

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DEJAN KOTNIK

MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



Dejan Kotnik

**MULTIVARIATNO DOLOČANJE KRITIČNIH FIZIKALNIH
LASTNOSTI SESTAVIN PELET Z VPLIVI NA SPROŠČANJE
MODELNE ZDRAVILNE UČINKOVINE**

**MULTIVARIATE DETERMINATION OF CRITICAL PHYSICAL
PROPERTIES OF PELLETS' COMPONENTS INFLUENCING
DISSOLUTION RATE OF A MODEL ACTIVE INGREDIENT**

MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljal na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Biljane Janković, mag. farm. Eksperimentalne meritve sem izvajal na fakulteti, v laboratoriju Katedre za farmacevtsko tehnologijo.

ZAHVALA

Zahvalil bi se doc. dr. Biljani Janković, mag. farm. za odlično mentorstvo, za vso strokovno pomoč in praktične nasvete potrebne za izdelavo magistrske naloge. Za sodelovanje in pomoč v ključnih trenutkih nastajanja naloge bi se zahvalil tudi Sari Vidovič, mag. farm.

Iskrena zahvala gre prav tako moji puncu in prijateljem. Vsekakor pa ne smem pozabiti na svoja starša, ki sta me na celotni študijski, kot tudi življenjski poti vedno spodbujala in motivirala. Brez njune podpore in verjetja vame bi težko prišel do zaključne točke študija.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom doc. dr. Biljane Janković, mag. farm.

Dejan Kotnik

Predsednik komisije: prof. dr. Marija Sollner Dolenc, mag. farm.

Mentor: doc. dr. Biljana Janković, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Marko Jukič, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	i
ABSTRACT	iii
SEZNAM OKRAJŠAV	v
1. UVOD	1
1.1. VEČENOTNI DOSTAVNI SISTEMI.....	1
1.1.1. PELETE.....	1
1.1.2. PROCES IZDELAVE PELET	2
1.1.2.1. Iztiskanje in krogličenje	3
1.2. UPORABA POMOŽNIH SNOVI V PROIZVODNJI PELET	4
1.2.1. MIKROKRISTALNA CELULOZA	5
1.2.1.1. Interakcija MCC z vodo	5
1.2.2. ALTERNATIVNE POMOŽNE SNOVI ZA PELETIRANJE.....	6
1.2.3. KARAGENANI	7
1.2.3.1. Mehanizem geliranja	7
1.3. ODBELAVA PODATKOV	9
1.3.1. MULTIVARIATNA ANALIZA PODATKOV	9
1.3.1.1. Metoda glavnih komponent.....	10
1.3.1.2. Multipla linearna regresija	12
1.3.1.3. Regresija delnih najmanjših kvadratov	13
1.3.2. NADGRADNJA MVDA.....	13
1.3.3. VALIDACIJA MODELOV	14
1.3.4. UPORABNOST MVDA	15
2. NAMEN DELA.....	16
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1. MATERIALI	17
3.1.1. POMOŽNE SNOVI ZA IZDELAVO PELET	17
3.1.2. MODELNA UČINKOVINA.....	18
3.1.3. TEKOČI MEDIJ	18
3.1.4. LABORATORIJSKA OPREMA IN NAPRAVE	18
3.1.5. PROGRAMSKA OPREMA.....	19
3.2. METODE.....	20
3.2.1. DOLOČANJE MOČLJIVOSTI	20
3.2.1.1. Sposobnost močenja.....	20
3.2.1.2. Stični kot	20

3.2.2.	METODA SEDEČE KAPLJICE	21
3.2.2.1.	Priprava vzorcev	21
3.2.2.2.	Statično merjenje stičnega kota.....	23
3.2.3.	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV Z MVDA.....	26
4.	REZULTATI IN RAZPRAVA	27
4.1.	Vpliv procesnih parametrov na hitrost sproščanja ZU iz pelet.....	30
4.2.	Vpliv formulacijskih parametrov na hitrost sproščanja ZU iz pelet.....	32
4.3.	Kakovost modela	34
4.4.	Uporaba MVDA modela v okolju QbD.....	35
5.	SKLEP.....	38
6.	LITERATURA.....	39
	Priloga I: Rezultati naklonov za κ -karagenan (disolucijski medij).....	46
	Priloga II: Rezultati naklonov za MCC (disolucijski medij)	47
	Priloga III: Rezultati naklonov za modelno ZU (disolucijski medij)	48

KAZALO SLIK

Slika 1: Sferonizator ali naprava za krogličenje (levo) ter aksialni – 1 in radialni – 2 tip iztiskanja (desno) (10).	4
Slika 2: Struktura celuloze – α -celobiozne podenote (grajene iz dveh α -glukoz) (A) povezane v večje enote (B) ali mikrovlakna s kristaliničnimi in amorfnimi regijami (C), ki skupaj tvorijo vlakna celuloze (D) (14).	5
Slika 3: Reverzibilnost geliranja – (a) ponavljajoča enota κ -karagenana (polisaharid); (b) tvorba in razgradnja dvojnih vijačnic; (c) domena dvojnih vijačnic z ioni kalija (25).	8
Slika 4: (a) Grafična predstavitev določitev prvih dveh glavnih komponent (PC1 in PC2) v K-dimenzionalnem koordinatnem sistemu (K=3), prazne točke predstavljajo objekte originalnih podatkov, polne pa njihove projekcije na ravnino komponent (črtkane črte); (b) Točkovni diagram (36).	11
Slika 5: Primer težnostnega diagrama s petimi spremenljivkami (spr.) (37).	11
Slika 6: Princip PLSR metode; PCA se izvede na obeh, odvisnih (x) in neodvisnih (y) spremenljivkah (X in Y prostor); prekinjena premica v projekcijskem grafu t-u ponazarja linearno korelacijo med X in Y (36).	13
Slika 7: Metoda SIMCA (36).	14
Slika 8: Shematski prikaz primera 5-kratne navzkrižne validacije; številka nad stolpcem podatkov predstavlja posamezno validacijo, kjer sivo obarvan segment vzorcev uporabimo za testiranje modela ustvarjenega iz preostalih neobarvanih segmentov (33).	15
Slika 9: Vzorec MCC Ph 101.	17
Slika 10: Vzorec κ -karagenana.	17
Slika 11: Shematski prikaz različnih stopenj močenja (46).	20
Slika 12: Sile površinskih oz. medfaznih napetosti, v skladu z Youngovo enačbo, ki delujejo na kapljico tekočine po nanosu na trdno površino (48).	21
Slika 13: Hidravlična stiskalnica (levo) in kovinska matrica s pečatoma ter spodnjim nastavkom (desno).	22
Slika 14: Primeri izdelanih ploščic.	22
Slika 15: Merilnik stičnega kota DSA 100 (Krüss, Nemčija).	23
Slika 16: Komponente aparature DSA 100 z analiziranim vzorcem.	23
Slika 17: Primer obdelave videa pri določanju stičnega kota.	24

