protonov v vzorcu in standardu delimo z resonančno frekvenco protonov v standardu. Podajamo ga v enotah delih na milijon (ang. »part per million«, ppm). Po definiciji je kemijski premik jeder standarda TMS vedno nič, kemijski premiki drugih atomov pa so večji od nič, če resonirajo pri večji frekvenci. Navadne vrednosti kemijskih premikov protonov na ^1H NMR-spektru so v območju med 0 in 15 ppm (12, 13, 15).

1.3.1.3 Kemijska ekvivalenca

Kemijski premik določenega jedra v nekem okolju je močno odvisen od elektronske gostote okoli jedra, na katero vplivajo tudi sosednja jedra. Pri analizi NMR-spektrov lahko ločimo med jedri, ki jih v molekuli najdemo v različnih kemijskih okoljih, saj se vrhovi protonov iz različnih atomskih skupin pojavljajo na spektru pri različnih kemijskih premikih, nasprotno pa imajo vrhovi podobne vrste protonov na ^1H NMR-spektru vedno signale s podobnimi kemijskimi premiki. Za vse protone, ki so v enakem kemijskem okolju, pravimo, da so **kemijsko ekvivalentni** in imajo **enak kemijski premik**. Iz kemijskih premikov lahko torej sklepamo na to, v kakšnem molekulskega okolju so jedra, in s tem, kakšna je struktura preiskovane molekule. Število različnih signalov na NMR-spektru nam pove število različnih vrst protonov v molekuli (12, 13, 15).

Večina NMR-spektrov vsebuje še dodatno informacijo, ki je posledica medsebojnega delovanja opazovanih magnetno aktivnih jeder s sosednjimi jedri, ki imajo spin in zato magnetni moment. Pojavu, da jedra čutijo vpliv sosednjih jeder, pravimo **sklopitev**. Ta vpliv se izkazuje v cepitvi signala na večje število vrhov (12, 13, 15).

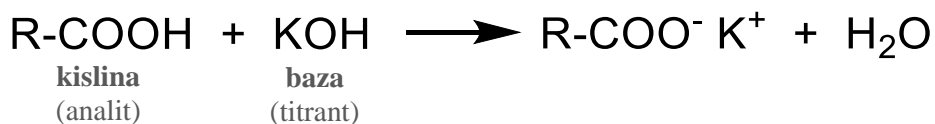
1.3.1.4 Integral

Iz ^1H NMR-spektra lahko razberemo ne le, katere vrste protonov so v molekuli, ampak tudi številčno razmerje med njimi. Spektralni vrhovi so različno široki in visoki, zato merimo njihovo ploščino, ki jo imenujemo **integral** (\int). Intenziteta signala oz. integrali posameznih atomskih jeder so sorazmerni z množino teh jeder, ki dajejo vrh, zato lahko integrale različnih protonov primerjamo med seboj, iz česar lahko sklepamo na razmerje med različnimi vrstami atomov v molekuli, ne moremo pa določiti njihovega absolutnega števila. Vrednosti integralov podajamo relativno – enega od njih nastavimo na vrednost 1, vsi drugi pa kažejo števila protonov relativno na tega (12, 13, 15).

1.3.2 Določanje kislinskega števila

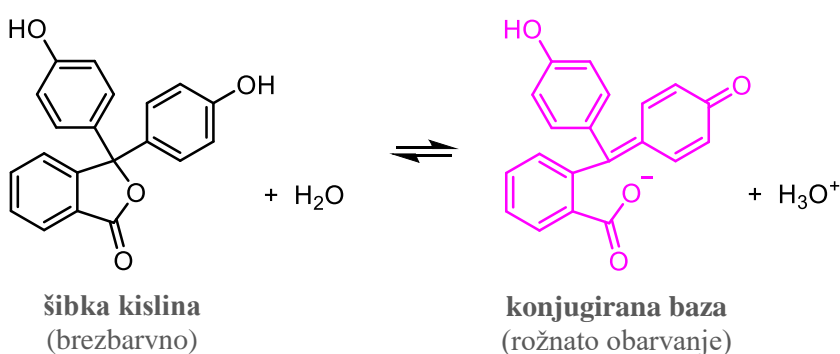
Določanje kislinskega števila je kvantitativna metoda, ki se uporablja za določanje kislosti snovi, saj število predstavlja merilo vsebnosti kisljih karboksilnih skupin, prisotnih v spojini. Temelji na **titraciji**, eni izmed temeljnih kemičnih analiz za določanje neznanih koncentracij znanih analitov v raztopini (16).

Vrednost kislinskega števila (ang. »Acid Value«, I_A) predstavlja količino baze, tj. maso kalijevega hidroksida (KOH), izraženo v mg, ki je potrebna za nevtralizacijo kislinskih komponent v 1 g vzorca. Reakcija nevtralizacije je prikazana na sliki 10. V tipičnem postopku določanja I_A znano količino vzorca raztopimo v organskem topilu in titramo z raztopino KOH (lahko tudi NaOH) z znano koncentracijo. Končna točka titracije se pojavi, ko dodana količina titranta stehiometrijsko zreagira z analitom (16, 17).



Slika 10: Reakcija nevtralizacije kislinskih komponent v vzorcu.

Za detekcijo končne točke najpogosteje uporabljamo barvne indikatorje, s pomočjo katerih opazujemo nastanek, izginotje in spremembo barve ali pa spremembe v motnosti vzorca. V primeru določanja I_A polisorbatom se kot barvni indikator uporablja **fenolftalein**. Fenolftalein je šibka kislina, ki se v vodi rahlo raztopi in tvori ione. V obliki šibke kisline je brezbarven, v obliki konjugirane baze pa se obarva rožnato. Ravnotežna reakcija je prikazana na sliki 11. Pri majhnih pH-vrednostih je koncentracija H_3O^+ velika, kar pomeni, da je raztopina brezbarvna, saj je ravnotežna reakcija pomaknjena v levo. Pri velikih pH-vrednostih pa je koncentracija H_3O^+ majhna, kar pomeni, da se raztopina obarva rožnato, saj se ravnotežna reakcija pomakne v desno (16, 18).



Slika 11: Ravnotežna reakcija fenolftaleina v prisotnosti vode.

2. NAMEN DELA

V okviru magistrske naloge bomo ovrednotili kakovost izbranih polisorbatov 20 in 80 z določanjem vsebnosti prostih maščobnih kislin, ki so lahko v raztopinah PS prisotne kot nezreagirani izhodni reagenti sinteze ali kot razgradni produkti avtooksidacije in hidrolize estrov PS. Namen magistrske naloge je postaviti hitro in preprosto analizo metodo za kvantitativno vrednotenje prostih maščobnih kislin v polisorbatih, ki bo temeljila na metodi jedrske magnetne resonance. Poleg omenjene metode bomo vsebnost prostih MK določali tudi s farmakopejsko metodo določanja kislinskega števila in primerjali dobljene rezultate.

V prvem delu eksperimentalnega dela bomo z uporabo metode standardnega dodatka obogatili sveže vzorce polisorbata 20 z različnimi dodatki standarda lavrinske kisline, sveže vzorce polisorbata 80 pa z različnimi dodatki standarda oleinske kisline in izmerili vsebnost prostih MK. Na podlagi rezultatov bomo s pomočjo regresijske analize ugotavljali korelacijo obeh metod. V drugem delu eksperimentalnega dela pa bomo izmerili vsebnost prostih MK vzorcem polisorbatov 20 in 80 s pretečenim rokom uporabnosti ter rezultate primerjali med seboj. Rezultate izmerjenih kislinskih števil bomo primerjali tudi s kislinskimi števili, navedenimi v specifikacijah posameznih vzorcev PS.

Pri vrednotenju metod z metodo standardnega dodatka pričakujemo dobro korelacijo. Pri določanju vsebnosti prostih MK v vzorcih s pretečenim rokom uporabnosti pa pričakujemo nekoliko večje izmerjene vrednosti zaradi potencialne razgradnje polisorbatov. Večjo vsebnost pričakujemo pri vzorcih, katerim je prej potekel rok uporabnosti oz. ki so starejši glede na datum proizvodnje.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Reagenti in topila

- lavrinska kislina 95-%; Aldrich Europe (Belgija)
- oleinska kislina; Sigma-Aldrich (ZDA)
- devteriran metanol (CD₃OD); Euriso-Top (Francija)
- devteriran kloroform (CDCl₃) + 0,03 % TMS; Euriso-Top (Francija)
- devteriran dimetilsulfoksid (DMSO-*d*₆) + 0,03 % TMS; Euriso-Top (Francija)
- ultra čista voda (Milli-Q voda); UL Fakulteta za farmacijo (Slovenija)
- natrijev hidroksid (NaOH); Merck KGaA (Nemčija)
- kalijev hidrogen ftalat (KHC₈H₄O₄); Fisher Scientific (Velika Britanija)
- fenolftalein; Sigma-Aldrich (ZDA)
- etanol, 96-%; KEFO (Slovenija)
- petroleter, 100 – 120 °C; Merck KGaA (Nemčija)

3.1.2 Laboratorijski material

- plastične centrifugirke 50-mL
- plastične in steklene kapalke
- laboratorijske žličke in spatule
- magneti
- stekleničke penicilinke 5-mL
- avtomatska pipeta Transferpette 1000-μL; Brand GMBH (Nemčija)
- plastični nastavki za avtomatsko pipeto
- kvarčne cevke za NMR 5-mm
- merilne bučke 250-mL in 500-mL
- plastični zamaški za merilne bučke
- erlenmajerice 100-mL in 250-mL
- polnilne pipete 10-mL, 20-mL, 25-mL in 50-mL
- žogica za pipetiranje
- bireti 10-mL in 50-mL s teflonskim petelinčkom

3.1.3 Laboratorijska oprema

- analizna tehtnica AG245; Mettler Toledo (Švica)
- magnetno mešalo RCT basic; Ika (ZDA)
- NMR-spektrometer Avance III 400-MHz; Bruker (ZDA)

3.1.4 Vzorci

V preglednici II sta navedena dva analizirana polisorbata, Tween[®] 20 in Tween[®] 80, ki sta predstavljala sveža vzorca, saj od njune proizvodnje do analize ni preteklo več kot 6 mesecev, prav tako pa smo ju analizirali takoj po odprtju embalaže. V preglednici III pa je navedenih sedem analiziranih polisorbatov, ki so predstavljali stare vzorce oz. vzorce s pretečenim rokom uporabnosti, skupaj s podatki o specifikacijah (kislinsko število) posamezne serije izdelka.

3.1.4.1 Sveža vzorca polisorbata 20 in polisorbata 80

Preglednica II: Analizirana sveža vzorca polisorbatov.

Vzorec	Podatki
PS 20	Tween[®] 20 Proizvajalec: Sigma-Aldrich (ZDA) Št. izdelka: P2287 Št. serije: MKCD6838 Datum proizvodnje: avgust 2017
PS 80	Tween[®] 80 Proizvajalec: Sigma-Aldrich (ZDA) Št. izdelka: P4780 Št. serije: BCBV4473 Datum proizvodnje: avgust 2017

3.1.4.2 Vzorci polisorbatov s pretečenim rokom uporabnosti

Preglednica III: Analizirani vzorci polisorbatov s pretečenim rokom uporabnosti.

Vzorec	Podatki	Specifikacije
1	Tween[®] 20 Proizvajalec: Sigma-Aldrich (ZDA) Št. izdelka: P1378 Št. serije: SZBC2010V Datum proizvodnje: julij 2012	Kislinsko število: 1,1

2	Tween® 20 Proizvajalec: Merck KGaA (Nemčija) Št. izdelka: 817072 Št. serije: K47210572 Datum proizvodnje: oktober 2015	Kislinsko število: 1,6
3	Tween® 20 Proizvajalec: Merck KGaA (Nemčija) Št. izdelka: 817072 Št. serije: K46977172 Datum proizvodnje: september 2015	Kislinsko število: 1,6
4	Tween® 20 Proizvajalec: Merck KGaA (Nemčija) Št. izdelka: 817072 Št. serije: K47210572 Datum proizvodnje: oktober 2015	Kislinsko število: 1,6
5	Tween® 20 Proizvajalec: J.T.Baker (ZDA) Št. izdelka: 4116-04 Št. serije: 0000140208 Datum proizvodnje: december 2015	Kislinsko število: 1,3
6	Tween® 80 Proizvajalec: Sigma-Aldrich (ZDA) Št. izdelka: P4780 Št. serije: BCBG4950V Datum proizvodnje: oktober 2011	Kislinsko število: ni podatka
7	Tween® 80 Proizvajalec: Merck KGaA (Nemčija) Št. izdelka: 817061 Št. serije: K46921061 Datum proizvodnje: julij 2015	Kislinsko število: 1,4

3.2 METODE

3.2.1 Priprava vzorcev PS 20 in PS 80 z dodatki standarda maščobne kisline

Pripravili smo 2 paralelki po 5 vzorcev svežega PS 20 in PS 80 z različnimi vsebnostmi dodanega standarda maščobne kisline – 1 %, 2 %, 3 %, 4 % in 5 %. Pri prvi paralelki smo v plastične centrifugirke natehtali približno natančno 16,0 g PS 20, pri drugi paralelki pa približno natančno 15,5 g PS 80. Nato smo s pomočjo enačbe 1 izračunali maso MK, ki jo

je treba dodati natehtanemu PS, da vsebuje določen masni % MK, in jo v plastične centrifugirke z natehtanimi PS dodali približno natančno natehtano. Prvi paralelki s PS 20 smo dodali lavrinsko kislino, drugi paralelki s PS 80 pa oleinsko kislino.

Enačba 1: Izračun potrebne mase standarda MK [mg] za dodatek PS.

$$m_{MK} = \frac{\%_{MK} \cdot m_{PS} \cdot 1000}{1 - \%_{MK}}$$

$\%_{MK}$ = vsebnost MK v vzorcu [%]

m_{PS} = masa PS [g]

S pomočjo enačbe 2 smo iz podatkov o masi natehtanega standarda MK in podatkov o masi natehtanega PS izračunali točno vsebnost standarda MK v vzorcu.

Enačba 2: Izračun točne vsebnosti standarda MK [%] v vzorcu.

$$\%_{MK} = \frac{m_{MK} \cdot 100}{m_{MK} + m_{PS}}$$

m_{MK} = masa standarda MK v vzorcu [g]

m_{PS} = masa PS [g]

V plastične centrifugirke z vzorci smo dodali magnetne, vzorce prepihali z argonom in zrakotesno zaprli s parafilmom, jih postavili na magnetno mešalo in pustili mešati približno 6 ur pri 300 obr/min, da smo dobili homogene zmesi. Med mešanjem smo prvo paralelko vzorcev z dodatkom lavrinske kisline tudi segrevali v peščeni kopeli pri temperaturi 50 °C, saj je temperatura tališča lavrinske kisline, ki je v trdnem agregatnem stanju, približno 45 °C.

3.2.2 Analiza z NMR-spektroskopijo

Vzorci smo pripravili po postopku, zapisanem v članku »*NMR Method for Accurate Quantification of Polysorbate 80 Copolymer Composition*« (19). V penicilke smo natehtali 150 mg vzorca in dodali 450 µL devteriranega topila. Najprej smo pripravili 3 paralelke svežih vzorcev PS 20 z dodatki lavrinske kisline od 0 do 5 % in 3 paralelke svežih vzorcev PS 80 z dodatki oleinske kisline od 0 do 5 %. Prvi paralelki smo dodali devteriran metanol (CD₃OD), drugi paralelki devteriran kloroform (CDCl₃) z 0,03 % TMS, tretji paralelki pa devteriran dimetilsulfoksid (DMSO-*d*₆) z 0,03 % TMS. Nato smo pripravili še eno paralelko vzorcev PS s pretečenim rokom uporabnosti, katerim smo dodali devteriran

metanol (CD₃OD). S pipeto smo dobro premešali, da so se vzorci popolnoma raztopili, raztopine prenesli v 5-mm kvarčne cevke za NMR in posneli ¹H NMR-spektre.

3.2.3 Določanje kislinskega števila

3.2.3.1 Priprava raztopine fenolftaleina R1

Raztopino fenolftaleina R1 smo pripravili po postopku, predpisanem v *Evropski farmakopeji (Ph. Eur. 8.0)*. Natehtali smo 0,25 g fenolftaleina, ga prenesli v 250-mL merilno bučko, do oznake dopolnili s 96-% etanolom in raztopino premešali z obračanjem bučke (20).

3.2.3.2 Priprava in standardizacija 1 M raztopine NaOH

1 M raztopino NaOH smo pripravili po postopku, predpisanem v *Evropski farmakopeji (Ph. Eur. 8.0)*. Natehtali smo 21 g NaOH, ga prenesli v 500-mL merilno bučko, do polovice nalili Milli-Q vodo in mešali, da se je NaOH popolnoma raztopil. Nato smo z Milli-Q vodo dopolnili do oznake in raztopino še enkrat premešali z obračanjem bučke (21).

Standardizacijo 1 M raztopine smo izvedli po postopku, predpisanem v *Ameriški farmakopeji (USP 32)*. V 250-mL erlenmajerico smo natehtali približno natančno 5,0 g kalijevega hidrogen ftalata (KHC₈H₄O₄), ki smo ga predhodno sušili 2 uri pri 120 °C, dodali 75 mL Milli-Q vode in mešali, da se je KHC₈H₄O₄ popolnoma raztopil. Dodali smo še 2 kapljici indikatorja fenolftaleina R1. 50-mL bireto smo napolnili z 1 M raztopino NaOH in titriral raztopino kalijevega hidrogen ftalata do stabilnega rožnatega obarvanja. S pomočjo enačbe 3 smo iz podatkov o masi natehtanega KHC₈H₄O₄ in podatkov o porabi raztopine NaOH izračunali točno koncentracijo raztopine NaOH, ki smo jo kasneje upoštevali kot faktor standardne raztopine NaOH (22).

Enačba 3: Izračun točne koncentracije raztopine NaOH [M] (22).

$$c = \frac{m_{\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4}}{0,20423 \cdot V_{\text{NaOH}}}$$

$m_{\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4}$ = masa kalijevega hidrogen ftalata [g]

V_{NaOH} = volumen raztopine NaOH [mL]

Izvedli smo 3 ponovitve standardizacije in kot rezultat uporabili povprečje 3 meritev.

3.2.3.3 Priprava 0,1 M raztopine NaOH

0,1 M raztopino NaOH smo pripravili z 10-kratnim redčenjem 1 M raztopine NaOH. V 500-mL bučko smo do polovice nalili Milli-Q vodo, dodali 50 mL 1 M raztopine NaOH, do oznake dopolnili z Milli-Q vodo in raztopino premešali z obračanjem bučke.

3.2.3.4 Določanje kislinskega števila vzorcem polisorbitov

Kislinsko število smo določali po postopku za testiranje Polisorbata 20 in Polisorbata 80, predpisanem v *Evropski farmakopeji (Ph. Eur. 8.0)*. V 100-mL erlenmajerice smo natehtali približno natančno 5,0 g vzorca, dodali 40 mL zmesi 96-% etanola in petroletra v razmerju 1:1 in dobro premešali, da so se vzorci popolnoma raztopili. Raztopinam vzorcev smo dodali 0,5 mL indikatorja fenolftaleina R1. 10-mL bireto smo napolnili z 0,1 M raztopino NaOH in titrirali raztopine vzorcev do stabilnega rožnatega obarvanja. S pomočjo enačbe 4 smo iz podatkov o masi natehtanega vzorca in podatkov o porabi 0,1 M raztopine NaOH izračunali kislinsko število (7, 9, 17). Pri izračunu kislinskega števila smo upoštevali še faktor standardne raztopine NaOH, ki predstavlja razmerje med pripravljeno in zahtevano koncentracijo raztopine NaOH.

Enačba 4: Izračun kislinskega števila [/] (17).

$$I_A = \frac{5,610 \cdot V_{NaOH} \cdot f}{m_v}$$

V_{NaOH} = volumen 0,1 M raztopine NaOH [mL]

f = faktor standardne raztopine NaOH [/]

m_v = masa vzorca [g]

Izvedli smo 3 ponovitve določanja kislinskega števila za vsak vzorec in kot rezultat podali povprečje 3 meritev z relativnim standardnim odklonom (RSD).

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Primerjava rezultatov metod NMR in določanja kislinskega števila

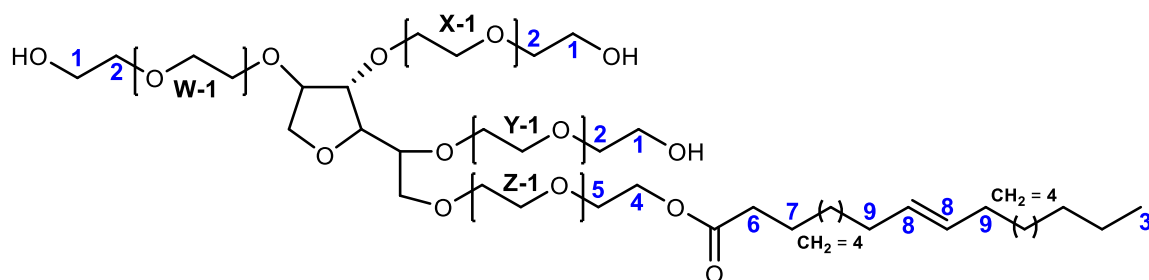
V prvem delu eksperimentalnega dela magistrske naloge smo izmerili vsebnosti prostih maščobnih kislin v polisorbatih 20 in 80 z NMR-spektroskopijo in s farmakopejsko metodo določili kislinska števila ter primerjali rezultate meritev. Ocenjevali smo korelacijo obeh metod, kar pomeni, da smo ugotavljali primerljivost ene metode z drugo. Z obema metodama smo analizirali sveža vzorca PS 20 in PS 80, tako da smo ju obogatili z različnimi dodatki maščobne kisline, ki je v posameznem PS prisotna v največji količini – polisorbatu 20 smo dodali lavrinsko kislino, polisorbatu 80 pa oleinsko kislino.

4.1.1 Rezultati analize z NMR-spektroskopijo

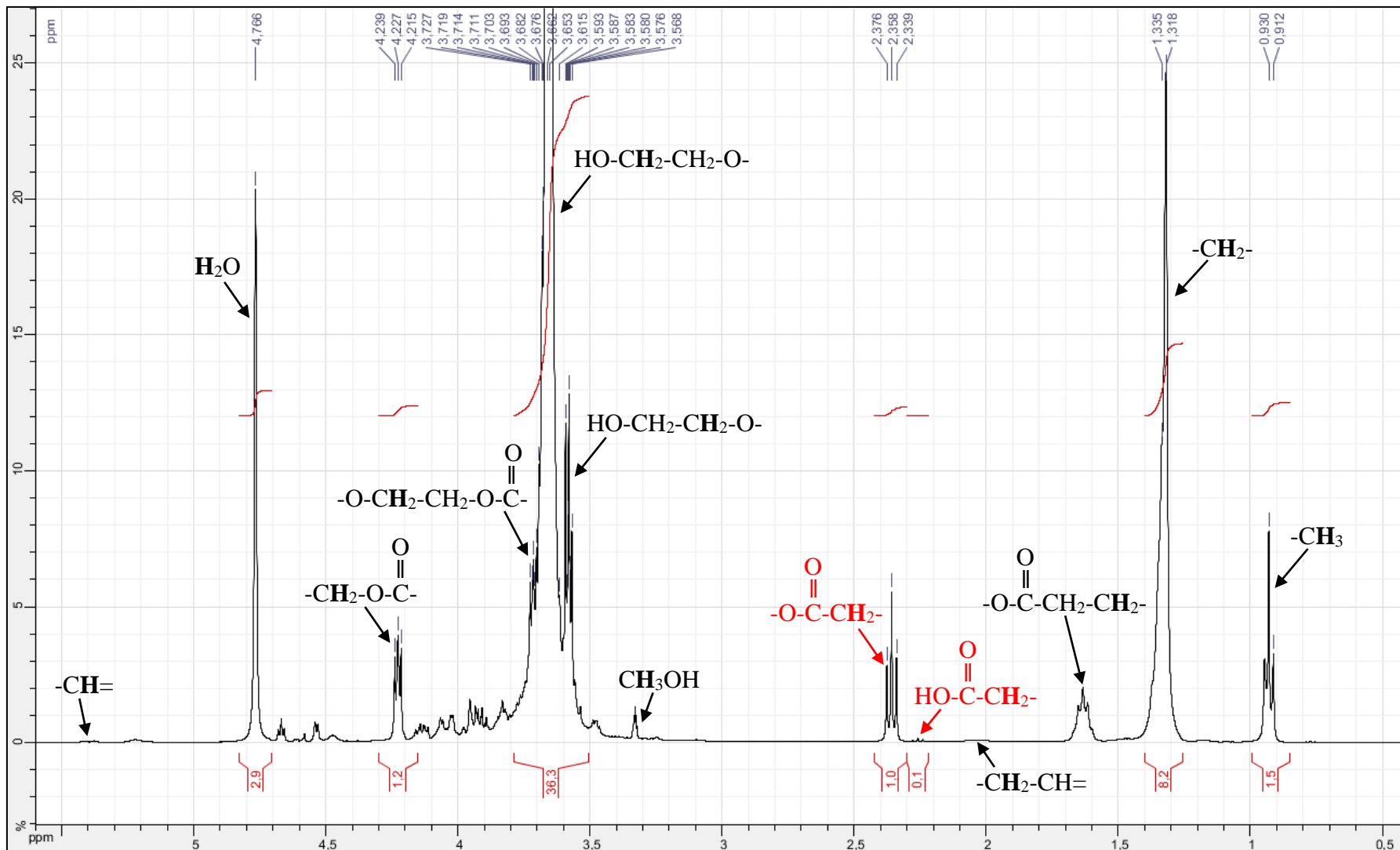
Na sliki 13 (vzorec PS 20) in sliki 14 (vzorec PS 80) sta prikazana NMR-spektra za vzorca PS brez dodane MK, posneta v devteriranem metanolu, na katerih so označeni posamezni signali, ki ustrezajo dopisanim funkcionalnim skupinam molekul, prisotnih v vzorcih PS 20 in PS 80. Posamezne funkcionalne skupine, ki ustrezajo signalom na NMR-spektrih, so s števkami označene na sliki 12, ki prikazuje strukturno formulo molekule polisorbata 80.

Vodikov atom znotraj funkcionalne skupine, ki je odgovoren za posamezni signal na NMR-spektrih, je odebeljeno označen. Najvišji vrh na obeh NMR-spektrih predstavlja signal za HO-CH₂-CH₂-O- skupine, kar pomeni, da so te funkcionalne skupine v vzorcih prisotne v največji količini. Predstavlja protone CH₂ skupine ob koncu polioksietilenskih verig v molekuli PS, na sliki 12 označene s številko 1. Visok je tudi vrh za HO-CH₂-CH₂-O- skupine, ki predstavlja signal za protone naslednje CH₂ skupine ob koncu polioksietilenskih verig, na sliki 9 označene s številko 2. Drugi najvišji vrh na NMR-spektrih, viden pri kemijskem premiku okoli 1,3, predstavlja signal za protone -CH₂-skupine, ki so prisotne v maščobnokislinski verigi. Prav tako je na NMR-spektrih viden tudi visok vrh pri kemijskem premiku okoli 0,8, ki predstavlja signal za -CH₃ skupine, ki so prisotne na koncu maščobnokislinske verige, na sliki 12 označene s številko 3. Tretji najvišji vrh na NMR-spektrih predstavlja signal za vodo (H₂O), ki je viden pri kemijskem premiku 4,8 (23). Signal za metanol (CH₃OH), ki se v devteriranem metanolu pojavlja kot nečistota, je na NMR-spektrih viden pri kemijskem premiku okoli 3,3. Na NMR-spektrih sta visoka tudi vrhova za skupine -CH₂-CH₂-O-CO- in -CH₂-CH₂-O-CO-. Prvi je viden pri

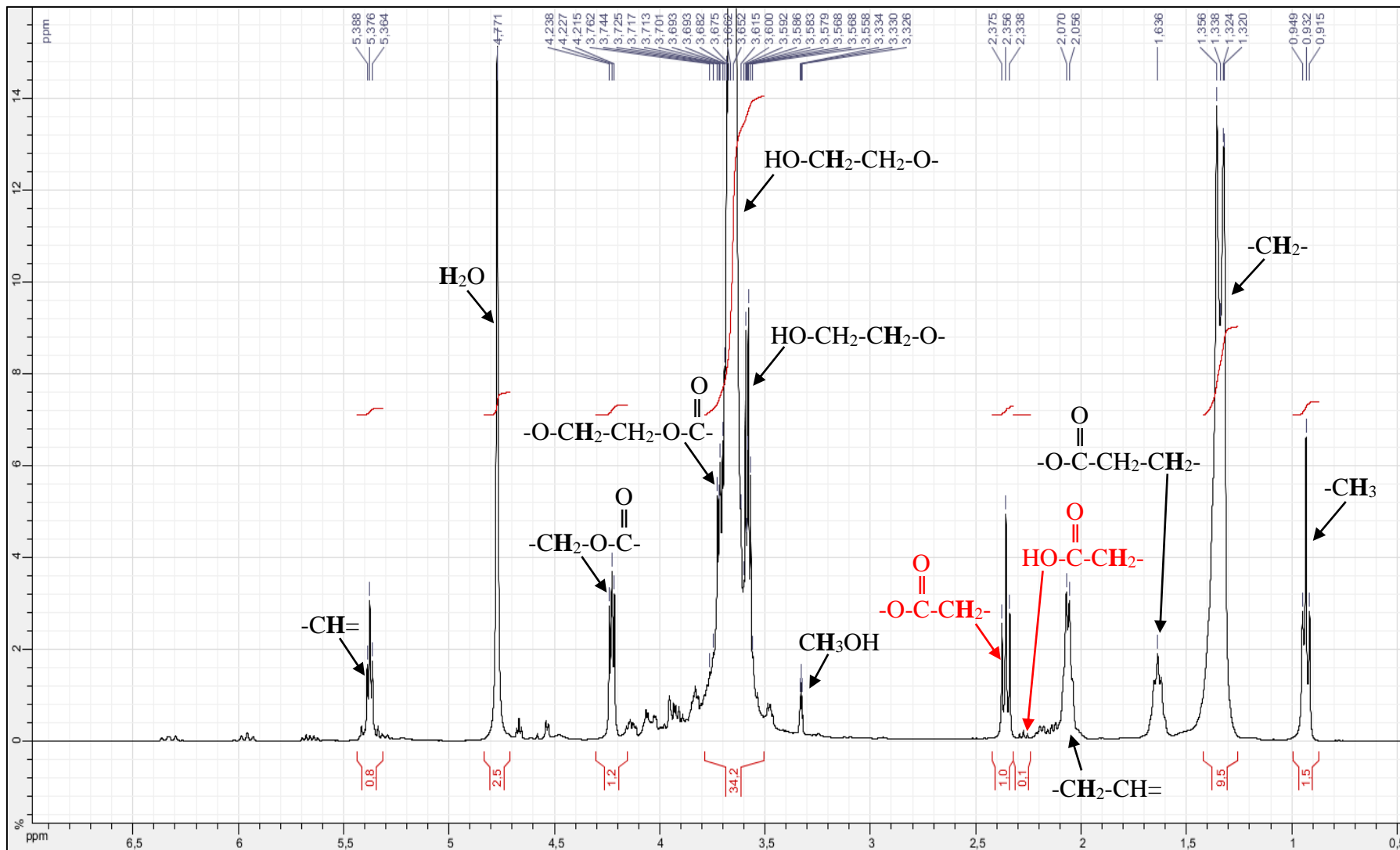
kemijskem premiku okoli 4,2 in predstavlja signal za protone skupine CH_2 ob estru v polioksietilenskem delu molekule PS, na sliki 12 označene s številko **4**, drugi pa je viden pri kemijskem premiku okoli 3,7 in predstavlja protone naslednje CH_2 skupine ob estru v polioksietilenskem delu molekule PS, na sliki 12 označene s številko **5**. Pri kemijskem premiku okoli 2,3 sta vidna vrhova za protone skupin $-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-$ in $\text{HO}-\text{CO}-\text{CH}_2$, na sliki 13 in 14 označena z rdečo barvo. Prvi predstavlja signal za protone CH_2 skupine ob estru v maščobnokislinskem delu molekule PS, na sliki 12 označene s številko **6**, drugi pa predstavlja signal za protone CH_2 skupine ob karboksilni skupini na začetku molekule prostih MK. Pri kemijskem premiku okoli 1,6 je viden vrh za protone skupine $-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, ki predstavlja signal za protone naslednje CH_2 skupine ob estru v maščobnokislinskem delu molekule PS, na sliki 12 označene s številko **7**. Na NMR-spektru vzorca PS 80 sta vidna tudi vrhova za protone skupin $-\text{CH}=\text{}$ in $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$. Prvi je viden pri kemijskem premiku okoli 5,4 in predstavlja signal za protone skupine CH ob dvojni vezi v verigi MK, na sliki 12 označene s številko **8**, drugi pa je viden pri kemijskem premiku okoli 2,0 in predstavlja signal za protone naslednje CH_2 skupine ob dvojni vezi v verigi MK, na sliki 12 označene s številko **9**. Dvojne vezi v ogljikovodikovi verigi maščobnih kislin so prisotne v nenasičenih MK, kar pomeni, da večja kot je količina nenasičenih MK in večje kot je število dvojnih vezi v posamezni MK v vzorcu PS, višji je vrh za protone skupin $-\text{CH}=\text{}$ in $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$. Vzorec PS 20 vsebuje $\leq 11\%$ $1 \times$ nenasičene oleinske kisline in $\leq 3\%$ $2 \times$ nenasičene linolne kisline, kar je zelo malo, zato tudi signala za CH_2 skupine ob dvojni vezi na NMR-spektru skoraj nista opazna. Vzorec PS 80 pa vsebuje $\geq 58\%$ $1 \times$ nenasičene oleinske kisline, $\leq 18\%$ $2 \times$ nenasičene linolne kisline, $\leq 8\%$ $1 \times$ nenasičene palmitoleinske kisline in $\leq 4\%$ $3 \times$ nenasičene linolenske kisline, kar pomeni precejšnje število prisotnih dvojnih vezi v maščobnokislinskih verigah in posledično opazna visoka vrhova za protone CH_2 skupine ob dvojni vezi.



Slika 12: Strukturna formula molekule polisorbata 80.



Slika 13: NMR-spekter svežega vzorca PS 20, posnetega v CD₃OD.



Slika 14: NMR-spekter svežega vzorca PS 80, posnetega v CD₃OD.

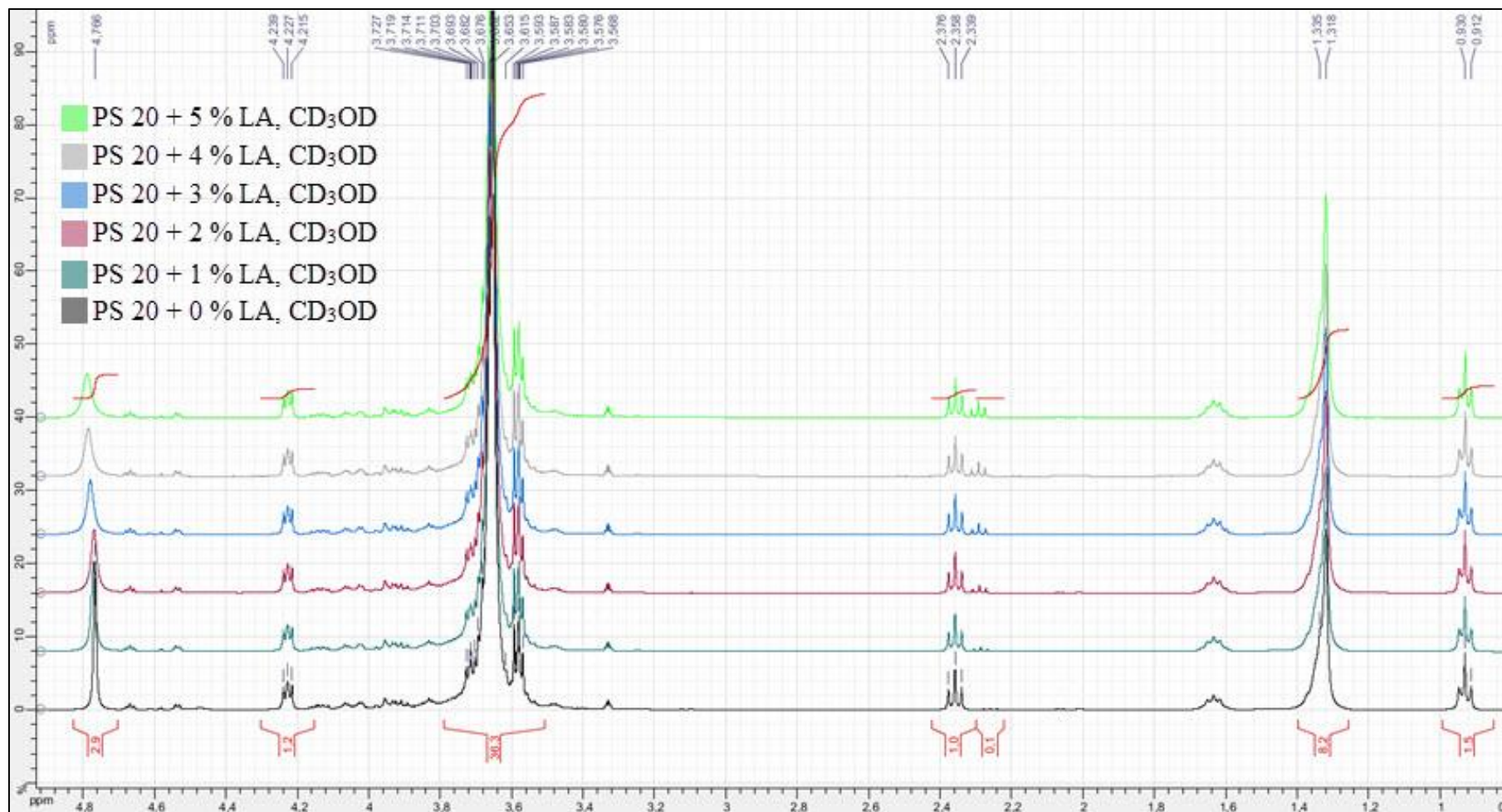
Z metodo NMR smo vzorce PS 20 z dodatki LA in vzorce PS 80 z dodatki OA analizirali v treh različnih devteriranih topilih – devteriranem metanolu (CD_3OD), devteriranem kloroformu (CDCl_3) z 0,03 % TMS in devteriranem dimetilsulfoksidu ($\text{DMSO-}d_6$) z 0,03 % TMS.

Celotni NMR-spektri za vzorce, posnete v CD_3OD , so prikazani na sliki 15 (rezultati za PS 20) in sliki 16 (rezultati za PS 80), za vzorce, posnete v CDCl_3 , so prikazani na sliki 17 (rezultati za PS 20) in sliki 18 (rezultati za PS 80), za vzorce, posnete v $\text{DMSO-}d_6$, pa so prikazani na sliki 19 (rezultati za PS 20) in sliki 20 (rezultati za PS 80).

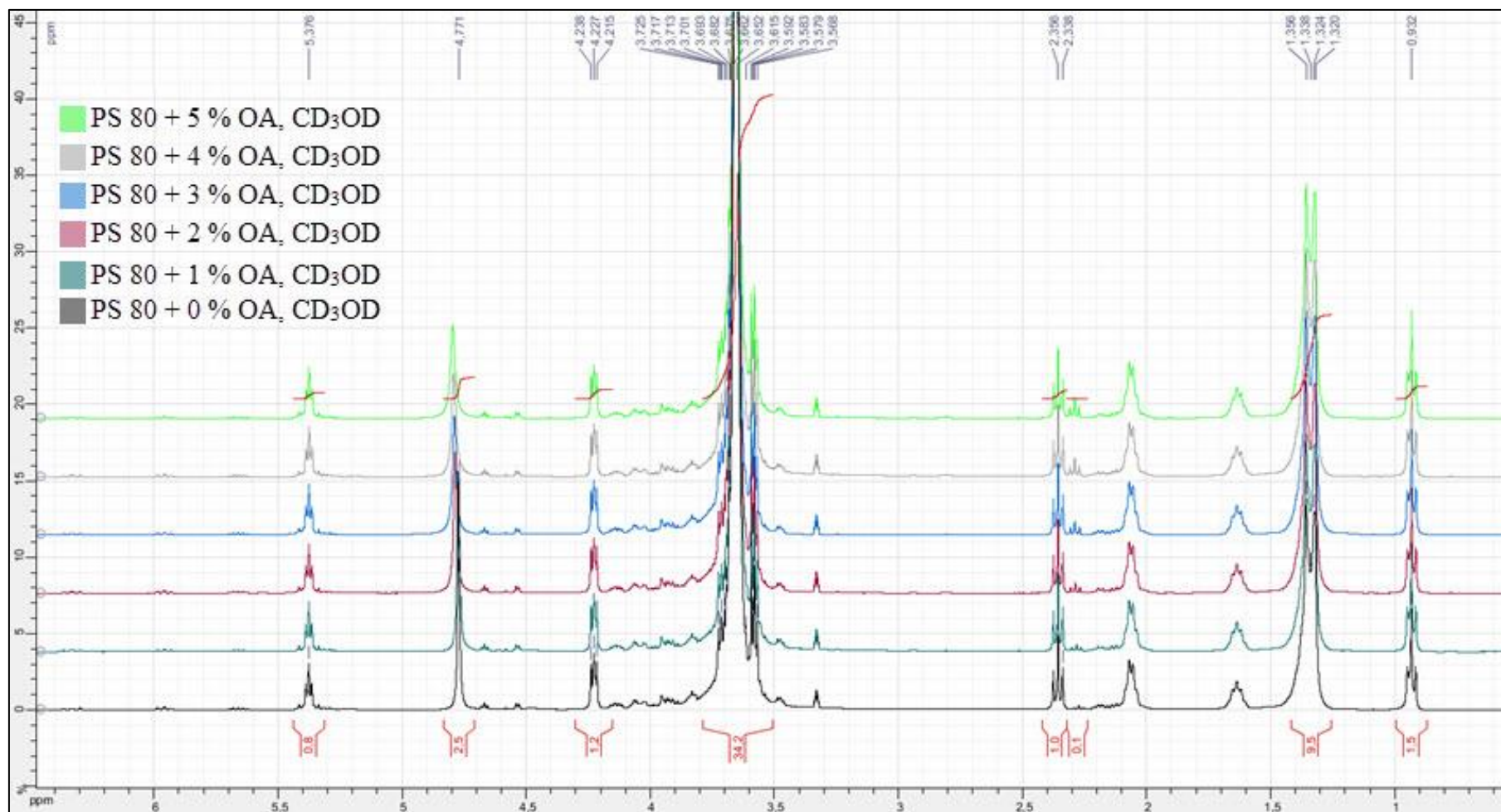
Z NMR-spektroskopijo smo **vsebnost prostih MK** določali **relativno glede na celotno vsebnost vseh MK** in sicer tako, da smo primerjali signal za protone CH_2 skupine ob estru v maščobnokislinskem delu molekule PS s signalom za protone CH_2 skupine ob karboksilni skupini na začetku prostih maščobnih kislin. Vrhova sta na sliki 13 in 14 označena z rdečo barvo. Prvi predstavlja signal za vse molekule zaestrenih maščobnih kislin v vzorcu (v nadaljevanju poimenovan **signal za zaestrene MK**), razen metanojske (H-COOH) in etanojske ($\text{CH}_3\text{-COOH}$) kisline. Drugi pa predstavlja signal za vse molekule prostih maščobnih kislin v vzorcu (v nadaljevanju poimenovan **signal za proste MK**), razen metanojske (H-COOH) in etanojske ($\text{CH}_3\text{-COOH}$) kisline.