Slika 18: Primeri izrisanih grafov stičnega kota v odvisnosti od časa v programu Origin pro za a) κ -karagenan, b) MCC in c) modelno ZU za uporabljen disolucijski medij.....	25
Slika 19: Preučevane fizikalno-kemijske lastnosti sestavin izdelka.....	26
Slika 20: Opazovani procesni parametri za vsak posamezni korak priprave pelet.	27
Slika 21: Diagram povzetka končnega MVDA modela ustvarjenega z metodo PLS.	28
Slika 22: Koeficienti vpliva posameznih procesnih in formulacijskih parametrov s statistično značilnih vplivom na obravnavan odziv (hitrost sproščanja ZU v 45. minuti)..	29
Slika 23: Vpliv absorbirane vode na povečanje prostornine med verigami polimera (57).	33
Slika 24: Graf opazovanega v odvisnosti od napovedanega odziva Y za hitrost sproščanja ZU v 45. minuti.	34
Slika 25: Graf opazovanega v odvisnosti od napovedanega odziva Y za hitrost sproščanja ZU v 45. minuti z barvno oznako serij glede na viskoznost κ -karagenana.	35
Slika 26: Prikaz kritičnih procesnih parametrov (CPP), ki smo jih določili z MVDA modelom (označeni rdeče).	36
Slika 27: Prikaz kritičnih lastnosti sestavin (CMA), ki smo jih določili z MVDA modelom (označeni rdeče).....	36

POVZETEK

Večenočni dostavni sistemi so v današnjem času vse pogostejša tematika raziskav razvojne in proizvodne farmacevtske tehnologije. Primer takšnih sistemov so pelete, ki s svojo majhnostjo in strukturno samostojnostjo delcev nudijo mnoge prednosti. Obstaja več tehnoloških postopkov za pripravo pelet. Pelete, ki smo jih obravnavali v našem delu izdelujemo s tehnologijo iztiskanja in krogličanja, večstopenjskim procesom, katerega kvaliteta produkta je odvisna od številnih procesnih in formulacijskih parametrov.

Glavni cilj magistrske naloge je bila uporaba multivariatne metode kot statističnega orodja za doprinos k optimizaciji že uveljavljenega, komercialnega postopka izdelave pelet. V ta namen smo z metodo sedeče kapljice določili fizikalen parameter hitrosti pronicanja tekočega medija v trdno snov modelne zdravilne učinkovine, mikrokristalne celuloze in κ -karagenana, ki pod različnimi kontrolnimi številkami vstopajo v formulacijo pelet s takojšnjim sproščanjem. Eksperimentalne vrednosti smo skupaj s podatki predhodnih raziskav proizvodnih serij pelet, uporabili za izgradnjo multivariatnega modela, ki nam je omogočil prepoznavo procesnih in formulacijskih parametrov s potencialnim vplivom na hitrost sproščanja modelne zdravilne učinkovine iz pelet.

Multivariatno obdelavo podatkov smo izvedli z regresijsko metodo delnih najmanjših kvadratov (PLSR – ang. partial least squares regression), kjer smo za matriko X neodvisnih spremenljivk izbrali vrednosti vseh 117 preučevanih procesnih in formulacijskih parametrov, hitrost sproščanja zdravilne učinkovine v 45. minuti pa je predstavljala naš opazovan odziv Y (odvisna spremenljivka). Iz rezultatov končnega modela, ki smo ga razvili z računalniškim programom SIMCA P+ 14.0, je bilo razvidno, da na hitrost sproščanja zdravilne učinkovine vpliva 5 procesnih in 4 formulacijski parametri. Njihov pozitiven oz. negativen vpliv na odziv smo interpretirali s pomočjo teoretičnih razlag iz strokovne literature. Vrednosti prileganja (R^2) in napovedne sposobnosti (Q^2) sta nakazovali na model zmerne napovedljivosti. Dodatne preiskave fizikalno-kemijskih lastnosti vhodnih surovin ter parametrov procesa izdelave bi lahko kakovost modela izboljšale.

V sklopu sodobnega pristopa proizvodnje farmacevtskih izdelkov z vgrajeno kakovostjo (QbD – ang. Quality by Design) smo parametre iz rezultatov našega modela definirali kot kritične procesne parametre (CPP – ang. Critical Process Parameters) ter kritične lastnosti surovin (CMA – ang. Critical Material Attributes), ki potencialno vplivajo na kritično

lastnost kakovosti produkta (CQA. – ang. Critical Quality Attributes), tj. sproščanje zdravilne učinkovine iz pelet.

Ključne besede: pelete, iztiskanje in krogličenje, multivariatna analiza podatkov

ABSTRACT

Multiple unit drug delivery systems are nowadays a very common research topic in pharmaceutical drug development and production technology. An example of such are pellets that offer many advantages with their small size and structural independence. There are many technological methods for preparing pellets. Pellets, which are discussed in our study, are manufactured by extrusion and spheronization, a multistage process whose product quality depends on a number of process and formulation parameters.

The main goal of the diploma was the application of multivariate method as a statistical tool in Quality by Design (QbD) environment for determination of potential critical material and process parameters in commercial pellet production. For this purpose, a sessile drop method was used to determine the physical parameter of penetration rate of liquid medium into the solid substance of a model active ingredient, microcrystalline cellulose and κ -carrageenan that were entering under different batch numbers in the final dosage form, e.g. immediate release pellets. Experimental values were combined with the data from previous research in order to upgrade a multivariate model. This enabled us to identify potential critical process and formulation parameters with the impact on the pellets' dissolution rate of a model active ingredient.