Izseki iz NMR-spektrov, ki prikazujejo samo signal za zaestrene MK in signal za proste MK, za vzorce, posnete v CD_3OD , so prikazani na sliki 21 (rezultati za PS 20) in sliki 22 (rezultati za PS 80), za vzorce, posnete v CDCl_3 , so prikazani na sliki 23 (rezultati za PS 20) in sliki 24 (rezultati za PS 80), za vzorce, posnete v $\text{DMSO-}d_6$, pa so prikazani na sliki 25 (rezultati za PS 20) in sliki 26 (rezultati za PS 80).

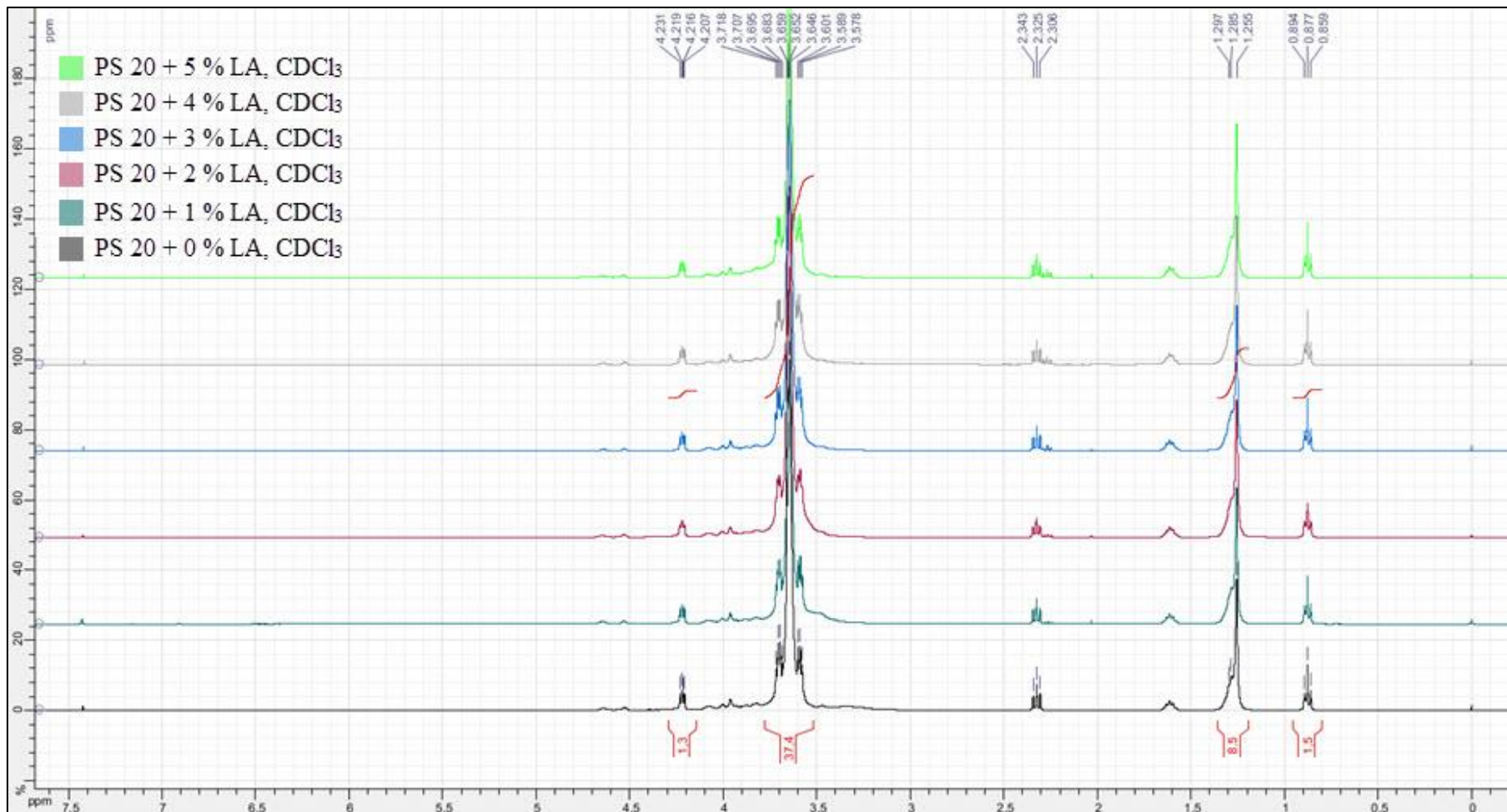
Ker je intenziteta signala, ki ga dajejo atomska jedra pri iznihavanju, sorazmerna z množino teh jeder, pomeni, da integral za skupine CH_2 ob estru (v nadaljevanju poimenovan **integral za zaestrene MK**) predstavlja količino zaestrenih molekul maščobnih kislin v vzorcu, integral za skupine CH_2 ob karboksilni skupini (v nadaljevanju poimenovan **integral za proste MK**) pa predstavlja količino prostih molekul maščobnih kislin v vzorcu. Ker želimo rezultate primerjati med seboj, smo vrednosti integralov za zaestrene MK nastavili na 1, integrali za proste MK pa nam dajejo relativne vrednosti glede na prve.



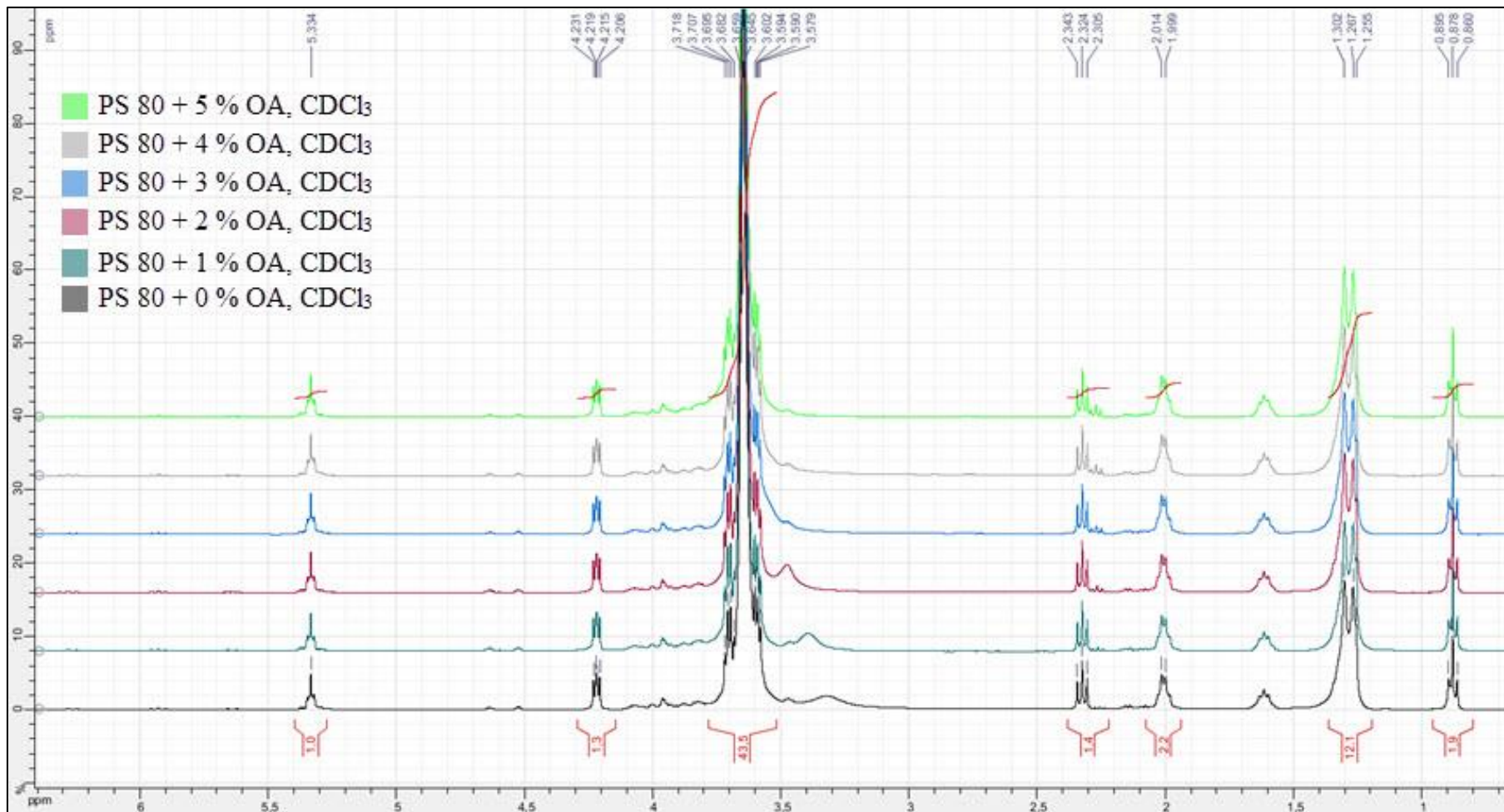
Slika 15: NMR-spektri vzorcev PS 20 z dodatki LA, posnetih v CD_3OD .



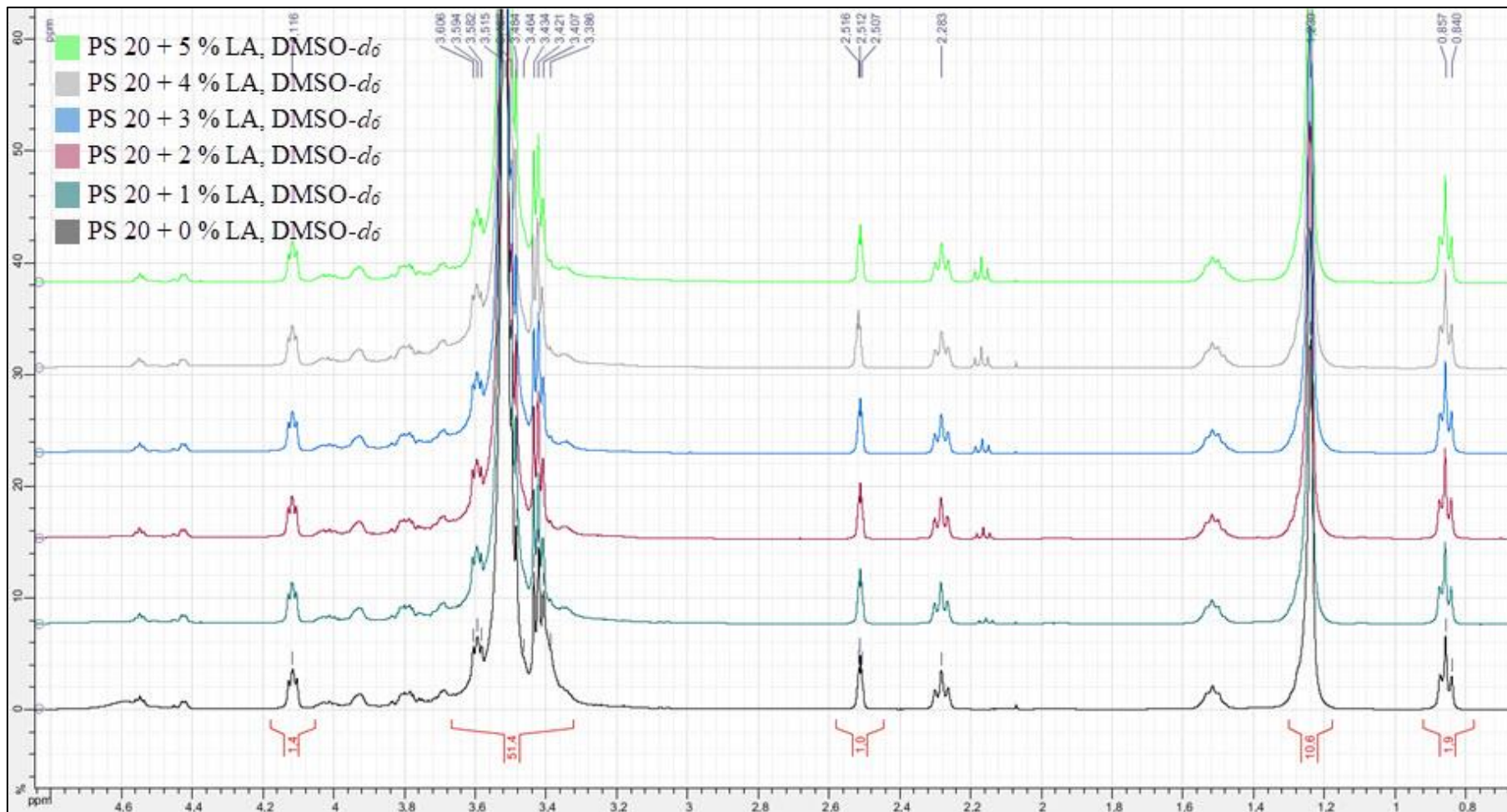
Slika 16: NMR-spektri vzorcev PS 80 z dodatki OA, posnetih v CD_3OD .



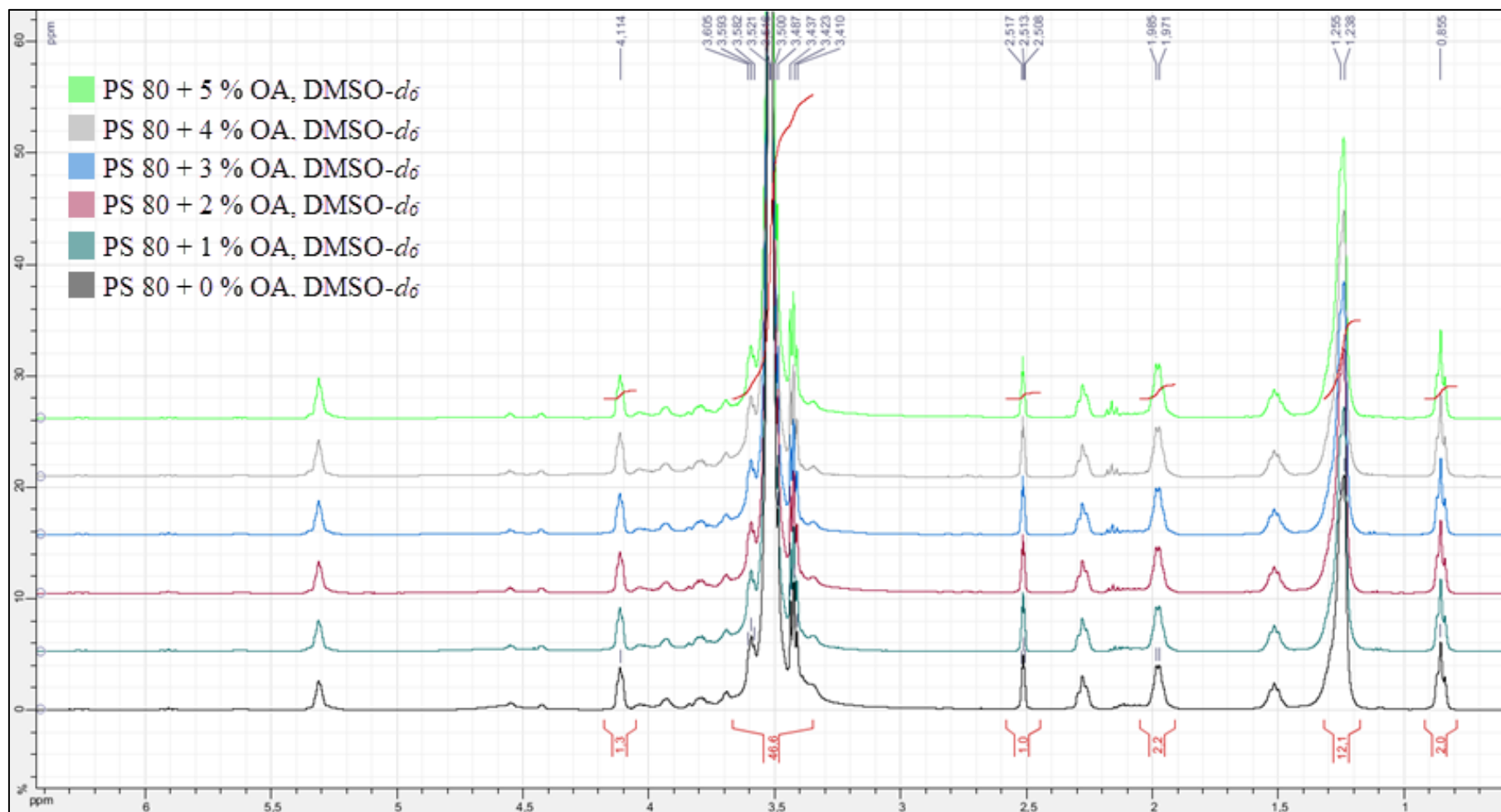
Slika 17: NMR-spektri vzorcev PS 20 z dodatki LA, posnetih v CDCl_3 .



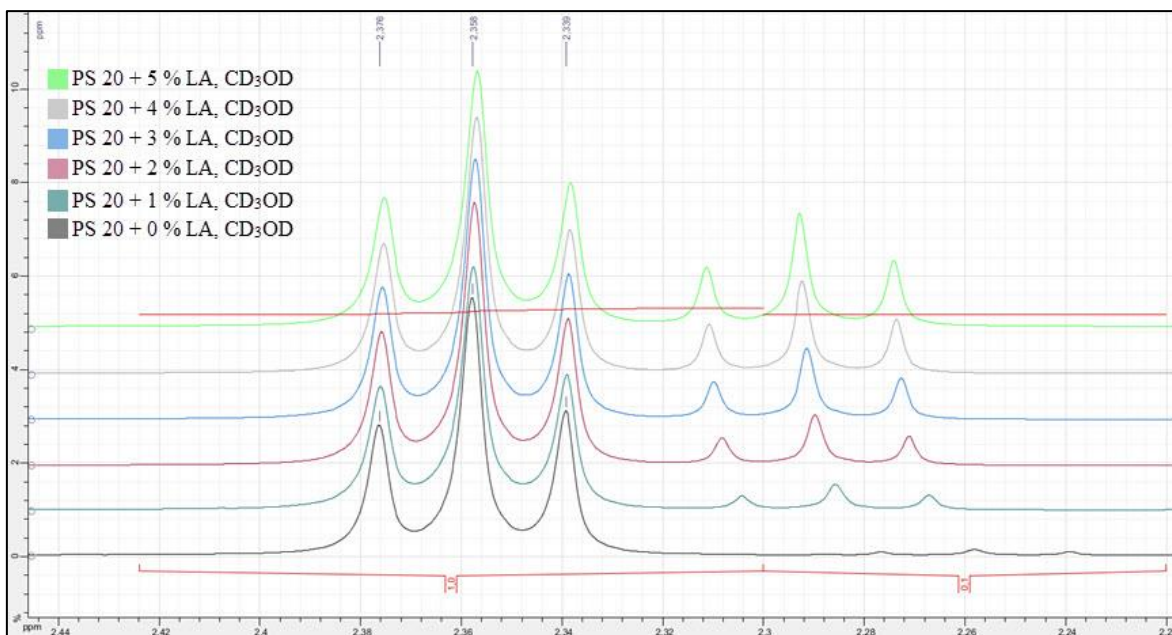
Slika 18: NMR-spektri vzorcev PS 80 z dodatki OA, posnetih v CDCl_3 .



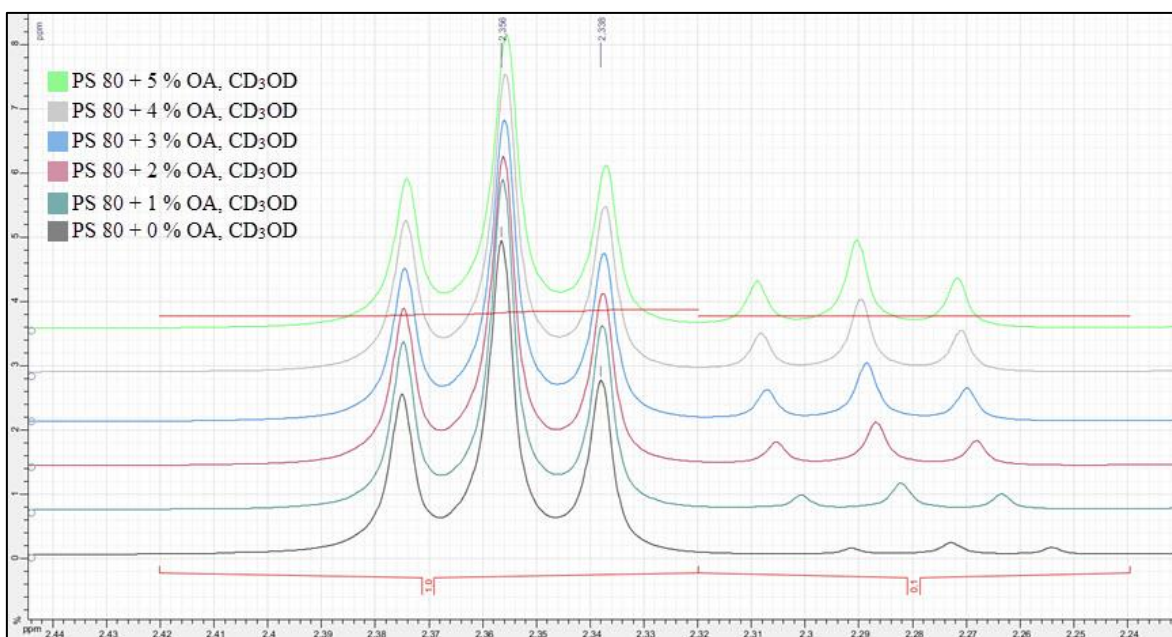
Slika 19: NMR-spektri vzorcev PS 20 z dodatki LA, posnetih v DMSO- d_6 .



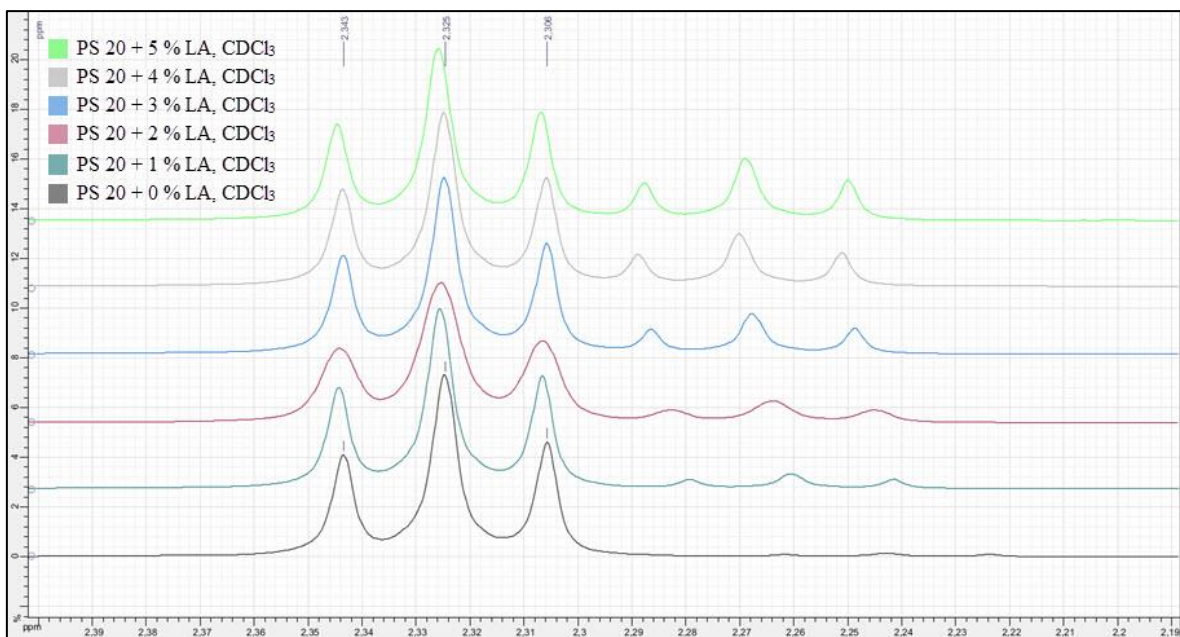
Slika 20: NMR-spektri vzorcev PS 80 z dodatki OA, posnetih v $\text{DMSO-}d_6$.



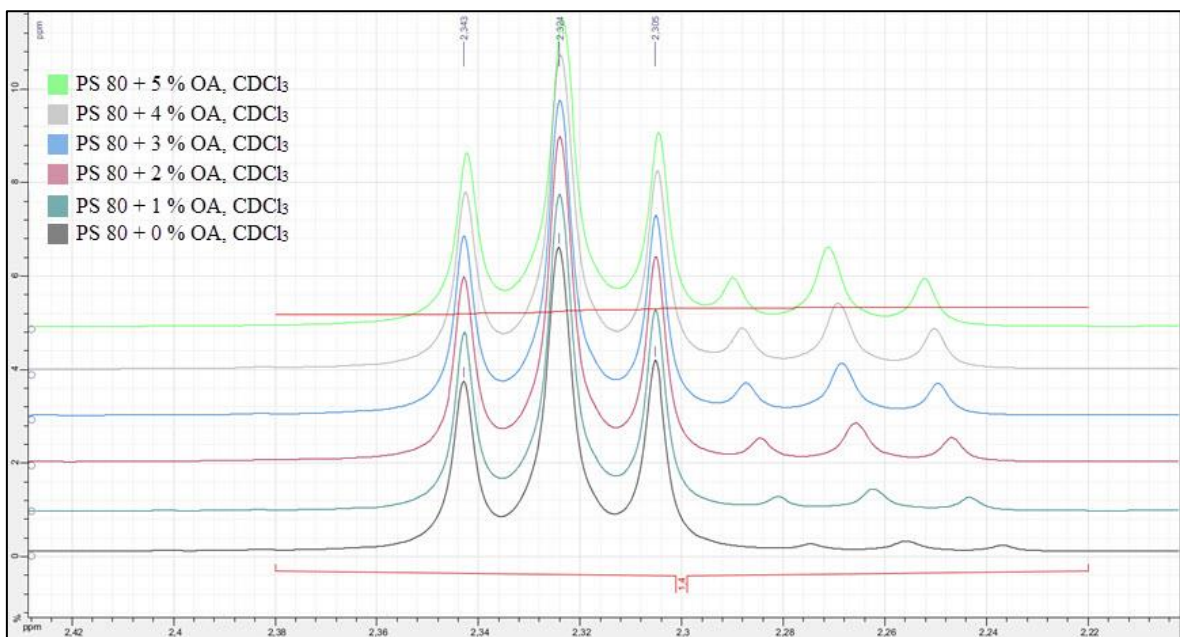
Slika 21: Izseki iz NMR-spektrov vzorcev PS 20 z dodatki LA, posnetih v CD₃OD.



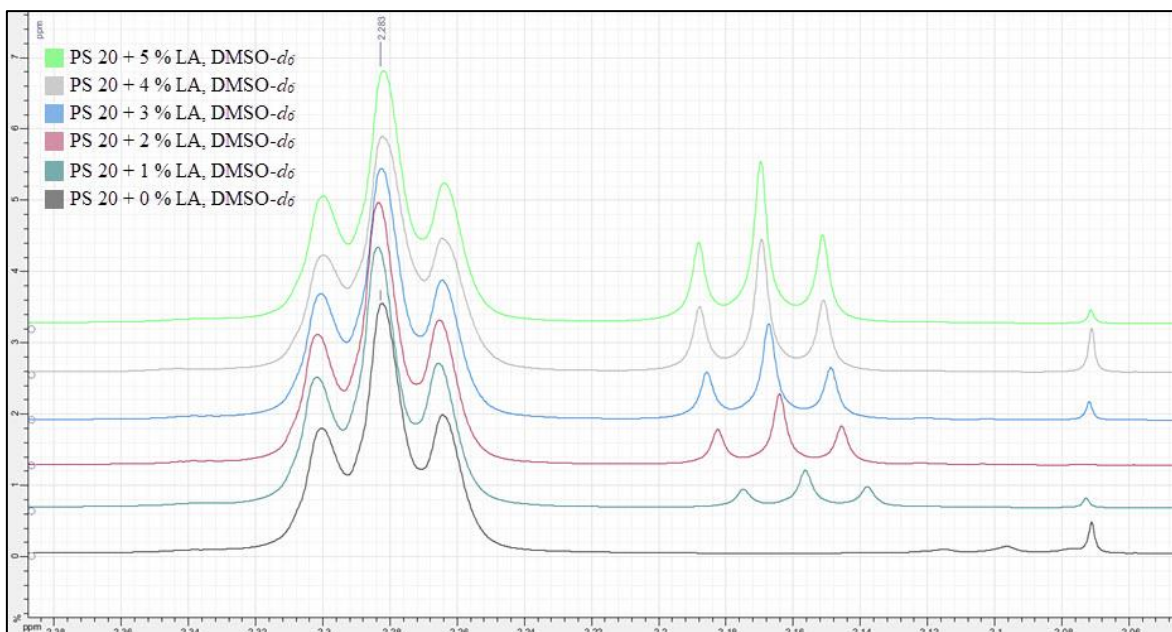
Slika 22: Izseki iz NMR-spektrov vzorcev PS 80 z dodatki OA, posnetih v CD₃OD.



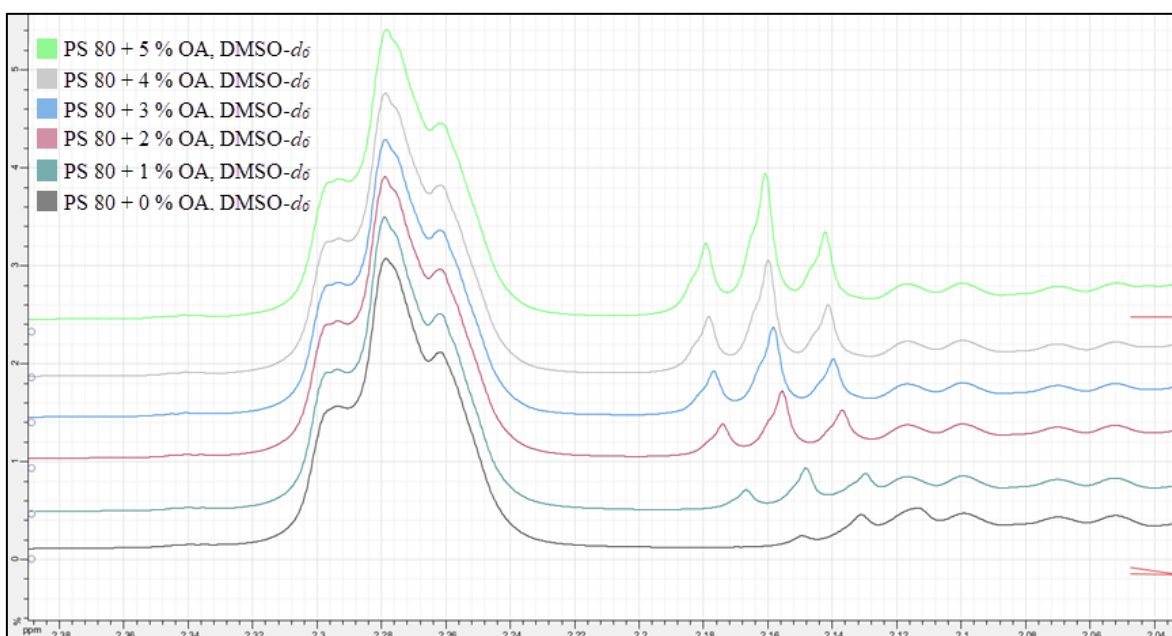
Slika 23: Izseki iz NMR-spektrov vzorcev PS 20 z dodatki LA, posnetih v CDCl_3 .



Slika 24: Izseki iz NMR-spektrov vzorcev PS 80 z dodatki OA, posnetih v CDCl_3 .



Slika 25: Izseki iz NMR-spektrov vzorcev PS 20 z dodatki LA, posnetih v DMSO- d_6 .



Slika 26: Izseki iz NMR-spektrov vzorcev PS 80 z dodatki OA, posnetih v DMSO- d_6 .

Iz izsekov NMR-spektrov lahko vidimo, da so vrhovi najboljše ločeni pri vzorcih, posnetih v $CDCl_3$, vendar sta signala za zaestrene MK in proste MK zelo skupaj, pri vzorcih, posnetih v DMSO- d_6 , pa sta signala za zaestrene MK in proste MK dovolj narazen, vendar se vrhovi prekrivajo z drugimi signali, zato vrednotenje teh rezultatov ne bi bilo ustrezno. Pri vzorcih, posnetih v CD_3OD , pa so vrhovi ustrezno ločeni ter signala za zaestrene MK

in proste MK dovolj narazen, da smo lahko določili integrale, zato smo za primerjavo in vrednotenje rezultatov upoštevali samo vrednosti integralov NMR-spektrov, posnetih v devteriranem metanolu.

V nadaljevanju so kot rezultati analize z metodo NMR podane vrednosti \int za proste MK, ki so relativne glede na vrednosti \int za zaestrene MK. Poleg vrednosti \int pa so podani tudi deleži molekul prostih MK glede na vsebnost vseh molekul MK (zaestrenih in prostih) v vzorcu, ki smo jih izračunali s pomočjo enačbe 5.

Enačba 5: Izračun deleža molekul prostih MK glede na vsebnost vseh molekul MK [%].

$$\% \text{ MK} = \left(\frac{\int_{\text{proste MK}}}{\int_{\text{proste MK}} + \int_{\text{zaestrene MK}}} \right) \cdot 100$$

$\int_{\text{proste MK}}$ = vrednost integrala za proste maščobne kisline [/]

$\int_{\text{zaestrene MK}}$ = vrednost integrala za zaestrene maščobne kisline = 1 [/]

Vrednosti \int za proste MK, ki so relativne glede na vrednosti \int za zaestrene MK, in vrednosti deležev prostih MK glede na vsebnost vseh MK so podane v preglednici IV (rezultati za PS 20) in preglednici V (rezultati za PS 80).

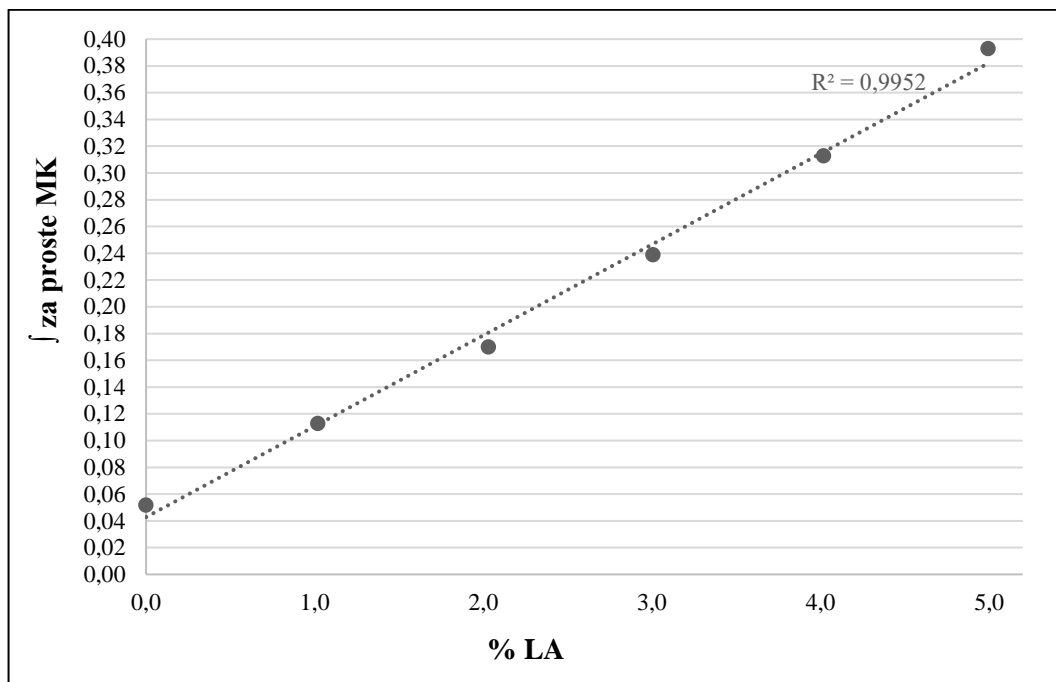
Preglednica IV: Vrednosti \int in deležev prostih MK vzorcev PS 20 z različnimi dodatki LA.

% MK	% dodane LA v PS 20	\int za proste MK	Delež prostih MK (%)
0 %	0,00 %	0,052	4,94
1 %	1,02 %	0,113	10,15
2 %	2,03 %	0,170	14,53
3 %	3,01 %	0,239	19,29
4 %	4,02 %	0,313	23,84
5 %	4,99 %	0,393	28,21

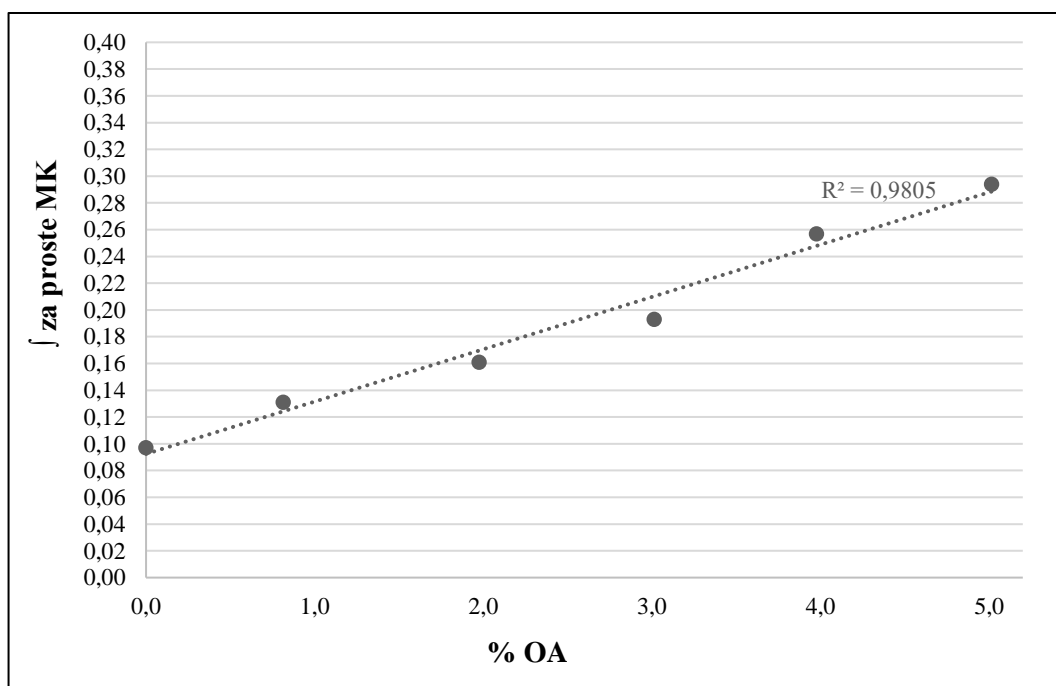
Preglednica V: Vrednosti \int in deležev prostih MK vzorcev PS 80 z različnimi dodatki OA.

% MK	% dodane OA v PS 80	\int za proste MK	Delež prostih MK (%)
0 %	0,00 %	0,097	8,84
1 %	0,81 %	0,131	11,58
2 %	1,98 %	0,161	13,87
3 %	3,01 %	0,193	16,18
4 %	3,98 %	0,257	20,45
5 %	5,02 %	0,294	22,72

Na sliki 27 je prikazan graf, ki predstavlja vrednosti \int za proste MK v odvisnosti od % LA v vzorcu PS 20, na sliki 28 pa je prikazan graf, ki predstavlja vrednosti \int za proste MK v odvisnosti od % OA v vzorcu PS 80.