Multivariate data analysis was performed using a partial least squares regression method (PLSR), where all 117 studied process and formulation parameters were included in the X matrix of independent variables. Dissolution rate of the model active ingredient in 45th minute was our observed response Y (dependent variable). Results from the final model, developed by SIMCA P+ 14.0 computer program, showed that dissolution rate is influenced by 5 process and 4 formulation parameters. Their positive or negative impact on the response was interpreted with the help of theoretical explanations found in literature. Fitting (R²) and predictive ability (Q²) values indicated a model with a moderate quality. Further research on physicochemical properties of input materials and production process parameters could improve the quality of the model.

As part of the QbD approach, the parameters identified from our model have been defined as Critical Process Parameters (CPP) and Critical Material Attributes (CMA) with a potential influence on Critical Quality Attributes (CQA), i.e. dissolution rate of pellets' active ingredient.

Keywords: pellets, extrusion and spheronization, multivariate data analysis

SEZNAM OKRAJŠAV

CMA	kritične lastnosti vhodnih surovin (ang. Critical Material Attributes)
CPP	kritični procesni parametri (ang. Critical Process Parameters)
CQA	kritične lastnosti kakovosti končnega izdelka/produkta (ang. Critical Quality Attributes)
EDA	Preiskovalna analiza podatkov (ang. Exploratory Data Analysis)
FO	farmacevtska oblika
MCC	mikrokristalna celuloza
MLR	multipla linearna regresija (ang. Multiple Linear Regression)
MVDA	multivariatna analiza podatkov (ang. Multivariate Data Analysis)
PC	glavna komponenta
PCA	analiza glavnih komponent (ang. Principal Component Analysis)
PLSR	regresija delnih najmanjših kvadratov (ang. Partial Least Squares Regression)
QbD	razvoj in izdelava izdelkov z vgrajeno kakovostjo (ang. Quality by design)
ZU	zdravilna učinkovina
κ -karagenan	kapa karagenan

1. UVOD

1.1. VEČENOTNI DOSTAVNI SISTEMI

Večnotne farmacevtske oblike (FO) so oblike, sestavljene iz številnih majhnih, med seboj ločenih enot ali delcev, ki jim pripisujemo določene samostojne lastnosti. So dostavni sistemi, v večini namenjeni (per)oralni aplikaciji, kjer je odmerek učinkovine porazdeljen na majhne, samostojne podenote. Te so združene, bodisi s polnjenjem večih enot v kapsule ali stiskanjem v tablete, z namenom dostave učinkovine v željenem terapevtskem odmerku (1, 2).

1.1.1. PELETE

V farmacevtskem pomenu besede definiramo pelete kot majhne, prosto gibljive, okrogle ali skoraj okrogle delce, nastale z aglomeracijo začetnih sestavin prahov ali granulativ učinkovine ter pomožnih snovi. Premer oz. velikost pelet znaša med 0,5 do 2,0 mm (3, 4). Pelete idealnih fizikalnih in morfoloških lastnosti opisujemo kot aglomerate z enotno okroglo (sferično) obliko, gladko površino, dobro pretočnostjo, ozko porazdelitvijo velikosti, visoko trdnostjo in nizko krušljivostjo. Učinkovina v peleti je lahko enakomerno porazdeljena po njeni celotni prostornini (ogrodne pelete) ali pa je v oblogi, ki obdaja peletno jedro (obložene pelete). Pelete kot same ne predstavljajo končne FO, temveč vmesni produkt, ki ga v nadaljnjih tehnoloških postopkih polnimo v kapsule, stiskamo v tablete ali suspendiramo v suspenzijo (5).

Prvi pojav pelet v svetu farmacije označujemo leta 1950, z razvojem in predstavitvijo prvega izdelka na trg zasnovanega na formulaciji pelet polnjenih v kapsule. Želja farmacevtske industrije po večji terapevtski učinkovitosti zdravil ob minimalnem pojavu neželenih učinkov je privedla do razmaha pelet na koncu 1970-ih let, vse do danes (5, 6). Prednosti pelet se izkazujejo na tehnološkem procesu izdelave, formulaciji ter terapevtskem področju (6):

- a) Procesne prednosti: kot okrogli delci z majhno poroznostjo, gladko površino ter visokim razmerjem površina : volumen, so ustrezni za proces enakomernega oblaganja s polimeri.

- b) Formulacijske prednosti: oblaganje pelet s funkcionalno oblogo omogoča večjo fleksibilnost pri načrtovanju in razvoju formulacij z nadzorovanim sproščanjem učinkovine. Prav tako lahko celotno količino pelet, ki se bodo polnile v kapsule ali stiskale v tablete, ustrezno porazdelimo glede na željen odmerek, brez večjega posega v spremembe samega procesa ali formulacije.
- c) Terapevtske prednosti: ob peroralni aplikaciji pelete zaradi svoje majhnosti hitro prehajajo želodec (tudi ob zaprtem stanju pilorusa) in se prosto gibljejo po celotnem gastrointestinalnem traktu, kar poveča absorpcijo učinkovine (višja biološka uporabnost) ter zmanjša lokalno draženje sluznice prebavil. Manjša količina učinkovine na posamezno pelet zagotavlja precej nižje tveganje za nastanek t.i. »dose dumping« pojava ali neželenega sproščanja prevelike količine zdravilne učinkovine (ZU) v kratkem času, po zaužitju. Omenjene terapevtske prednosti bistveno prispevajo k izboljšanju **učinkovitosti** in **varnosti** zdravila.

Kljub mnogim prednostim pelet, se vendarle ne moremo izogniti nekaterim slabostim, kot so: omejenost doziranja s prostornino delcev ter časovna zahtevnost kompleksnega procesa izdelave (6).