Slika 27: Vrednosti \int za proste MK v odvisnosti od % LA v vzorcu PS 20.



Slika 28: Vrednosti \int za proste MK v odvisnosti od % OA v vzorcu PS 80.

4.1.2 Rezultati določanja kislinskega števila

Kislinska števila (I_A) vzorcev PS z različnimi dodatki MK smo izmerili s pomočjo farmakopejske metode določanja kislinskega števila. Dobljene vrednosti predstavljajo količino NaOH, ki je bila potrebna za nevtralizacijo prostih MK v 1 g vzorca, kar pomeni, da večje kot je kislinsko število, več je v vzorcu prisotnih prostih MK, saj je bila potrebna večja količina baze za njihovo nevtralizacijo, in obratno. Za razliko od rezultatov, pridobljenih z metodo NMR, predstavljajo vrednosti I_A vsebnost vseh prostih MK v vzorcu, tudi metanojske in etanojske kisline.

Vrednosti I_A , ki prikazujejo povprečje 3 meritev z RSD, so podane v preglednici VI (rezultati za PS 20) in preglednici VII (rezultati za PS 80).

Preglednica VI: Vrednosti I_A vzorcev PS 20 z različnimi dodatki LA.

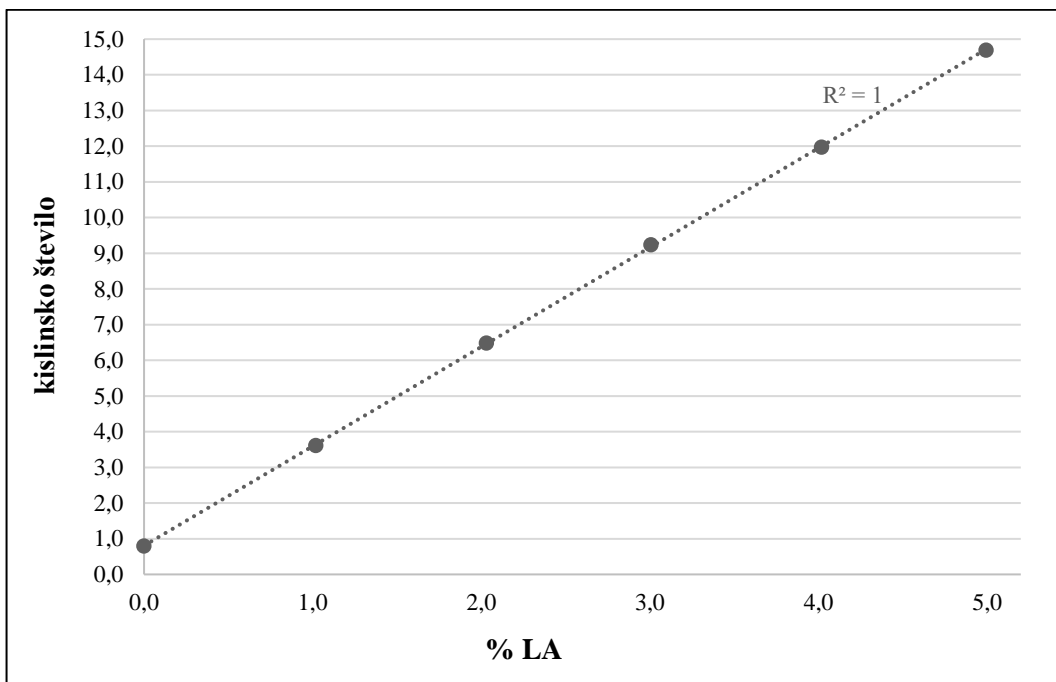
% MK	% dodane LA v PS 20	$I_A \pm RSD$
0 %	0,00 %	$0,798 \pm 0,33 \%$
1 %	1,02 %	$3,614 \pm 0,77 \%$
2 %	2,03 %	$6,482 \pm 0,51 \%$
3 %	3,01 %	$9,238 \pm 1,89 \%$
4 %	4,02 %	$11,979 \pm 0,11 \%$
5 %	4,99 %	$14,696 \pm 0,35 \%$

Preglednica VII: Vrednosti I_A vzorcev PS 80 z različnimi dodatki OA.

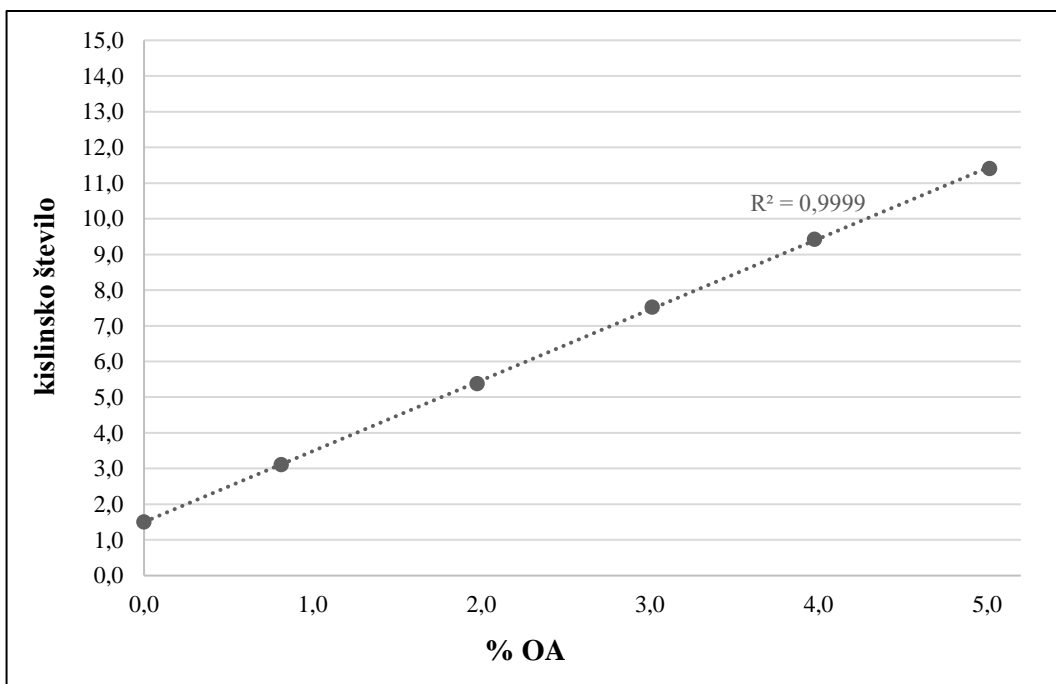
% MK	% dodane OA v PS 80	$I_A \pm RSD$
0 %	0,00 %	$1,505 \pm 0,63 \%$
1 %	0,81 %	$3,112 \pm 1,77 \%$
2 %	1,98 %	$5,384 \pm 0,94 \%$
3 %	3,01 %	$7,522 \pm 0,54 \%$
4 %	3,98 %	$9,428 \pm 1,43 \%$
5 %	5,02 %	$11,413 \pm 0,35 \%$

Vrednosti relativnega standardnega odklona (RSD) prikazujejo odstopanja posameznih izmerjenih vrednosti od povprečja, kar pomeni, da izkazujejo natančnost izvajanja meritev oz. stopnjo ujemanja rezultatov za isti vzorec. Manjši kot je RSD, manj rezultati meritev za isti vzorec med seboj variirajo. Iz rezultatov lahko vidimo, da so vrednosti RSD v večini pod 1 %, nikoli pa ne presegajo 2 %, kar pomeni, da smo meritve izvajali zelo natančno.

Na sliki 29 je prikazan graf, ki predstavlja vrednosti I_A v odvisnosti od % LA v vzorcu PS 20, na sliki 30 pa je prikazan graf, ki predstavlja vrednosti I_A v odvisnosti od % OA v vzorcu PS 80.



Slika 29: Vrednosti I_A v odvisnosti od % LA v vzorcu PS 20.



Slika 30: Vrednosti I_A v odvisnosti od % OA v vzorcu PS 80.

4.1.3 Primerjava rezultatov metode NMR in določanja kislinskega števila

Z uporabo linearne regresije smo na grafih, ki prikazujejo rezultate obeh vzorcev z obema metodama, določili tudi kvadrat koeficienta korelacije R^2 , ki prikazuje delež celotne variance spremenljivke y (vrednosti \int in vrednosti I_A) glede na spremenljivko x (% MK). Koeficient je določen na intervalu med 0 in 1; večja kot je vrednost (bližje 1), večja je linearnost oz. odvisnost spremenljivke y od x . Vrednosti R^2 regresijskih premic na grafih, ki prikazujeta vrednosti \int v odvisnosti od % MK, sta 0,9952 (rezultati za PS 20) in 0,9805 (rezultati za PS 80), vrednosti R^2 regresijskih premic na grafih, ki prikazujeta vrednosti I_A v odvisnosti od % MK, pa sta 1,000 (rezultati za PS 20) in 0,9999 (rezultati za PS 80). Vrednosti R^2 so zelo blizu 1, kar pomeni, da so vrednosti \int in vrednosti I_A močno odvisne od % MK v vzorcih PS, kar je tudi smiselno, saj z linearnim povečevanjem % MK v vzorcu tudi linearno naraščajo tako vrednosti \int za proste MK, kot tudi vrednosti I_A . Da so vrednosti R^2 skoraj 1, v enem primeru tudi točno 1, pa je tudi odraz natančnega izvajanja meritev.

Iz rezultatov analize PS z metodo NMR in rezultatov določanja kislinskega števila PS lahko razberemo, da vrednosti integralov in kislinskih števil pri vzorcih PS 20 hitreje naraščajo s povečevanjem % LA kot pri vzorcih PS 80 s povečevanjem % OA. Vrednost \int za proste MK se je pri PS 20 povečala za kar 0,341, medtem ko se je pri PS 80 povečala za 0,197; prav tako se je tudi vrednost I_A pri PS 20 povečala za kar 13,898, medtem ko se je pri PS 80 povečala za 9,908. Vzrok temu je razlika v molekularni masi (MM) dodanih maščobnih kislin, kar lahko pojasnimo z enačbo 6, ki prikazuje izračun množine snovi.

Enačba 6: Izračun množine snovi [g/mol].

$$n = \frac{m}{M}$$

m = masa snovi [g]

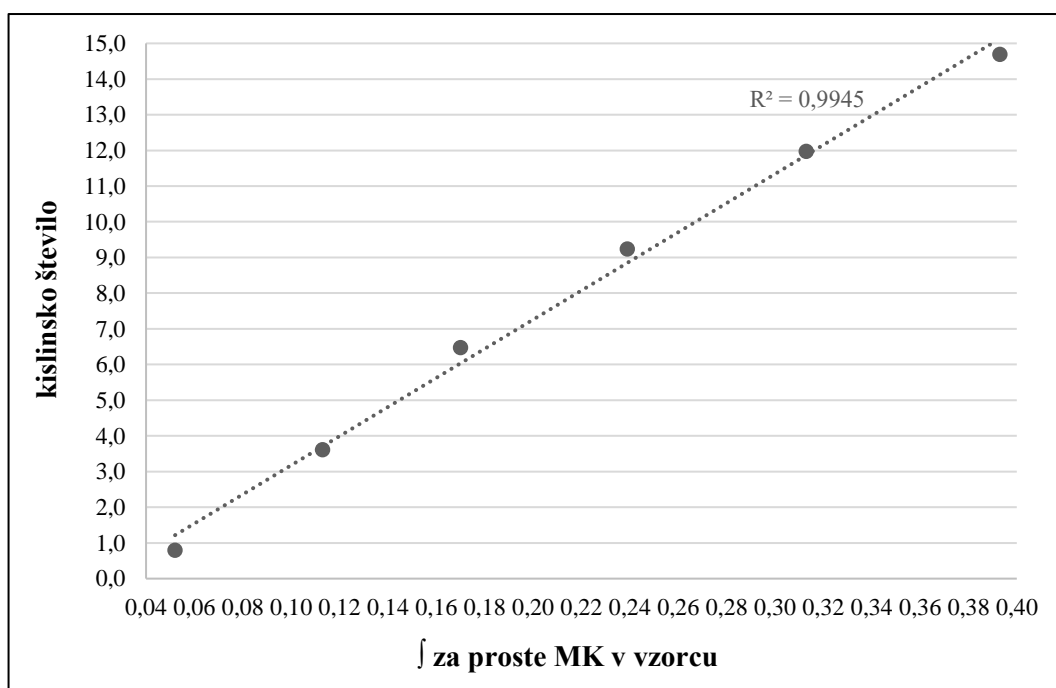
M = množina snovi [mol]

V primeru LA z manjšo MM (200,32 g/mol) je pri enakem naraščanju masnega deleža v vzorcu njena množina večja, v primeru OA z večjo MM (282,47 g/mol) pa je pri enakem naraščanju masnega deleža v vzorcu njena množina manjša. Večja kot je množina MK v vzorcu, večje so tudi vrednosti integralov in kislinskih števil, in obratno.

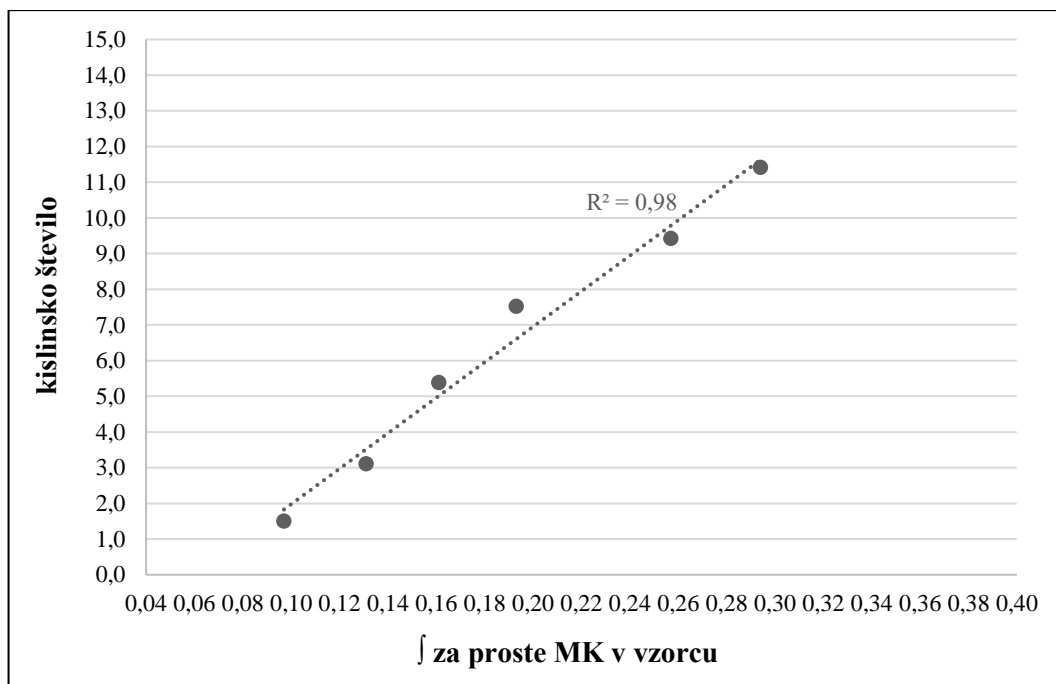
4.1.4 Določanje korelacije metod

Za ocenjevanje korelacije obeh metod smo med seboj primerjali rezultate analize z NMR-spektroskopijo in rezultate določanja kislinskega števila, in sicer vrednosti \int za proste MK z vrednostmi I_A za isti % dodane MK v vzorcu PS. Rezultate smo podali na grafih, ki prikazujeta vrednosti I_A v odvisnosti od vrednosti \int za proste MK. Na sliki 31 je prikazan graf z rezultati vzorcev PS 20, na sliki 32 pa graf z rezultati vzorcev PS 80.

Z uporabo linearne regresije smo na grafih določili kvadrat koeficienta korelacije R^2 , ki prikazuje delež celotne variance spremenljivke y (vrednosti I_A) glede na spremenljivko x (vrednosti \int). Večja kot je vrednost koeficienta (bližje 1), večja je linearnost regresijske premice oz. odvisnost vrednosti, prikazanih na grafih. Vrednosti R^2 regresijskih premic na grafih, ki prikazujeta vrednosti I_A v odvisnosti od vrednosti \int za proste MK, sta 0,9945 (rezultati za PS 20) in 0,9800 (rezultati za PS 80). Vrednosti R^2 so zelo blizu 1, kar pomeni, da vrednosti I_A glede vrednosti \int za proste MK skoraj ne variirajo in so med seboj močno odvisne. Iz rezultatov lahko povzamemo, da je korelacija metode NMR in metode določanja kislinskega števila odlična in da sta metodi med seboj primerljivi.



Slika 31: Vrednosti I_A v odvisnosti od vrednosti \int za proste MK v PS 20.



Slika 32: Vrednosti I_A v odvisnosti od vrednosti \int za proste MK v PS 80.

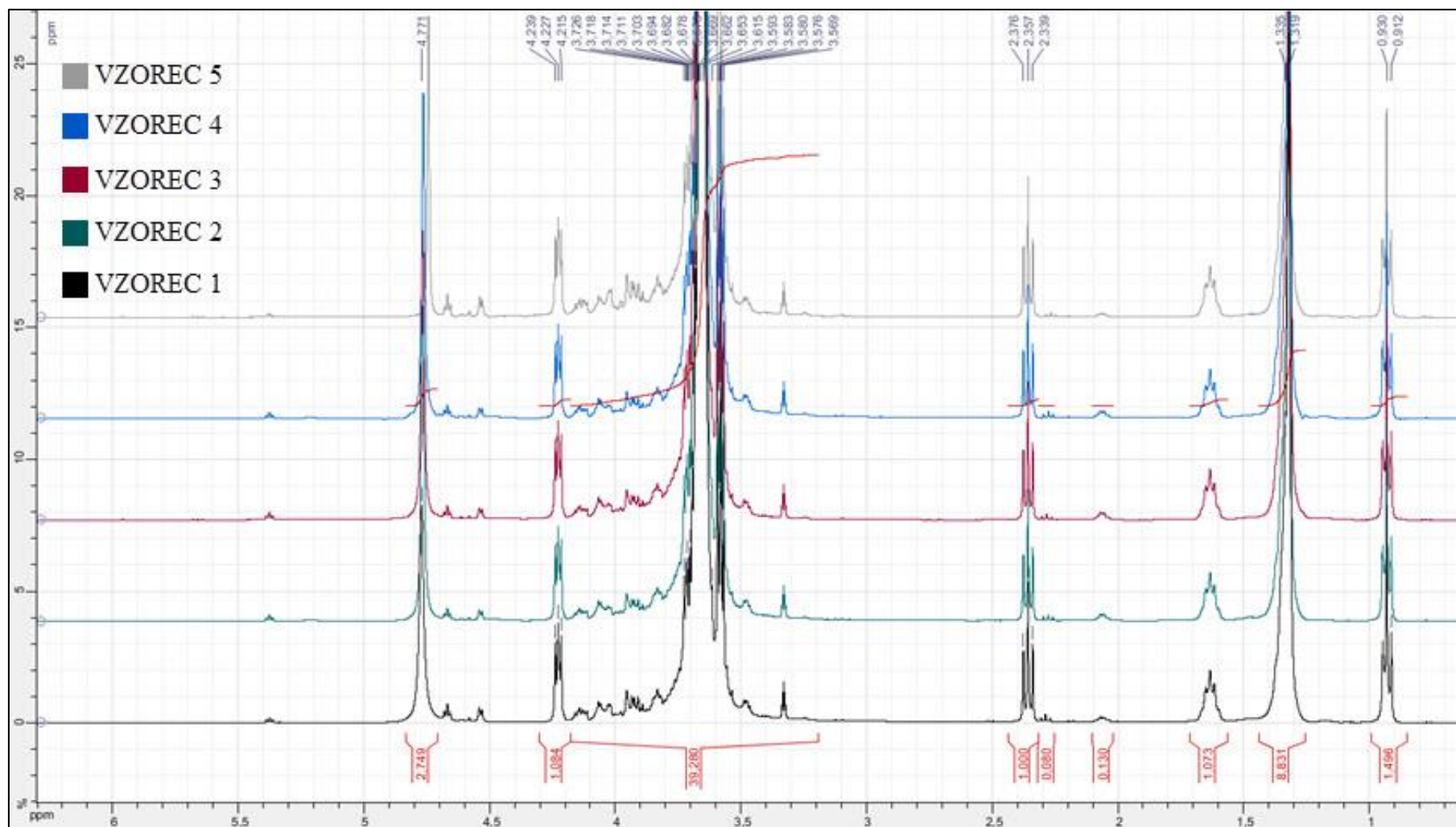
4.2 Določanje vsebnosti prostih MK v vzorcih PS s pretečenim rokom uporabnosti

V drugem delu eksperimentalnega dela magistrske naloge smo z metodo jedrske magnetne resonance in s farmakopejsko metodo določanja kislinskega števila določali vsebnost prostih maščobnih kislin v vzorcih polisorbato, ki jim je potekel rok uporabnosti, in rezultate primerjali med seboj.

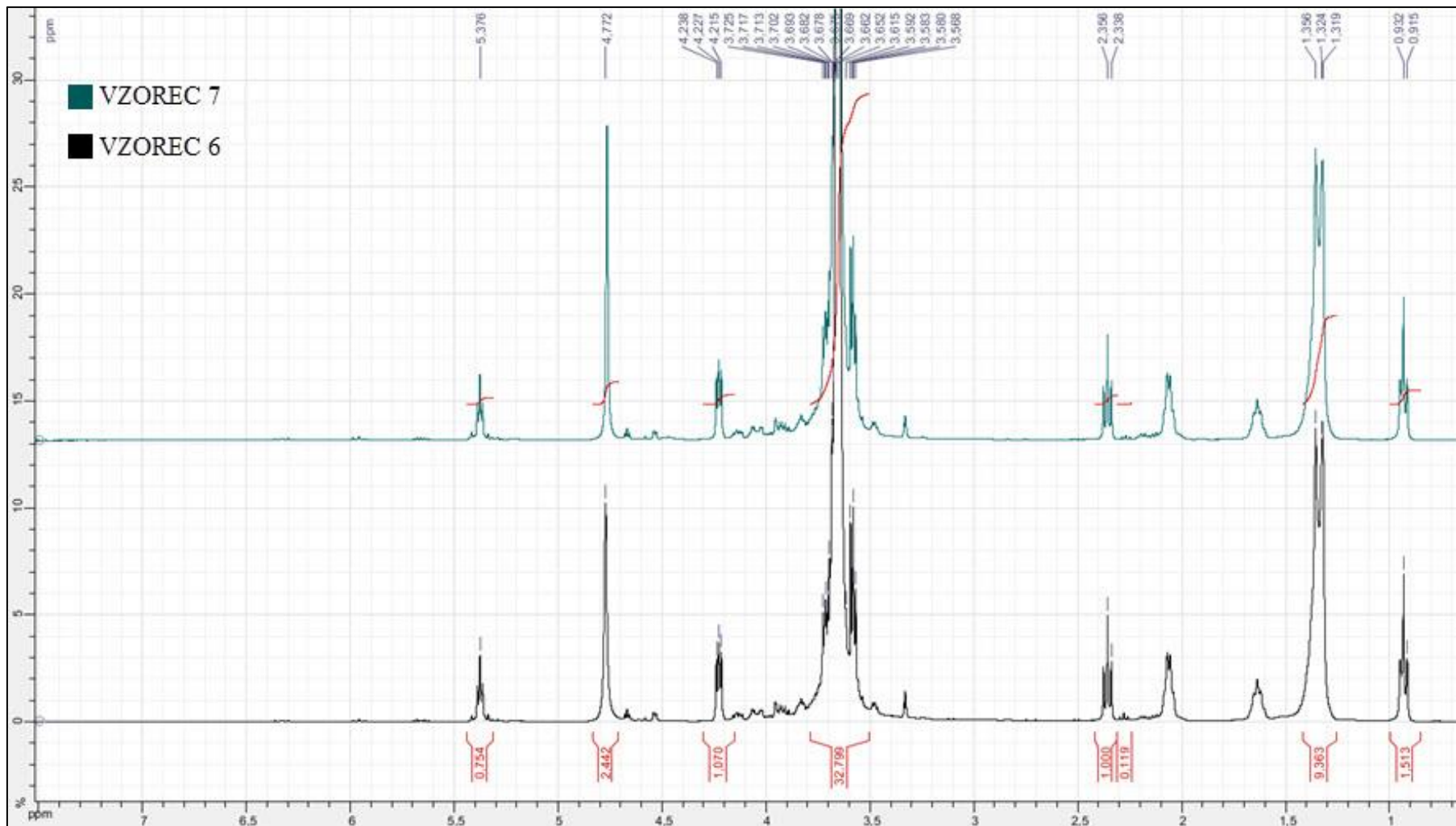
4.2.1 Rezultati analize z NMR-spektroskopijo

Na podlagi rezultatov analize svežih vzorcev PS 20 in PS 80 z metodo NMR, ki so pokazali, da so pri vzorcih, posnetih v CD_3OD , vrhovi za zaestrene in proste MK primerno ločeni za določitev integralov, smo se odločili, da vzorce PS s pretečenim rokom uporabnosti posnamemo samo v devteriranem metanolu.

V prilogah na sliki 37 (vzorec 1), sliki 38 (vzorec 2), sliki 39 (vzorec 3), sliki 40 (vzorec 4) in sliki 41 (vzorec 5) so prikazani posamezni celotni NMR-spektri za vzorce polisorbato 20 s pretečenim rokom uporabnosti, na sliki 42 (vzorec 6) in sliki 43 (vzorec 7) pa sta prikazana posamezna celotna NMR-spektra za vzorca polisorbato 80 s pretečenim rokom uporabnosti. Na sliki 33 so prikazani združeni celotni NMR-spektri za vzorce 1-5, na sliki 34 pa sta prikazana združena celotna NMR-spektra za vzorca 6 in 7.

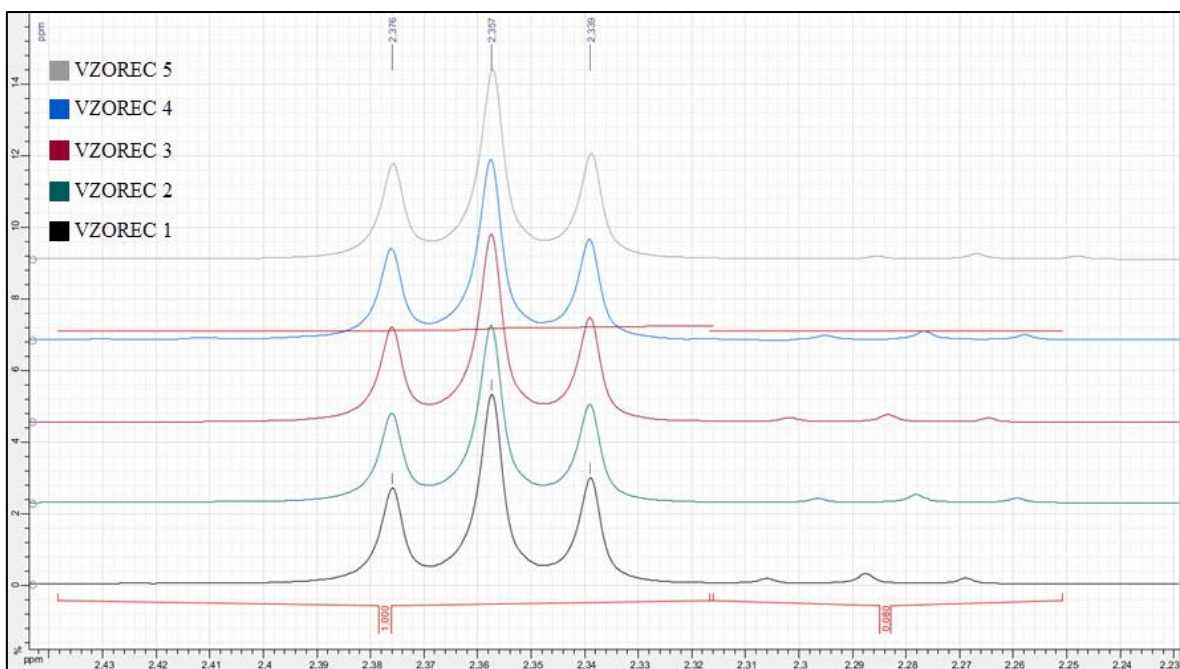


Slika 33: Celotni NMR-spektri vzorcev polisorbato 1-5.

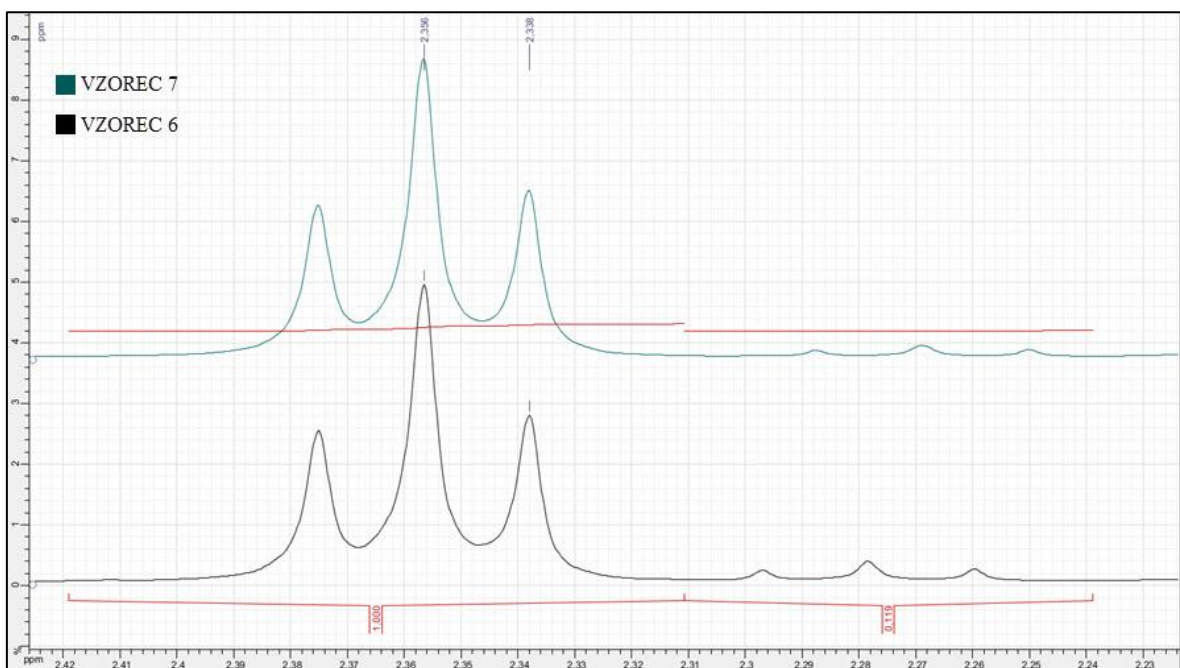


Slika 34: Celotna NMR-spektra vzorcev polisorbatov 6 in 7.

Vsebnost prostih MK v vzorcih smo z NMR-spektroskopijo določali relativno glede na celotno vsebnost vseh MK. Primerjali smo signal za zaestrene MK s signalom za proste MK, ki sta vidna pri kemijskem premiku okoli 2,3. Izseki iz NMR-spektrov, ki prikazujejo omenjena signala, so za vzorce 1-5 prikazani na sliki 35, za vzorca 6 in 7 pa na sliki 36.



Slika 35: Izseki iz NMR-spektrov vzorcev 1-5 (polisorbati 20).



Slika 36: Izseki iz NMR-spektrov vzorcev 6 in 7 (polisorbata 80).

V preglednici VIII so kot rezultati analize z metodo NMR za vzorce s pretečenim rokom uporabnosti podane vrednosti \int za proste MK, ki so relativne glede na vrednosti \int za zaestrene MK. Poleg vrednosti \int pa so podani tudi deleži molekul prostih MK glede na vsebnost vseh molekul MK (zaestrenih in prostih) v vzorcu, ki smo jih izračunali s pomočjo enačbe 5.

Preglednica VIII: Vrednosti \int in deležev prostih MK za vzorce s pretečenim rokom.

Vzorec	\int za proste MK	Delež prostih MK (%)
1	0,080	7,41
2	0,076	7,06
3	0,050	4,76
4	0,076	7,06
5	0,046	4,40
6	0,119	10,63
7	0,081	7,49

4.2.2 Rezultati določanja kislinskega števila

V preglednici IX so podane vrednosti I_A , ki prikazujejo povprečje 3 meritev z RSD, za vzorce s pretečenim rokom uporabnosti.

Preglednica IX: Vrednosti I_A za vzorce s pretečenim rokom.

Vzorec	$I_A \pm \text{RSD}$
1	2,272 \pm 0,57 %
2	1,759 \pm 1,34 %
3	1,717 \pm 0,83 %
4	1,757 \pm 1,95 %
5	1,245 \pm 0,64 %
6	2,656 \pm 1,19 %
7	1,474 \pm 0,85 %

Vrednosti relativnega standardnega odklona (RSD) prikazujejo odstopanja posameznih izmerjenih vrednosti od povprečja, kar pomeni, da izkazujejo natančnost izvajanja meritev. Iz rezultatov lahko vidimo, da vrednosti RSD ne presegajo 2 %, kar pomeni, da smo meritve izvajali natančno.

4.2.3 Primerjava rezultatov metode NMR in določanja kislinskega števila

Iz rezultatov analize PS s pretečenim rokom uporabnosti lahko razberemo, da ima največje vrednosti \int za proste MK in I_A vzorec 6, kar je tudi pričakovano, saj je od vseh analiziranih PS glede na datum proizvodnje (oktober 2011) najstarejši vzorec. Vrednost \int za proste MK je 0,119, kar predstavlja 10,63 % prostih MK glede na vsebnost vseh MK v polisorbatu, vrednost I_A pa je $2,656 \pm 1,19$ %. Čeprav podatka o »začetni« vrednosti I_A (tj. vrednosti kislinskega števila, ki jo določi proizvajalec svežemu vzorcu iz šarže) nimamo, lahko še vedno trdimo, da se je kislinsko število od datuma proizvodnje vzorca 6 precej povečalo, saj presega največjo dovoljeno vrednost I_A za polisorbat 80, tj. 2,0, ki jo določa *Evropska farmakopeja (Ph. Eur. 8.0)* (9).

Zelo velike vrednosti \int za proste MK in I_A ima tudi vzorec 1, ki je glede na datum proizvodnje (julij 2012) drugi najstarejši vzorec med analiziranimi PS. Vrednost \int za proste MK je 0,080, kar predstavlja 7,41 % prostih MK glede na vsebnost vseh MK, vrednost I_A pa je $2,272 \pm 0,57$ %, ki tudi presega največjo dovoljeno vrednost za polisorbat 20, tj. 2,0, ki jo določa *Evropska farmakopeja (Ph. Eur. 8.0)* (7). Vrednost I_A se je v primerjavi z vrednostjo I_A , ki jo navaja proizvajalec v specifikaciji in je 1,1, povečala za približno 1,2, kar je zelo veliko, vendar pričakovano, saj je od proizvodnje vzorca do naše analize preteklo 5 let in pol.

Glede na datum proizvodnje (julij 2015) sledi vzorec 7, ki je tretji najstarejši vzorec med analiziranimi PS. Vrednost \int za proste MK je 0,081, kar predstavlja 7,49 % prostih MK glede na vsebnost vseh MK, vrednost I_A pa je $1,474 \pm 0,85$ %. V primerjavi z vrednostjo I_A , ki jo navaja proizvajalec v specifikaciji in je 1,4, se je ta povečala za manj kot 0,1.

Po datumu proizvodnje (september 2015) sledi vzorec 3, katerega vrednost \int za proste MK je 0,050, kar predstavlja 4,76 % prostih MK glede na vsebnost vseh MK v polisorbatu, vrednost I_A pa je $1,717 \pm 0,83$ %. V primerjavi z vrednostjo I_A , ki jo navaja proizvajalec v specifikaciji in je 1,6, se je ta povečala za malo več kot 0,1.

Glede na datum proizvodnje (oktober 2015) sledita vzorca 2 in 4, pri katerih gre za isto serijo polisorbata, vendar še vedno za dva različna vzorca, saj sta bila shranjevana ločeno in v različnih embalažah. Izmerjene vrednosti \int za proste MK pri obeh vzorcih sta enaki in sta 0,076, kar predstavlja 7,06 % prostih MK glede na vsebnost vseh MK v polisorbatu. Vrednosti I_A pa se malo razlikujeta, vendar sta še vedno zelo podobni in sta pri vzorcu 2

1,759 ± 1,34 %, pri vzorcu 4 pa 1,757 ± 1,95 %. V primerjavi z vrednostjo I_A , ki jo navaja proizvajalec v specifikaciji in je 1,6, sta se vrednosti I_A povečali za malo manj kot 0,2. Enake vrednosti \int za proste MK in I_A vzorcev 2 in 4 nam lahko povejo, da sta bila vzorca podvržena enakim spremembam oz. shranjevana pri enakih oz. zelo podobnih razmerah.

Če primerjamo rezultate vzorca 7, vzorca 1 ter vzorcev 2 in 4, vidimo, da so vrednosti \int za proste MK praktično enake (okoli 0,08), vrednosti I_A pa se med vzorcem 1 ter vzorci 2, 4 in 7 zelo razlikujejo. Pri tem moramo upoštevati dejstvo, da vrednosti I_A dajejo prikaz vsebnosti vseh MK, ki so prisotne v vzorcu, medtem ko vrednosti \int za proste MK izključujejo vsebnost metanojske in etanojske kisline. Če je med shranjevanjem PS prihajalo do avtooksidacij vzdolž etilenoksidnega dela PS in s tem do nastanka zlasti kratkoveržnih maščobnih kislin, kot sta metanojska in etanojska kislina, bodo izmerjene vrednosti I_A posledično večje. Zato si precejšnje povečanje vrednosti I_A pri vzorcu 1 (in tudi pri vzorcu 6) lahko razlagamo kot posledico oksidacijskih procesov v vzorcih, kar je tudi pričakovano, saj sta vzorca najstarejša. Precej velike vrednosti \int za proste MK pri vzorcu 7 v primerjavi z manjšo vrednostjo I_A napram vrednostim I_A drugih vzorcev ne znamo pojasniti.

Če primerjamo rezultate vzorcev 2 in 4 z rezultati vzorca 3, pa lahko vidimo, da so vrednosti vzorcev 2 in 4, ki sta sicer mlajša, večje od izmerjenih vrednosti vzorca 3, iz česar lahko sklepamo, da je bil vzorec 3 podvržen manj razgradnim reakcijam, kar je lahko posledica primernejšega ravnanja z njim – odsotnost svetlobe in kisika, nižje temperature shranjevanja itd.

Najmlajši vzorec glede na datum proizvodnje (december 2015) je vzorec 5, katerega vrednost \int za proste MK je 0,046, kar predstavlja 4,40 % prostih MK glede na vsebnost vseh MK v polisorbatu, vrednost I_A pa je 1,245 ± 0,64 %. Iz rezultatov je razvidno, da je dobljena vrednost I_A v primerjavi z vrednostjo I_A , ki jo navaja proizvajalec v specifikaciji in je 1,3, celo manjša. Pri rezultatih je treba upoštevati tudi eksperimentalno napako pri določanju kislinskega števila, ki je možna na obeh straneh, tako pri proizvajalcu kot pri našem določanju, prav tako lahko do opazne razlike pride tudi zaradi zaokroževanja dobljenih vrednosti. Vsekakor pa lahko povzamemo, da se vrednost I_A vzorca 5 od datuma proizvodnje do naše analize ni spreminjala, kar pomeni, da med samim shranjevanjem ni prihajalo do večjih sprememb in razgradnih reakcij, ki bi bile vzrok za nastanek maščobnih kislin in s tem povečanje vrednosti kislinskega števila.

Če primerjamo dobljene vrednosti vzorca 3 in 5, lahko vidimo, da se vrednosti \int za proste MK razlikujeta zelo malo (okoli 0,05), medtem ko je vrednost I_A vzorca 3 precej večja od vrednosti I_A vzorca 5. Velika razlika je tudi med vrednostma I_A , ki ju navaja proizvajalec v specifikaciji, iz česar lahko povzamemo, da je bila že v fazi izdelave vzorca 3 v njem prisotna večja količina metanojske in etanojske kisline, do katere pa je verjetno še dodatno prišlo zaradi nastanka razgradnih reakcij med shranjevanjem.

Če primerjamo vrednosti I_A vzorcev 5 in 7 z vrednostmi I_A drugih vzorcev, ki so bili proizvedeni leta 2015, lahko vidimo, da je pri vzorcih 5 in 7, ki sta imela že vrednost I_A , ki jo navaja proizvajalec v specifikaciji, precej manjšo od drugih vzorcev, opazno manjše povečanje kislinskega števila. Kot že omenjeno, je hidroliza estrske vezi do prostih MK kislinsko katalizirana reakcija, pri kateri se v kislem okolju karbonilna skupina protonira, kar olajša nukleofilni napad, zato je lahko manjše povečanje vrednosti I_A pri vzorcih z manjšo začetno vrednostjo posledica manjše kislosti raztopine in s tem manjše dovzetnosti na hidrolizo polisorbata.

Iz rezultatov kislinskih števil je razvidno, da noben vzorec, proizveden leta 2015, ne presega največje dovoljene vrednosti I_A 2,0, ki jo določa *Evropska farmakopeja (Ph. Eur. 8.0)*, kar pomeni, da so vzorci kljub preteku roka uporabnosti še vedno ustrezni za uporabo.