1.1.2. PROCES IZDELAVE PELET

Tehnološki postopek izdelave pelet imenujemo **peletiranje**. Gre za proces adhezije majhnih praškastih delcev v večje skupke ali aglomerate do nastanka končnih pelet. Poznamo več vrst ali načinov priprave pelet (3):

- Iztiskanje in krogličenje (ekstruzija in sferonizacija)
- Peletiranje z rotorsko tehnologijo (direktno peletiranje)
- Oblaganje jeder z raztopinami/suspencijami ali suhimi prahovi
- Peletiranje s taljenjem
- Kriopeletiranje in drugi novejši pristopi

Pelete, ki jih obravnavamo v magistrski nalogi se izdelujejo s tehnologijo iztiskanja in krogličjenja.

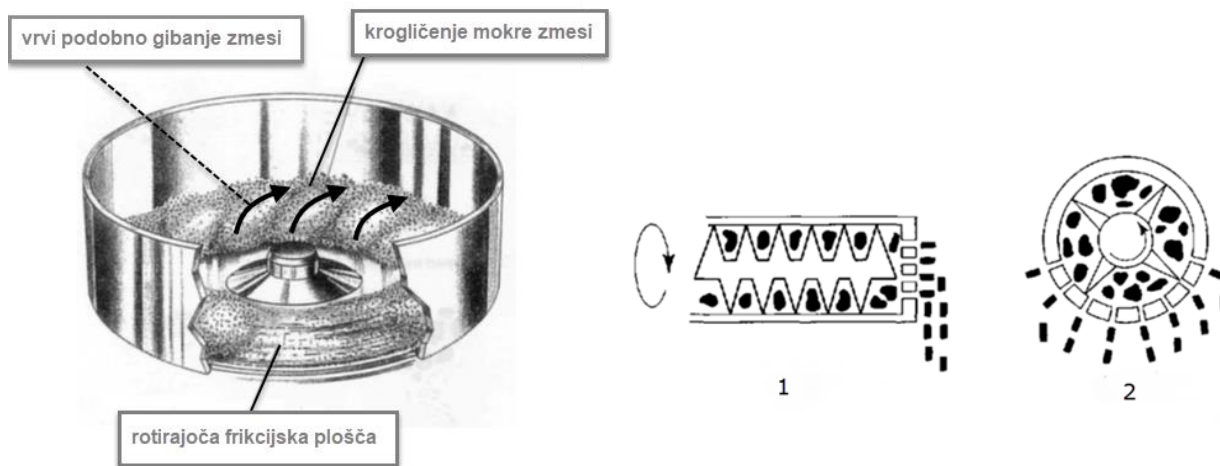
1.1.2.1. Iztiskanje in krogličenje

Metoda iztiskanja in krogličenja je ena izmed najpogosteje uporabljenih načinov proizvodnje pelet v farmacevtski industriji (7). Je večstopenjski proces z mnogimi operacijskimi enotami in komponentami opreme, med katerimi igrata ključno vlogo naprava za iztiskanje – **ekstrudor** in naprava za krogličenje – **sferonizator**. Potek samega postopka delimo na naslednje faze (8, 9):

- 1) Suho mešanje sestavin (učinkovine in pomožnih snovi) za doseg homogene praškaste zmesi
- 2) Mokro gnetenje zmesi ob dodatku veziva za nastanek plastične mase
- 3) Iztiskanje pripravljene mase ter tvorba paličastih delcev enakega premera
- 4) Krogličenje ali preoblikovanje iztisnjenih delcev v okroglo (sferično) obliko
- 5) Sušenje peletnih jeder
- 6) Sejanje (pogojno) za doseg ozke porazdelitve velikosti pelet
- 7) Oblaganje (pogojno)

Prednosti iztiskanja in krogličenja v primerjavi z drugimi tehnološkimi postopki vključujejo: načrtovanje formulacij z visoko vsebnostjo učinkovine, kombiniranje dveh ali več zdravilnih učinkovin v definiranem razmerju na posamezno enoto ter izdelavo FO s prirejenim sproščanjem. Največja pomanjkljivost pa je ravno večstopenjskost procesa izdelave, ki se pozna na časovni, ekonomski ter tehnični ravni (9).

Kvaliteta produkta oz. pelet je odvisna od številnih **formulacijskih in procesnih parametrov** med izvajanjem iztiskanja/krogličenja (*Preglednica 1*). Najbolj kritična procesna parametra, ki vplivata na izkoristek in kakovost krogličenja, sta hitrost vrtenja in hrapavost površine vrteče se plošče sferonizatorja (Slika 1) ter čas zadrževanja pelet v fazi krogličenja. Aksialni tip naprave za iztiskanje proizvaja navadno iztiskanec z rahlo višjo gostoto kot pri radialnem tipu iztiskanja (Slika 1), kjer je matrična/luknjičasta plošča nameščena radialno na smer stiskanja (krajša pot kompresije, vendar večji pretok iztisnjenega materiala) (8).



Slika 1: Sferonizator ali naprava za krogličenje (levo) ter aksialni – 1 in radialni – 2 tip iztiskanja (desno) (10).

Preglednica I: Nekateri pomembni formulacijski in procesni parametri, ki vplivajo na kakovost pelet (8).

FORMULACIJSKI parametri	PROCESNI parametri
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Količina in sestava granulacijske tekočine ▪ Količina in vrsta pomožnih snovi ▪ Količina in vrsta ZU 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hitrost iztiskanja ▪ Temperatura iztiskanja ▪ Obremenitev sferonizatorja ▪ Čas krogličnja ▪ Hitrost krogličnja ▪ Metoda sušenja

Kritičnega pomena na značilne lastnosti pelet (oblika, velikost, pretočnost, krušljivost, trdnost, poroznost) je vrsta vhodnih surovin, ki imajo kot formulacijski parameter pomembno vlogo pri obnašanju mokre zmesi med procesom iztiskanja in krogličnja.

1.2. UPORABA POMOŽNIH SNOVI V PROIZVODNJI PELET

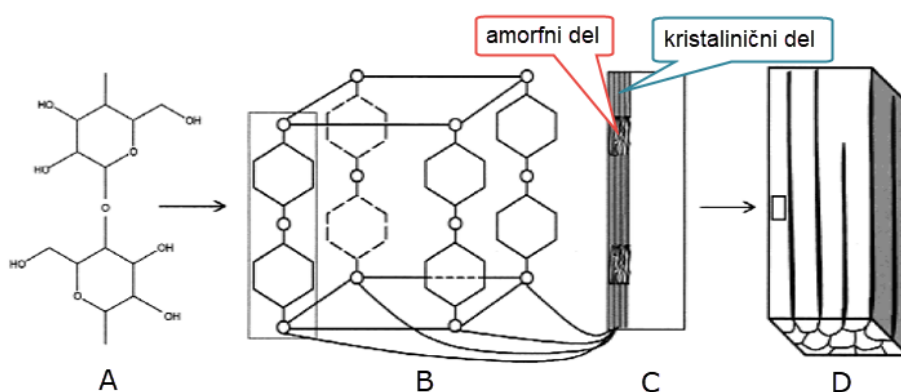
Poleg polnil, veziv, drsil, razgrajeval ter morebitnih modifikatorjev sproščanja učinkovine, ki jih vsebujejo pelete, je potreben dodatek snovi za pretvorbo mokre zmesi v enakomerno okrogle delce. (9) Peletirna zmes mora biti torej **plastična**, da se med iztiskanjem deformira, prelomi na enakomerne cilindrične skupke in enostavno preoblikuje v okrogle delce. Naštete

lastnosti zmesi dosežemo s pravilnim izborom pomožnih snovi ali t.i. snovi za izboljšanje peletiranja (ang. pelletization aids) (9, 10).

1.2.1. MIKROKRISTALNA CELULOZA

Najpogosteje uporabljena pomožna snov, ki jo še danes, kljub razvoju in odkritju alternativ, označujemo kot »zlati standard« iztiskanja in krogliččenja, je **mikrokristalna celuloza (MCC)** (11). Kemična inertnost, netoksičnost, visoka higroskopnost ter vsestranskost uporabe so temeljni razlogi zakaj najdemo MCC kot sestavino skoraj vsake farmacevtske formulacije in ne samo v peletah (12).

MCC je bel, v vodi netopen, kristaliničen prašek, ki ga pridobivamo z obdelavo celuloze v prečiščenih lesenih ali bombažnih materialih z uporabo mineralnih kislih raztopin (kislá hidroliza) in nadaljnjim sušenjem (odstranitev vodne komponente). Proizvodni proces skrajša polimerne verige, tako da je strukturno MCC delno depolimerizirana oblika celuloze, katere struktura je prikazana na spodnji Sliki 2.



Slika 2: Struktura celuloze – α -celobiozne podenote (grajene iz dveh α -glukoz) (A) povezane v večje enote (B), ki naprej gradijo mikrovlakna s kristaliničnimi in amorfnimi regijami (C) in skupaj tvorijo vlakna celuloze (D) (14).

1.2.1.1. Interakcija MCC z vodo

Vloga MCC med procesom iztiskanja-krogliččenja je dvojna: nadzira premik vode skozi mokro granulirno maso ter spreminja (modificira) reološke lastnosti ostalih sestavin za doseg nivoja plastičnosti, ki omogoča nemoteno iztiskanje oz. krogliččenje (8). Ta interakcija MCC s tekočo fazo formulacije predstavlja tako fizikalen kot kemijski fenomen, ki si ga lahko razlagamo s pomočjo mikroskopske strukture in teoretičnih modelov.

a) Mikroskopska struktura MCC

MCC, mikroskopsko gledano, sestavlja naključna agregacija mikrokristalnih filamentov z visoko poroznostjo in površino, od katere 90 do 95 % je notranja. Oboje prispeva k sposobnostma visoke absorpcije in zadrževanja vode MCC, ki pod vplivom peletiranja pogosto ostajata neokrnjeni (8, 15).

b) Teoretični modeli interakcij

Obnašanje MCC v stiku z vodo med potekom iztiskanja in krogličanja lahko opišemo tudi s pomočjo enega izmed dveh teoretičnih modelov:

Prvi model opisuje delce MCC kot porozne spužve s sposobnostjo »vpija« velike količine vode. Pod povišanim tlakom iztiskanja se zadržana voda iz t.i. molekularnih spužev delno iztisne in kasneje, ob sprostitvi tlaka, ponovno privzame ali pa služi kot drsilo za ostale delce. Po končanem procesu izdelave pelet, bi naj osnovni delci MCC ostali nespremenjeni, bili enakih oblik, velikosti in volumna ter ostali nepoškodovani v primerjavi z začetnim praškom (14, 16, 17).

V nasprotju s prvim, **drugi model** trdi, da delci MCC tekom procesa izgubijo svojo osnovno strukturo, se deformirajo in razčlenijo na manjše enote ter sčasoma na samostojne kristale koloidnih velikosti. Ti skupaj tvorijo koherentno mrežo, sposobno imobilizacije vode in nastanek gelu podobne substance (14, 16, 18).

Argumentov kateri model naj bi pravilno oz. najbolje opisal obnašanje MCC v stiku z vodo med proizvodnjo pelet je precej, na strani enega kot drugega modela. (17, 18). Iz teh je bilo razvidno, da so različni rezultati favoriziranja enega modela nad drugim najverjetneje odraz različno uporabljenih metod in predpostavk pri izvedbi raziskav.

1.2.2. ALTERNATIVNE POMOŽNE SNOVI ZA PELETIRANJE

Čeprav je MCC najpogosteje izbrana pomožna snov, še zdaleč ne izkazuje popolnosti univerzalne uporabe v proizvodnji farmacevtskih izdelkov. Poročani neželeni pojavi, kot so adsorbiranje učinkovine na vlakna MCC, kemična nekompatibilnost s specifičnimi zdravilnimi učinkovinami ter neželena podaljšano sproščanje ZU zaradi slabih razgrajevalnih lastnosti MCC, so razlogi iskanja novih pomožnih snovi. Te bi bile sposobne izboljšati omenjene pomanjkljivosti MCC ali jo celo popolnoma nadomestiti (9, 16). Pod drobnogled raziskav so bili vzeti različni predstavniki naravnih in (pol)sintetičnih

polimerov, kot so škrob, hidroksipropilmetil celuloza (HPMC), celuloza v prahu, hitosan in pektinska kislina, med katerimi se je κ -karagenan kot predstavnik naravnih polisaharidov izkazal za zelo obetaven nadomestek (16).