5. SKLEP

V prvem delu magistrske naloge smo med seboj primerjali rezultate, dobljene z metodo jedrske magnetne resonance in farmakopejsko metodo določanja kislinskega števila, s katerima smo izbranim vzorcem polisorbatov določali vsebnost prostih maščobnih kislin. Pri tem smo dokazali, da metodi korelirata oz. sta primerljivi, kar pomeni, da se lahko za kvantitativno vrednotenje prostih maščobnih kislin v polisorbatih uporablja NMR-spektroskopija, ki je precej hitrejša in preprostejša od metode določanja I_A .

V drugem delu magistrske naloge smo z obema metodama vrednotili vsebnost prostih maščobnih kislin v vzorcih polisorbatov, ki jim je potekel rok uporabnosti. Pri tem smo prišli do zaključkov:

- Vzorec 6, ki je najstarejši glede na datum proizvodnje, ima pričakovano največje vrednosti \int za proste MK in I_A .
- Vzorec 5, ki je najmlajši glede na datum proizvodnje, ima pričakovano najmanjše vrednosti \int za proste MK in I_A .
- Pri vzorcu 5 se vrednost I_A od datuma proizvodnje ni povečala, kar pomeni, da v njem ni prišlo do razgradnje polisorbata.
- Pri vzorcih 2 in 4, ki predstavljata isto serijo polisorbata, smo dobili skoraj enake rezultate, kar pomeni, da noben od njiju ni bil podvržen večjim razgradnim spremembam.
- Vrednosti I_A vzorcev 1 in 6, ki sta najstarejša po datumu proizvodnje, presegata največjo dovoljeno vrednost I_A , ki jo določa *Evropska farmakopeja (Ph. Eur. 8.0)*.
- Vrednosti I_A vzorcev 2, 3, 4, 5 in 7, ki so proizvedeni leta 2015, ne presegajo največje dovoljene vrednosti I_A , ki jo določa *Evropska farmakopeja (Ph. Eur. 8.0)*, kar pomeni, da so po tem kriteriju še vedno primerni za uporabo.
- Pri vzorcih 5 in 7, ki imata najmanjšo vrednost I_A , ki jo navaja proizvajalec v specifikaciji, je opazna najmanjša sprememba v dvigu vrednosti I_A .

Z magistrsko nalogo smo dokazali, da se vsebnost prostih maščobnih kislin v polisorbatih sčasoma povečuje, vendar v predvidenem roku uporabnosti ne preseže največje dovoljene vrednosti, ki jo določa *Evropska farmakopeja (Ph. Eur. 8.0)*, zato vsebnost prostih maščobnih kislin ne bi smela vplivati na kakovost polisorbatov in tudi na kakovost končnih izdelkov za parenteralno uporabo.

6. LITERATURA

1. Kerwin B. A: *Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: Structure and degradation pathways*. Journal of Pharmaceutical Sciences 2008; 97 (8): 2924-2935.
2. Cao X, Matthew Fesinmeyer R, Pierini C. J, Siska C. C, Litowski J. R, Brych S, Wen Z.-Q, Kleemann G. R: *Free fatty acid particles in protein formulations, part 1: Microspectroscopic identification*. Journal of Pharmaceutical Sciences 2015; 104: 433-446.
3. Randolph T. W, Jones L. S: *Surfactant-protein interactions*. V: Carpenter J. F, Manning M. C: *Rational design of stable protein formulations: Theory and practice, Volume 13*, Springer Science+Business Media, New York, 2002: 159-171.
4. Martos A, Koch W, Jiskoot W, Wuchner K, Winter G, Friess W, Hawe A: *Trends on analytical characterization of Polysorbates and their degradation products in biopharmaceutical formulations*. Journal of Pharmaceutical Sciences 2017; 106: 1722-1735.
5. Kishore R. S. K, Kiese S, Fischer S, Pappenberger A, Grauschopf U, Mahler H.-C: *The degradation of Polysorbates 20 and 80 and its potential impact on the stability of biotherapeutics*. Pharmaceutical Research 2011; 28: 1194-1210.
6. Siska C. C, Pierini C. J, Lau H. R, Latypov R. F, Matthew Fesinmeyer R, Litowski J. R: *Free fatty acid particles in protein formulations, part 2: Contribution of Polysorbate raw material*. Journal of Pharmaceutical Sciences 2015; 104: 447-456.
7. *Polysorbate 20*. V: *European Pharmacopoeia, Volume 2*, 8th Edition (8.0), EDQM, Strasbourg, 2014: 3056-3057.
8. *4.1.1. Reagents – Lauric Acid*. V: *European Pharmacopoeia, Volume 1*, 8th Edition (8.0), EDQM, Strasbourg, 2014: 480.
9. *Polysorbate 80*. V: *European Pharmacopoeia, Volume 2*, 8th Edition (8.0), EDQM, Strasbourg, 2014: 3058-3060.
10. *4.1.1. Reagents – Oleic Acid*. V: *European Pharmacopoeia, Volume 1*, 8th Edition (8.0), EDQM, Strasbourg, 2014: 496.

11. Donbrow M, Azaz E, Pillersdorf A: *Autoxidation of Polysorbates*. Journal of Pharmaceutical Sciences 1978; 67 (12): 1676-1681.
12. Dolenc D: *Vaje iz spektroskopije: tabele in spektroskopski problemi, gradivo za vaje iz organske analize [interno študijsko gradivo]*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana, 2010: 1-26.
13. Pavia D. L, Lampman G. M, Kriz G. S, Vyvyan J. A: *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. V *Introduction to Spectroscopy*, Fifth Edition, Cengage Learning, Stamford, 2014: 105-176.
14. *Jedrska magnetna resonanca*. https://sl.wikipedia.org/wiki/Jedrska_magnetna_resonanca; dostop: 04.04.2018.
15. Anderson, R. J, Bendell D. J, Groundwater P. W: *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. V *Organic Spectroscopic Analysis*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2004: 51-82.
16. Skoog D. A, West D. M, Holler F. J, Crouch S. R: *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Ninth Edition, Thomson Brooks/Cole, Belmont, 2004: 302-344.
17. 2.5.1. *Acid Value*. V: *European Pharmacopoeia, Volume 1*, 8th Edition (8.0), EDQM, Strasbourg, 2014: 155.
18. *Acid – base indicators and titrations*. <http://www.ch.ic.ac.uk/vchemlib/course/indi/>, dostop: 18.04.2018.
19. Zhang Q, Wang A, Meng Y, Ning T, Yang H, Ding L, Xiao X, Li X: *NMR method for accurate quantification of Polysorbate 80 copolymer composition*. ACS Publications: Analytical Chemistry 2015; 87: 9810-9816.
20. 4.1.1. *Reagents – Phenolphthalein solution R1*. V: *European Pharmacopoeia, Volume 1*, 8th Edition (8.0), EDQM, Strasbourg, 2014: 500.
21. 4.2.2. *Volumetric solutions – 1 M Sodium hydroxide*. V: *European Pharmacopoeia, Volume 1*, 8th Edition (8.0), EDQM, Strasbourg, 2014: 549.
22. *Volumetric Solutions – Sodium Hydroxide, Normal (1 N)*. V: *United States Pharmacopoeia*, 32, United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, 2009: 875.
23. *Organometallics*, volume 29, Stockholm, 2010; 9: 2177.

7. PRILOGE

7.1 Priprava vzorcev PS 20 in PS 80 z dodatki standarda MK

7.1.1 Vzorci PS 20

Preglednica X: Natehtane mase vzorca PS 20 v plastičnih centrifugirkah (m_{PS}), izračunane potrebne mase standarda LA za dodatek PS 20 (potrebne m_{MK}), natehtane dodane mase standarda LA (dodane m_{MK}) in izračunane točne vsebnosti standarda LA v vzorcih PS 20 (% dodane MK).

% MK	m_{PS} [g]	Potrebne m_{MK} [mg]	Dodane m_{MK} [mg]	% dodane MK
1 %	16,0957	162,58	165,69	1,02
2 %	16,0231	327,00	332,13	2,03
3 %	16,0239	495,58	496,62	3,01
4 %	16,0361	668,17	671,39	4,02
5 %	16,0846	846,56	845,65	4,99

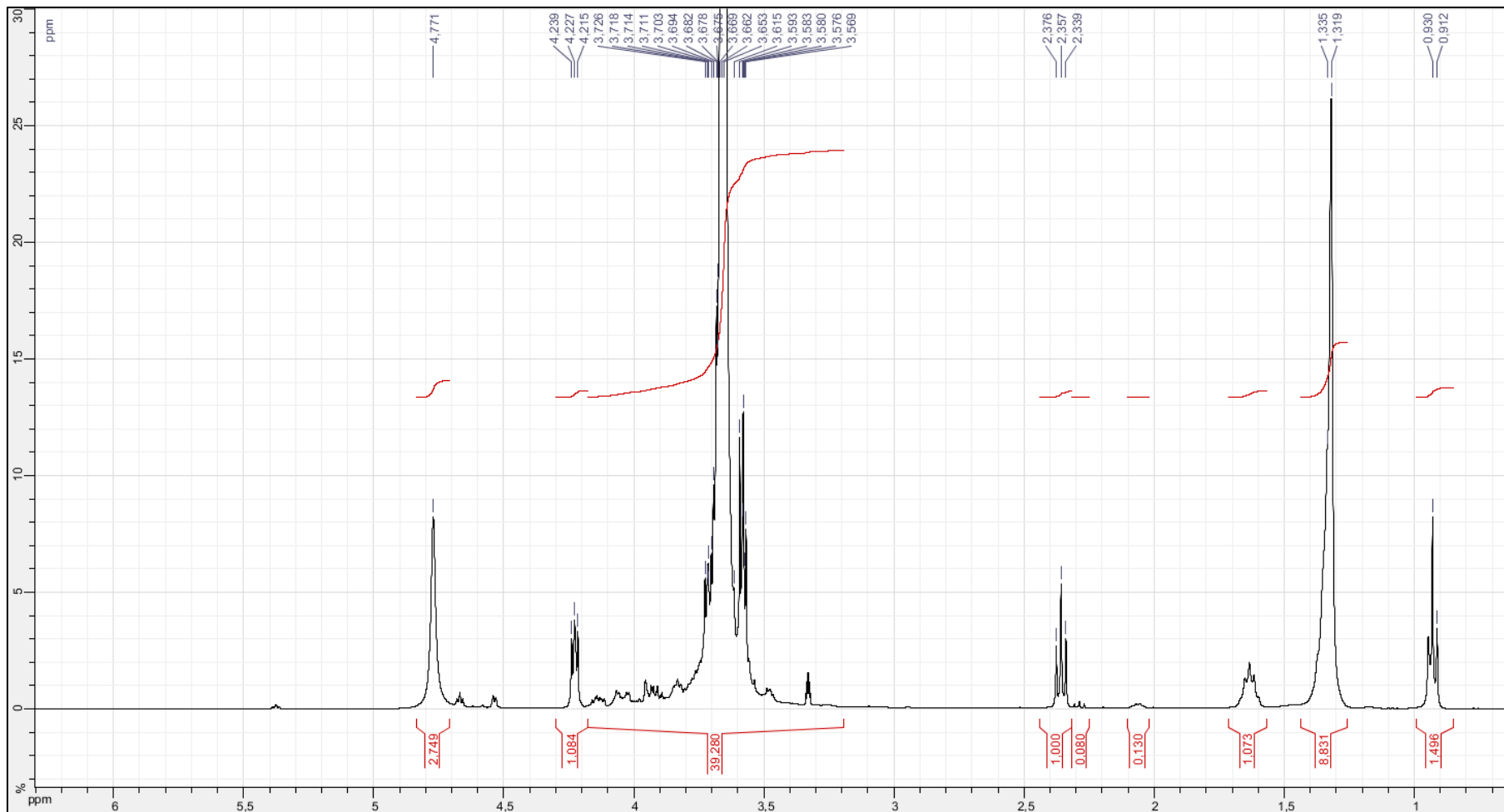
7.1.2 Vzorci PS 80

Preglednica XI: Natehtane mase vzorca PS 80 v plastičnih centrifugirkah (m_{PS}), izračunane potrebne mase standarda OA za dodatek PS 80 (potrebne m_{MK}), natehtane dodane mase standarda OA (dodane m_{MK}) in izračunane točne vsebnosti standarda OA v vzorcih PS 80 (% dodane MK).

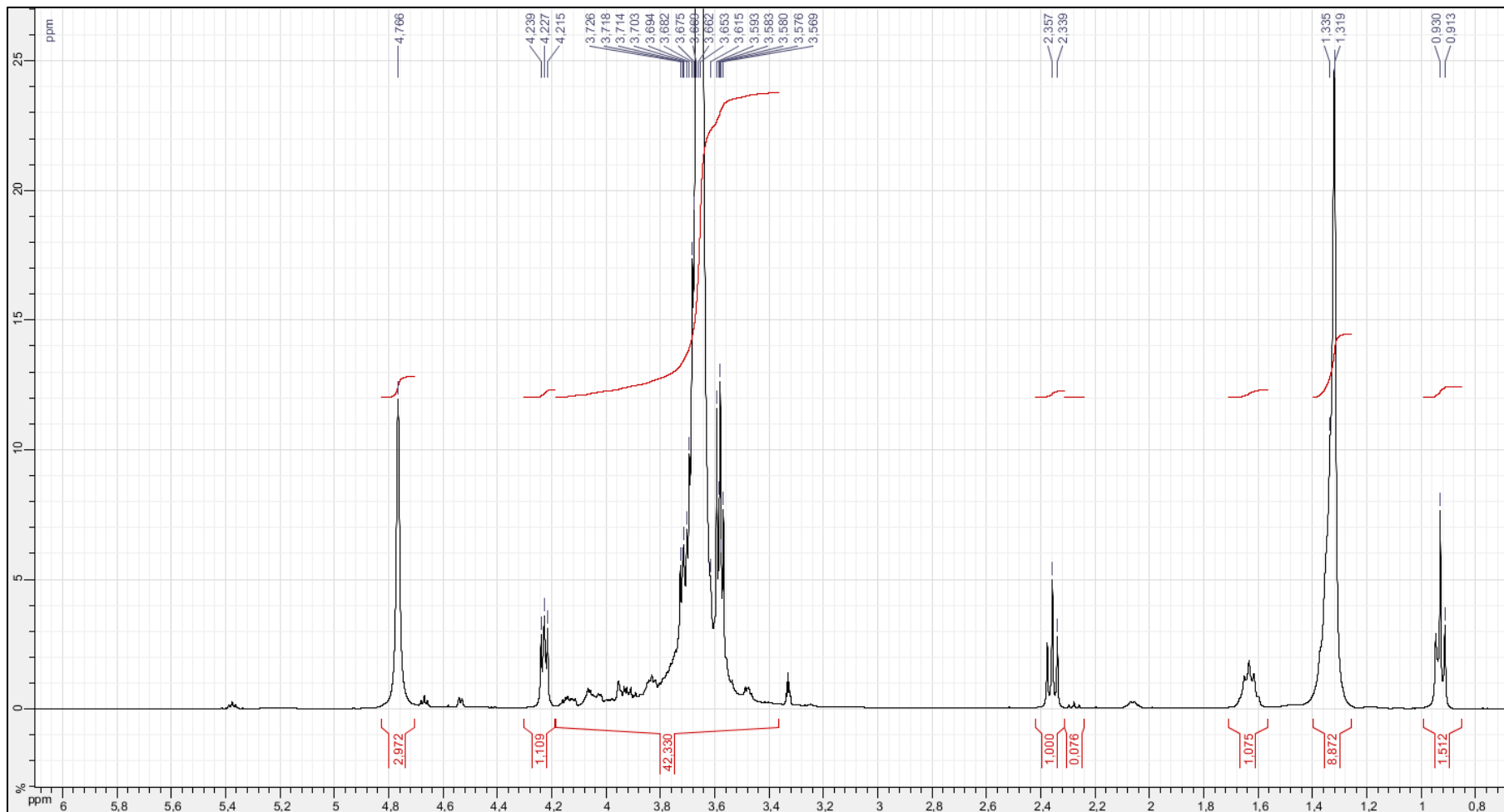
% MK	m_{PS} [g]	Potrebne m_{MK} [mg]	Dodane m_{MK} [mg]	% dodane MK
1 %	15,5436	157,01	127,38	0,81
2 %	15,5453	317,25	313,41	1,98
3 %	15,5395	480,60	482,81	3,01
4 %	15,5687	648,70	644,86	3,98
5 %	15,5353	817,65	820,25	5,02

7.2 Analiza vzorcev PS s pretečenim rokom uporabnosti z metodo NMR

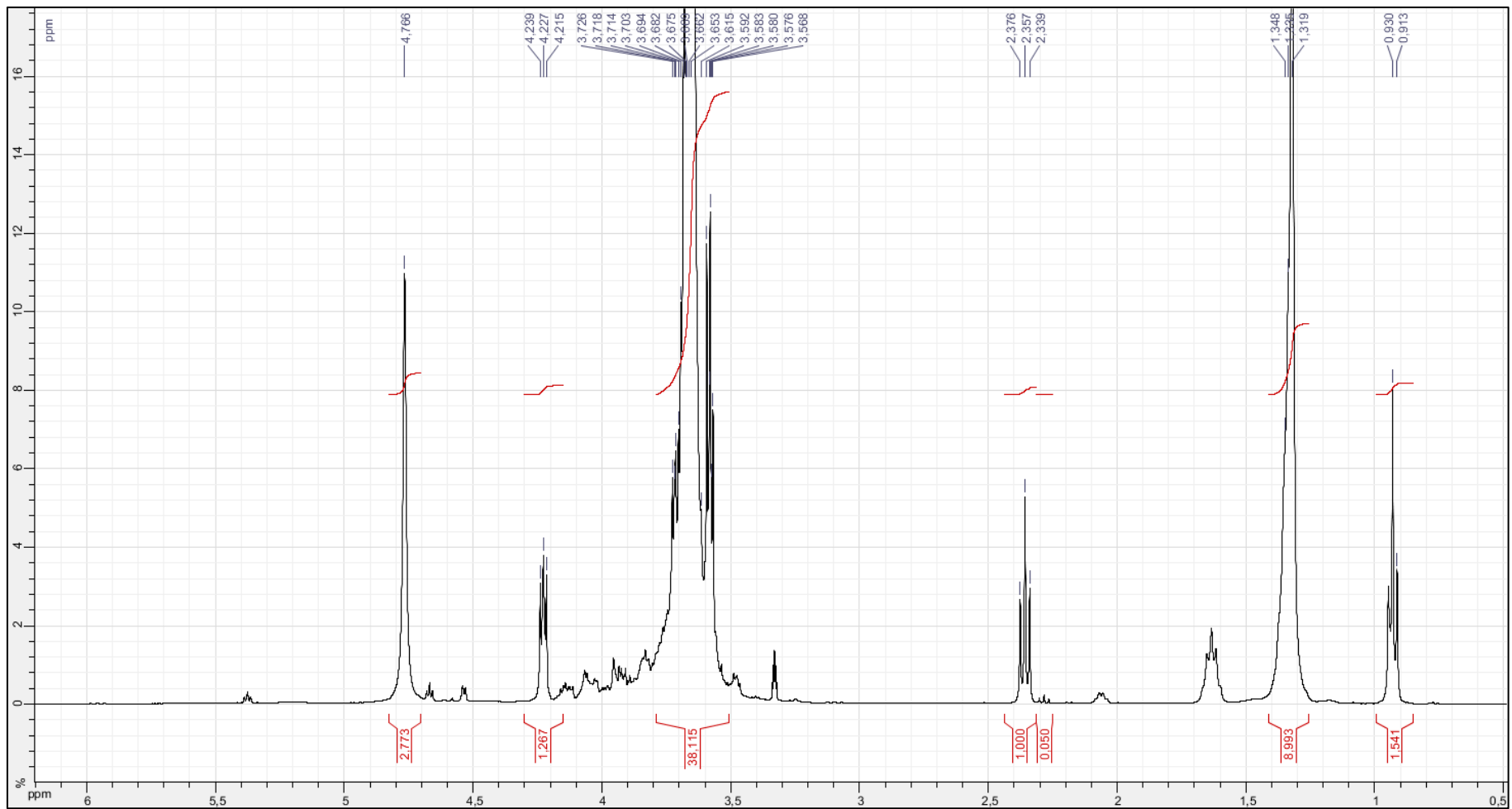
Na sliki 37 (vzorec 1), sliki 38 (vzorec 2), sliki 39 (vzorec 3), sliki 40 (vzorec 4) in sliki 41 (vzorec 5) so prikazani celotni NMR-spektri za vzorce polisorbatov 20 s pretečenim rokom uporabnosti, na sliki 42 (vzorec 6) in sliki 43 (vzorec 7) pa sta prikazana celotna NMR-spektra za vzorca polisorbatov 80 s pretečenim rokom uporabnosti.