1.2.3. KARAGENANI

Karagenani so skupina anionskih biopolimerov, ki jih pridobivamo z vročo ekstrakcijo iz celičnih sten rdečih alg. S sušenjem prečiščenega ekstrakta dobimo suh, rumenkasto-bel prašek. Polimerno strukturo karagenanov sestavlja izmenjujoče zaporedje α -1,3 in β -1,4 povezanih galaktoznih in 3,6-anhidrogalaktoznih monomernih enot, ki se razlikujejo v prisotnosti ter poziciji sulfatne skupine. κ -karagenan ima galaktozno enoto sulfatirano na poziciji 4 (galaktoza-4-sulfat) (8, 19, 20,).

Uporaba κ -karagenana kot pomožne snovi pri izdelavi pelet z iztiskanjem in krogličanjem vodi do pelet zadovoljivih ter primerljivih kakovosti s peletami, ki vsebujejo MCC. Kljub manjši natezni trdnosti pelet in večji porabi vode pri pripravi mokre zmesi, izkazuje κ -karagenan nekatere prednosti nad MCC (16, 20, 21). Omogoča pripravo pelet s hitro razpadnostjo in hitrim profilom sproščanja, neodvisno od topnosti učinkovine, kar nam pri dolgorazpadnih peletah iz MCC ne uspe, kljub dodatku razgrajeval (22). Stisljivost pelet je prav tako dobra in omogoča izdelavo tablet z minimalno krušljivostjo (23). Nekatera lastniška imena komercialno dostopnih κ -karagenanov so: Gelcarin[®], Satiagel[®] in Genugel[®] (24).

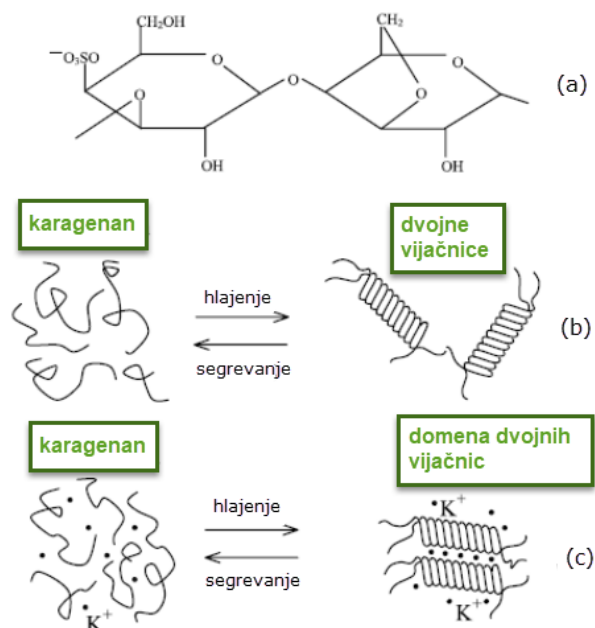
Razlaga opisanih prednosti κ -karagenana leži v njegovi gelski strukturi, ki jo tvori ob prisotnosti vode in kationov. Najpogosteje gre za gele s kalijevimi (K⁺) ioni (25).

1.2.3.1. Mehanizem geliranja

Splošno znano je, da so **polimerni geli** grajeni iz mreže ali polimernega ogrodja in molekul topila. Nastanek gela omogoča vgrajevanje molekul vode ali topila med polimerne verige, kar vpliva na hidratacijo določenih hidrofilnih skupin (npr. tvorba vodikovih vezi med vodo in polarnimi skupinami).

Fizikalne interakcije v gelu κ -karagenana (vodikove vezi, ionske interakcije, fizično prepletanje), omogočajo reverzibilnost geliranja oz. prehod iz raztopine v obliko gela ob hlajenju (ang. sol-gel transition) in obratno pri segrevanju (ang. gel-sol transition) (Slika 3). V faznem prehodu raztopina-gel (prehod sol-gel pri hlajenju) se molekule κ -karagenana

konformacijsko preoblikujejo v dvojne vijačnice, ki skupaj z ujetimi kationi tvorijo urejene domene (25).



Slika 3: Reverzibilnost geliranja – (a) ponavljajoča enota κ -karagenana (polisaharid); (b) tvorba in razgradnja dvojnih vijačnic; (c) domena dvojnih vijačnic z ioni kalija (25).

Preglednica II: Primerjava lastnosti gelov različnih vrst komercialno dostopnih karagenanov (26, 27)

Ime produkta	Vrsta karagenana	Viskoznost gela	Tip gela
Gelcarin® GP-379 NF	iota	visoka, tiksotropičen	elastičen, srednje močan
Gelcarin® GP-812 NF	kapa	nizka	močan, lomljiv
Gelcarin® GP-911 NF	kapa	nizka	močan (šibkejši od GP-812), lomljiv
Viscarin® GP-109NF	lambda	srednja	ne gelira
Viscarin® GP-209NF	lambda	visoka	ne gelira
SeaSpem® PF	iota	srednja	elastičen, šibak

1.3. ODBELAVA PODATKOV

Glavno vodilo vseh empiričnih znanosti (ne samo farmacevtske) je najti odgovore na zastavljena vprašanja oz. priti do rešitve nekega problema. Da pa lahko problem rešimo, potrebujemo **podatke** o preiskovanem **sistemu**, ki jih pridobimo ali izmerimo s pomočjo orodja in ustreznega postopka (eksperimentalno delo). Vendar izmerjeni podatki še ne predstavljajo **informacije** o rešitvi. Slednjo je treba izluščiti ter pravilno interpretirati, šele nato lahko predpostavimo rešitev v obliki **modela**, ki ga definiramo kot najboljši povzetek znanja nekega sistema v času raziskave. Z dobrim modelom si lahko dobro razlagamo pretekle, trenutne in tudi prihodnje dogodke (28).

Vsak nabor podatkov lahko predstavimo kot seznam kvantitativnih ali kvalitativnih vrednosti, ki pripadajo različnim spremenljivkam (29). Skokovit razvoj znanosti in tehnologije v zadnji četrtini prejšnjega stoletja je s seboj prinesel enormno število podatkov (približno 2,5 kvintilijonov bitov podatkov bi se naj generiralo dnevno), kar po eni strani olajša pridobivanje in beleženje večjega števila informacij, vendar po drugi strani, zaradi ogromne količine, »zamegli« oz. oteži identifikacijo podatkov, ki dejansko nosijo pomembno informacijo, brez nepotrebnih šumov (ang. noise) (30). Današnje poslovanje industrije osredotočeno k hitrim časovnim odzivom, profitabilnosti in zagotavljanju produktov ter storitev čim višje kakovosti, vse ob zmanjšanju števila stroškov, še dodatno pripomore k problemu učinkovite obdelave poplave podatkov, ki jih klasični, konvencionalni pristopi opazovanja, merjenja in analiziranja spremenljivk, eno po eno, ne zadoščajo ter časovno ne dohajajo (31).

V olajšanje omenjenih zapletov nam sodobna računalniška oprema omogoča procesiranje podatkov v precej večjem obsegu in bistveno krajšem času, kot dopuščajo človeške sposobnosti. Ena izmed danes nepogrešljivih in zelo uporabnih metod reševanja zapletenih statističnih problemov je **multivariatna analiza podatkov**, katere začetki praktične uporabe segajo v 70-ta leta prejšnjega stoletja (31, 32).

1.3.1. MULTIVARIATNA ANALIZA PODATKOV

Multivariatna analiza podatkov (ang. Multivariate data analysis - MVDA) je veja statističnih metod ali tehnik za preiskavo večjega števila spremenljivk hkrati (najmanj dveh, vse do milijonov), z namenom ugotavljanja in razumevanja morebitnih odnosov, ki obstajajo med njimi. Obenem se uporablja za zmanjšanje oz. redukcijo števila spremenljivk. MVDA je

statistično orodje z vizualnim in grafičnim pristopom, ki temelji na **matrični algebri** (28). Obstaja veliko različnih načinov in kombinacij izvedbe MVDA, katerih izbor je odvisen od vrste podatkov ter ciljev raziskave (28, 31, 33).

V širšem pomenu lahko MVDA razdelimo na tri glavna področja (28):

- Preiskovalna analiza podatkov (EDA – ang. Exploratory Data Analysis), imenovana tudi podatkovno rudarjenje (ang. Data Mining), ki se uporablja za globlji vpogled v strukturo večjih, kompleksnejših nizov podatkov;
- Regresijska analiza za predvidevanje proučevanih odzivov;
- Klasifikacijske metode za odkrivanje novih in obstoječih razredov podatkov.

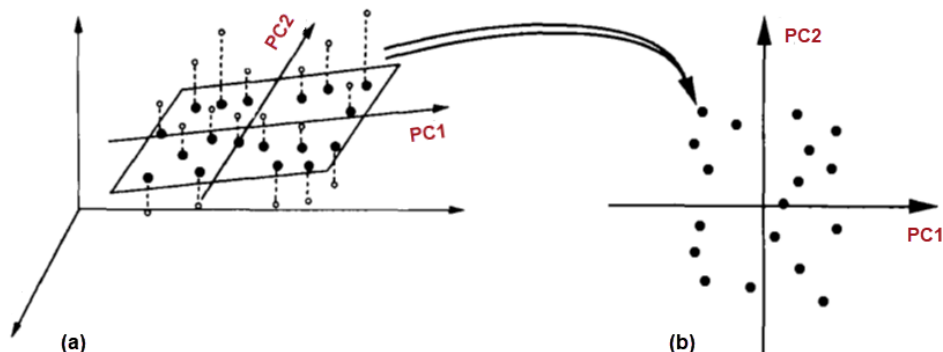
Vsako izmed naštetih področij vsebuje podskupine ali pripadnike posameznih analiz, kot npr. *multipla linearna regresija* ter *analiza grupiranja* (ang. *Cluster analysis*) podatkovnega rudarjenja in *nadzorovane* (ang. *supervised*) ali *nenadzorovane* (ang. *unsupervised*) *klasifikacije* klasifikacijskih metod. Analize uporabljamo posamezno ali največkrat v kombinaciji z namenom boljšega razumevanja sistema (28). Najpogosteje uporabljeni metodi na področju razvojne in proizvodne farmacevtske tehnologije sta *analiza glavnih komponent* in *regresija delnih najmanjših kvadratov* (32).

1.3.1.1. Metoda glavnih komponent

Analiza glavnih komponent ali PCA (ang. Principal Component Analysis) je multivariatno orodje področja EDA, katerega glavna naloga je preko linearnih kombinacij iz originalnih ali izvornih spremenljivk definirati **nove**, na takšen način, da zmanjša dimenzionalnost podatkov in pri tem čim bolj ohrani njihovo osnovno informacijo oz. **variabilnost**. Novo definirane spremenljivke so primeri t.i. *latentnih spremenljivk*, ki jih v kontekstu PCA imenujemo *glavne komponente* (PC, ang. principal components) (32, 34).

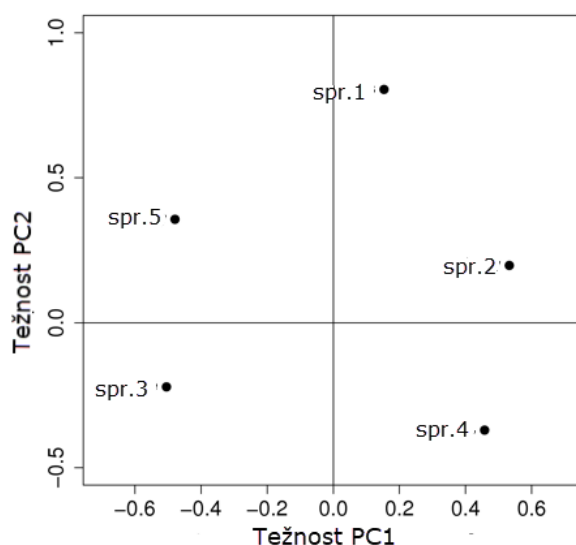
Glavne komponente pridobimo z zmanjšanjem linearnih kombinacij osnovnih spremenljivk ob zajetju maksimalne razpršenosti oz. variance podatkov. Grafično gledano, če imamo set podatkov K spremenljivk prikazanih v prostoru K-dimenzionalnega koordinatnega sistema, bo os prve glavne komponente (PC1) potekala v smeri, ki opisuje največjo varianco (razpršenost) podatkov. PC2 bo potekala v smeri druge največje variance, PC3 tretje, itd. S tem ustvarimo manj dimenzionalen koordinatni sistem, katerega nove osi predstavljajo glavne komponente in nove točke projekcije originalnih podatkov (ang. scores, Slika 4).