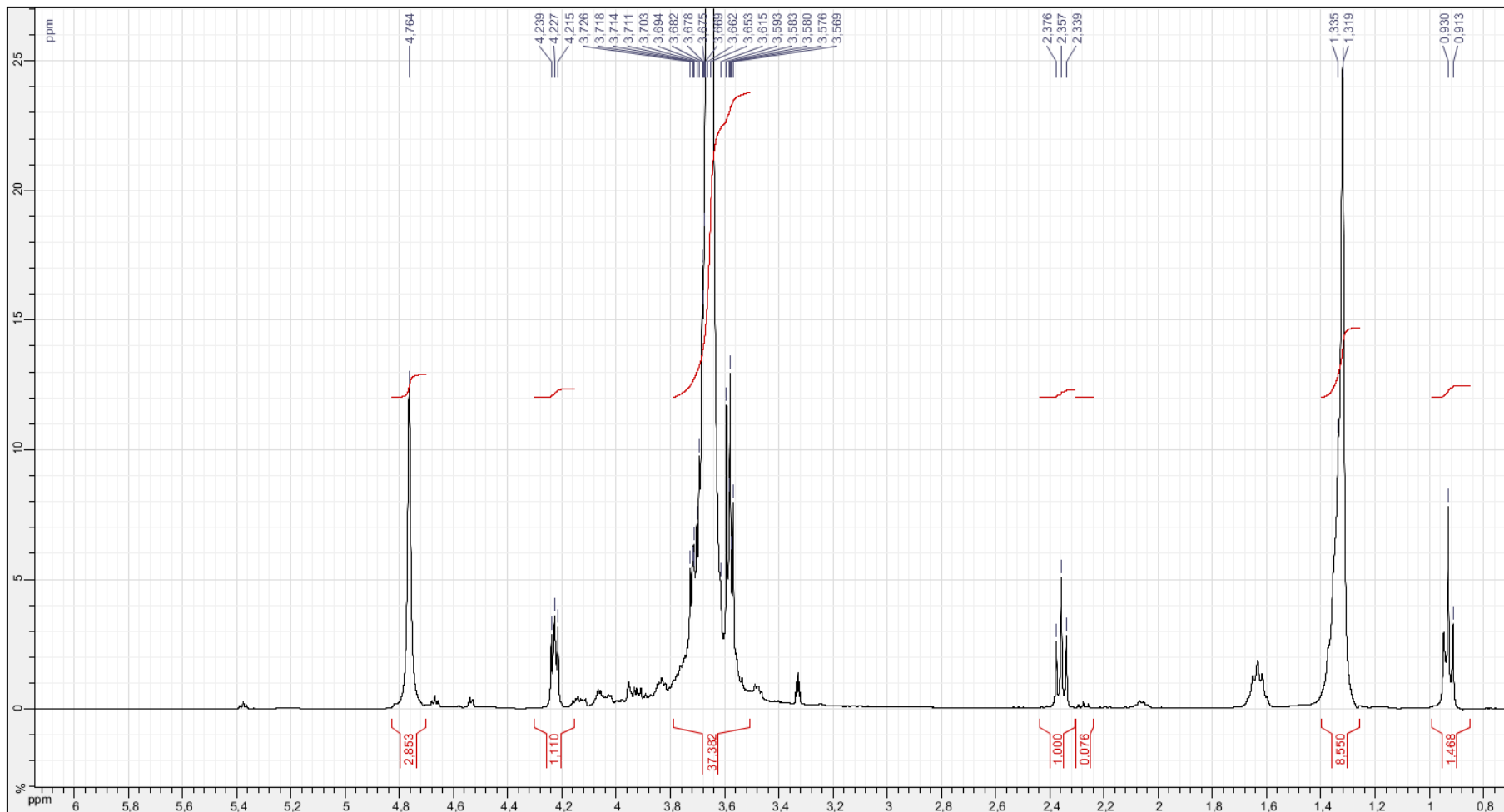
Slika 37: Celotni NMR-spekter vzorca 1.



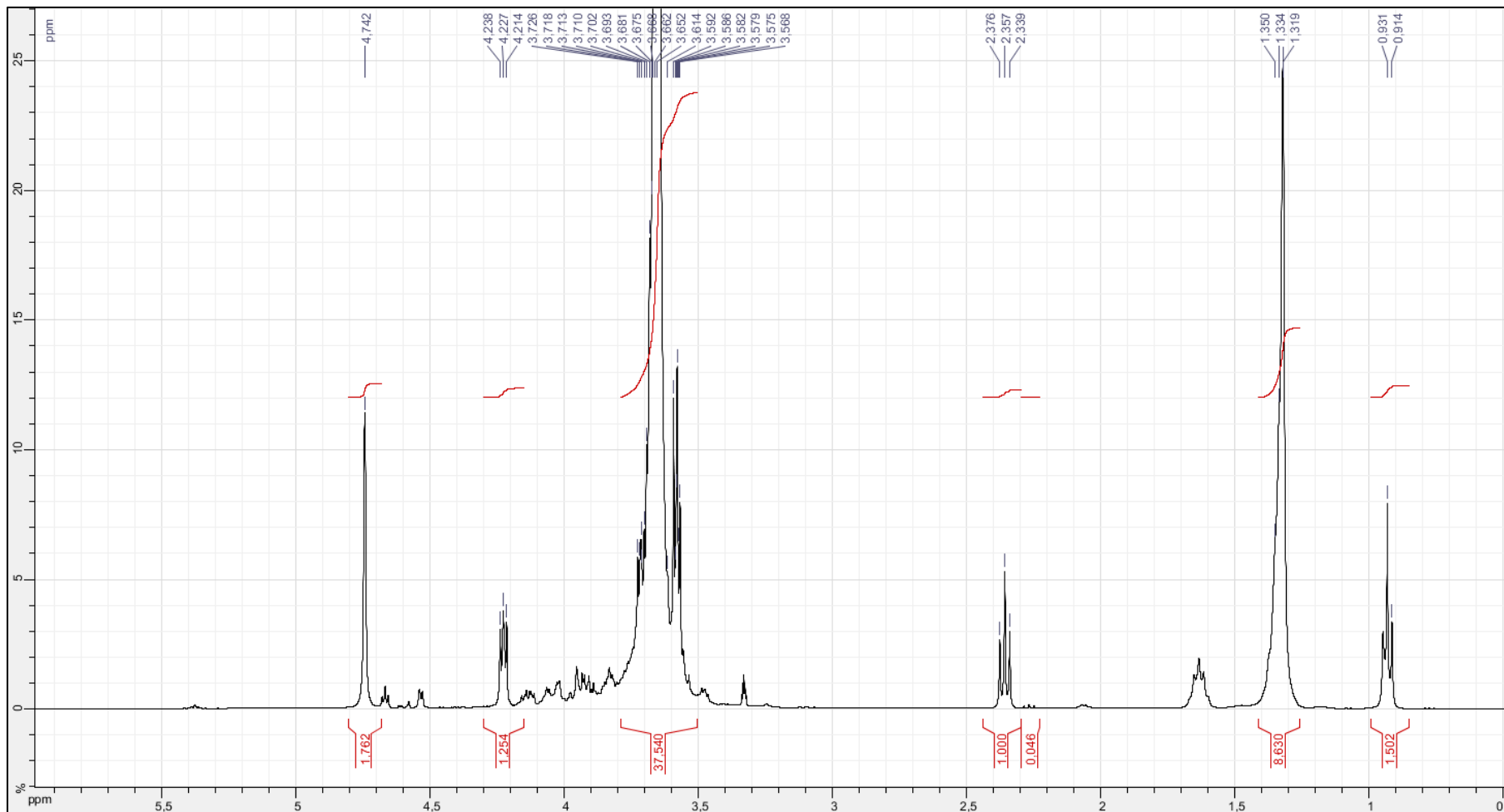
Slika 38: Celotni NMR-spekter vzorca 2.



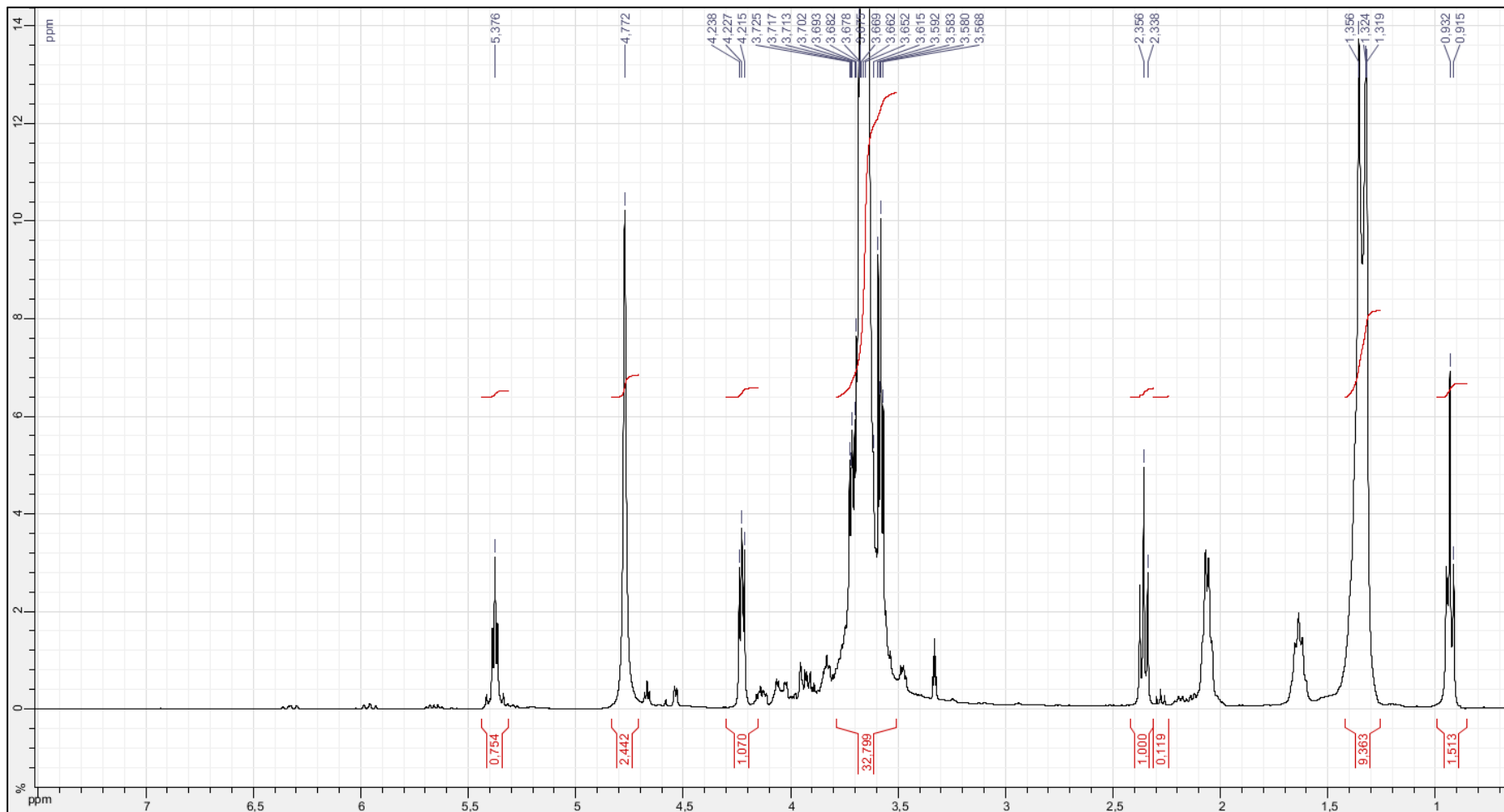
Slika 39: Celotni NMR-spekter vzorca 3.



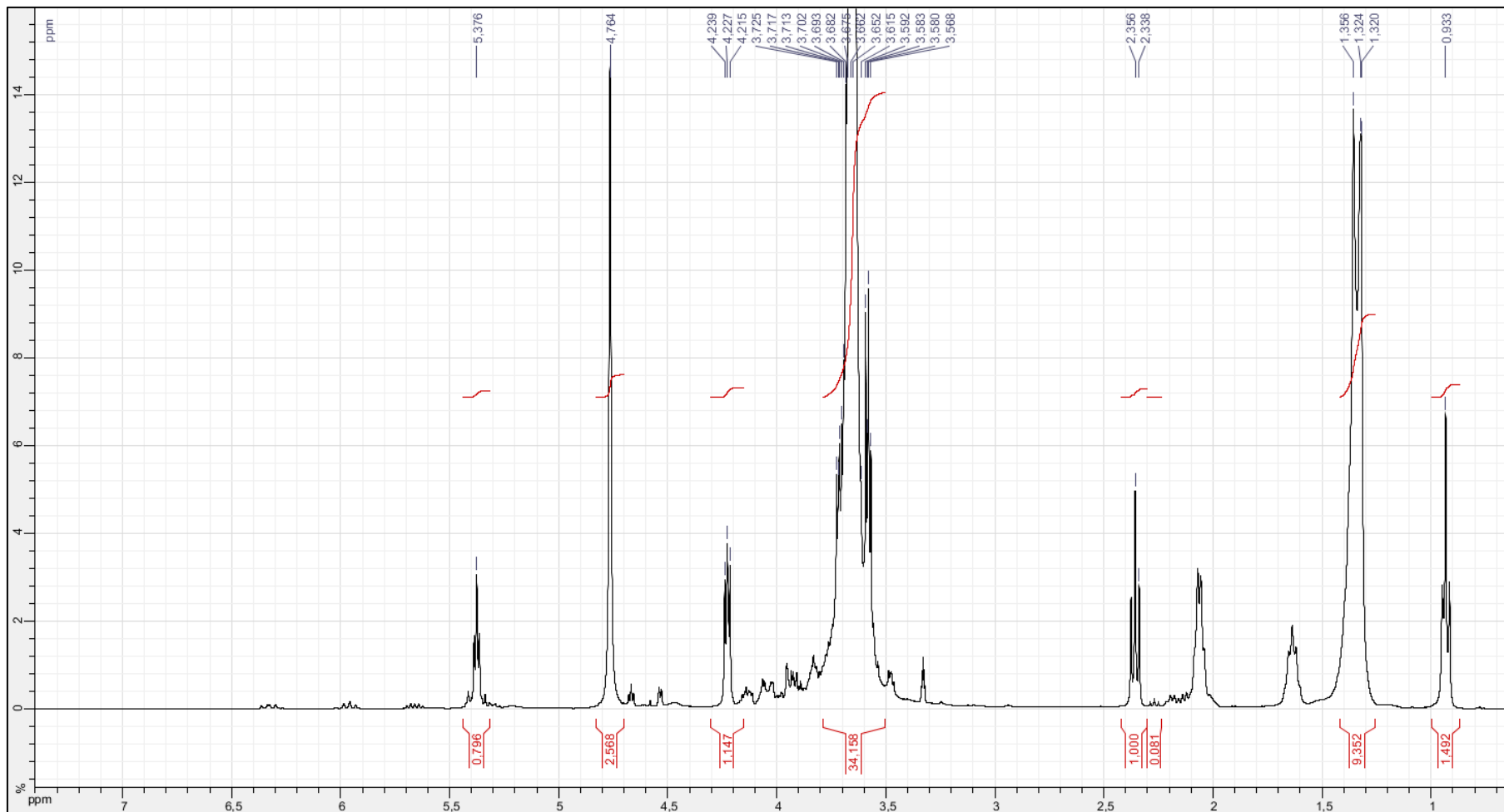
Slika 40: Celotni NMR-spekter vzorca 4.



Slika 41: Celotni NMR-spekter vzorca 5.



Slika 42: Celotni NMR-spekter vzorca 6.



Slika 43: Celotni NMR-spekter vzorca 7.

7.3 Standardizacija 1 M raztopine NaOH po predpisu iz USP 32

Preglednica XII: Natehtane mase $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ ($m_{\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4}$), volumni porabe 1 M raztopine NaOH (V_{NaOH}), izračunane točne koncentracije 1 M raztopine NaOH (c) in izračunana povprečna koncentracija 1 M raztopine NaOH (\bar{M}).

Št. ponovitve	$m_{\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4}$ [g]	V_{NaOH} [mL]	c [M]	\bar{M} [M]
1	5,0041	23,60	1,038	1,039
2	5,0022	23,55	1,040	
3	5,0077	23,60	1,039	

7.4 Določanje kislinskega števila vzorcem PS po predpisu iz Ph.Eur 8.0

7.4.1 Vzorci PS 20

Preglednica XIII: Natehtane mase vzorcev PS 20 z dodatki LA (m_v), volumni porabe 0,1 M raztopine NaOH (V_{NaOH}), izračunana kislinska števila (I_A) in izračunana povprečja kislinskih števil z RSD (\bar{I}_A).

Vzorec	Št. ponovitve	m_v [g]	V_{NaOH} [mL]	I_A	$\bar{I}_A \pm \text{RSD}$
PS 20 + 0 % LA	1	5,0172	0,69	0,802	$0,798 \pm 0,33 \%$
	2	5,0074	0,68	0,792	
	3	5,0180	0,69	0,801	
PS 20 + 1 % LA	1	5,0254	3,12	3,619	$3,614 \pm 0,77 \%$
	2	5,0040	3,09	3,599	
	3	5,0332	3,13	3,625	
PS 20 + 2 % LA	1	4,9986	5,55	6,472	$6,482 \pm 0,51 \%$
	2	5,0130	5,58	6,488	
	3	5,0057	5,57	6,486	
PS 20 + 3 % LA	1	5,0046	7,95	9,259	$9,238 \pm 1,89 \%$
	2	5,0006	7,94	9,255	
	3	5,0112	7,91	9,201	
PS 20 + 4 % LA	1	5,0031	10,28	11,977	$11,979 \pm 0,11 \%$
	2	5,0115	10,30	11,980	
	3	5,0114	10,30	11,980	
PS 20 + 5 % LA	1	5,0028	12,61	14,692	$14,696 \pm 0,35 \%$
	2	5,0143	12,64	14,693	
	3	4,9990	12,61	14,703	

7.4.2 Vzorci PS 80

Preglednica XIV: Natehtane mase vzorcev PS 80 z dodatki OA (mv), volumni porabe 0,1 M raztopine NaOH (V_{NaOH}), izračunana kislinska števila (I_A) in izračunana povprečja kislinskih števil z RSD (\bar{I}_A).

Vzorec	Št. ponovitve	mv [g]	V_{NaOH} [mL]	I_A	$\bar{I}_A \pm \text{RSD}$
PS 80 + 0 % OA	1	5,0159	1,30	1,511	1,505 ± 0,63 %
	2	5,0002	1,28	1,492	
	3	5,0144	1,30	1,511	
PS 80 + 1 % OA	1	5,0212	2,68	3,111	3,112 ± 1,77 %
	2	5,0130	2,65	3,081	
	3	4,5259	2,44	3,142	
PS 80 + 2 % OA	1	5,0071	4,61	5,367	5,384 ± 0,94 %
	2	5,0086	4,63	5,388	
	3	4,8586	4,50	5,399	
PS 80 + 3 % OA	1	4,9971	6,44	7,512	7,522 ± 0,54 %
	2	5,0191	6,48	7,525	
	3	5,0084	6,47	7,530	
PS 80 + 4 % OA	1	5,0138	8,09	9,405	9,428 ± 1,43 %
	2	5,0062	8,12	9,454	
	3	4,9977	8,08	9,424	
PS 80 + 5 % OA	1	5,0122	9,81	11,408	11,413 ± 0,35 %
	2	5,0274	9,85	11,420	
	3	5,0054	9,80	11,412	

7.4.3 Vzorci PS s pretečenim rokom uporabnosti

Preglednica XV: Natehtane mase vzorcev PS s pretečenim rokom uporabnosti (m_V), volumni porabe 0,1 M raztopine NaOH (V_{NaOH}), izračunana kislinska števila (I_A) in izračunana povprečja kislinskih števil z RSD (\bar{I}_A).

Vzorec	Št. ponovitve	m_V [g]	V_{NaOH} [mL]	I_A	$\bar{I}_A \pm \text{RSD}$
1	1	5,0077	1,96	2,281	$2,272 \pm 0,57 \%$
	2	4,9999	1,94	2,262	
	3	5,0024	1,95	2,272	
2	1	5,0092	1,51	1,757	$1,759 \pm 1,34 \%$
	2	5,0006	1,49	1,737	
	3	4,5436	1,39	1,783	
3	1	5,0005	1,48	1,725	$1,717 \pm 0,83 \%$
	2	5,0056	1,46	1,700	
	3	5,0022	1,48	1,725	
4	1	5,0122	1,54	1,791	$1,757 \pm 1,95 \%$
	2	5,0078	1,51	1,758	
	3	5,0061	1,48	1,723	
5	1	5,0104	1,08	1,256	$1,245 \pm 0,64 \%$
	2	5,0050	1,06	1,234	
	3	5,0142	1,07	1,244	
6	1	5,0002	2,26	2,635	$2,656 \pm 1,19 \%$
	2	5,0103	2,30	2,676	
	3	5,0022	2,28	2,657	
7	1	5,0044	1,28	1,491	$1,474 \pm 0,85 \%$
	2	5,0104	1,26	1,466	
	3	5,0132	1,26	1,465	