Točkovni diagram glavnih komponent (ang. Scores plot) nam analogno predstavlja »okno« skozi katerega opazujemo podatke (35). Na takšen način lahko lažje zaznamo grupiranje podatkov, trende in podatke s slabim prilaganjem v modelu (ang. outliers) (34).



Slika 4: (a) Grafična predstavitev določitev prvih dveh glavnih komponent (PC1 in PC2) v K -dimenzionalnem koordinatnem sistemu ($K=3$), prazne točke predstavljajo objekte originalnih podatkov, polne pa njihove projekcije na ravnino komponent (črtkane črte); (b) Točkovni diagram (36).

Kako so posamezne spremenljivke združene v glavno komponento, je izraženo s t.i. **težnostjo** (ang. **loading**) in grafično predstavljeno v **težnostnem diagramu** (ang. **Loadings plot**, slika 5). Ta nam pove, v kolikšni meri posamezna spremenljivka vpliva na informacijo glavne komponente. Vrednosti težnosti segajo od -1 do +1, pri čemer vrednost 0 pomeni, da spremenljivka nima nobenega »prispevka« k opisu proučevanega odziva (32).



Slika 5: Primer težnostnega diagrama s petimi spremenljivkami (spr.) (37).

PCA matematično opišemo z naslednjo enačbo:

$$X = I \cdot \bar{x} + T \cdot P' + E$$

kjer X predstavlja matriko podatkov sestavljeno iz N objektov K spremenljivk, \bar{x} aritmetično sredino, T točkovni vektor matrike, P' matriko težnosti spremenljivk in E matriko rezidualov oz. del matrike podatkov, ki ni pojasnjen s PCA modelom (36).

1.3.1.2. Multipla linearna regresija

Regresijska analiza je statistična metoda za predvidevanje vrednosti ene ali več odvisnih spremenljivk (odzivov) v povezavi z neodvisnimi spremenljivkami. V najpreprostejši obliki jo uporabljamo za umestitev premice z najboljšim prilaganjem med podatke (ang. fitting). Kadar opazujemo linearen odnos med eno odvisno (y_1) ter eno neodvisno spremenljivko (x_1) govorimo o enostavni linearni regresiji. V primeru analize dveh ali več neodvisnih spremenljivk (x_1, x_2, x_3, \dots), ki vplivajo na odziv odvisne spremenljivke (y_1) pa govorimo o **multipli linearni regresiji (MLR)**. MLR model definiramo z enačbo (34):

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_N) + e_y \quad (N \dots \text{število } x \text{ spremenljivk}),$$

kjer je odziv y funkcija neodvisnih spremenljivk x , pogosto imenovanih tudi faktorji. e_y predstavlja šum modela. Iz praktičnih razlogov zgornjo enačbo, s pomočjo polinomskih funkcij, preoblikujemo v:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_Nx_N + e_y$$

kjer b_N predstavlja regresijski koeficient (34).

Analiza procesnih in formulacijskih parametrov, ki potencialno vplivajo na specifično lastnost y neke FO, bi lahko bil dober primer uporabe MLR (npr. vpliv dodane *količine granulirne tekočine, veziva in hitrost krogliččenja* na poroznost pelet izdelanih z metodo iztiskanja-krogliččenja) (38). Ugotovitve bi pripomogle k optimizaciji proizvodnje, vendar je zelo pomembno koliko in kakšne x spremenljivke imamo na razpolago.

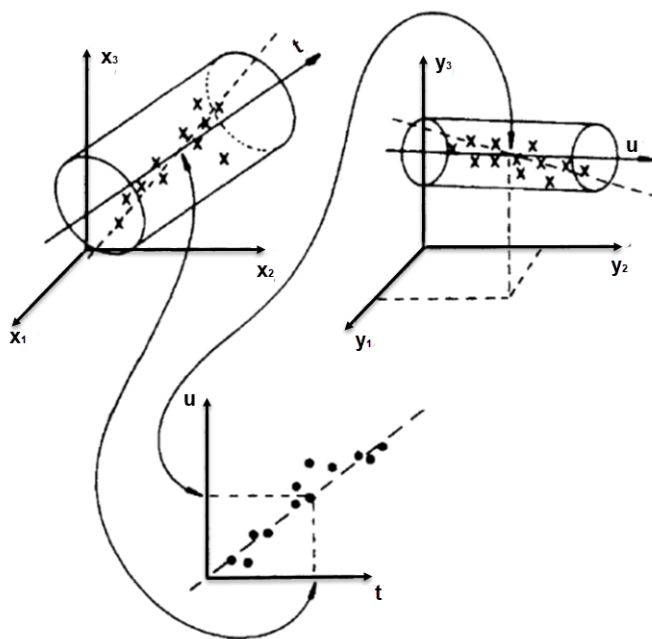
Več faktorjev x velikokrat ne pomeni boljšo napoved modela, temveč ravno nasprotno, daje nezanesljive rezultate (ang. overfitting) (34). Prav tako je pomembno, da so izbrane spremenljivke x med seboj neodvisne in ne izkazujejo t.i. kolinearnosti, kar bi še dodatno poslabšalo legitimnost modela. Metoda **delnih najmanjših kvadratov** se lahko izogne navedenim slabostim in je pogosto alternativni izbor MLR (39).

1.3.1.3. Regresija delnih najmanjših kvadratov

Metoda delnih najmanjših kvadratov (PLSR – ang. Partial least squares regression) naredi pri regresijski analizi še korak dlje. Model je zasnovan na dveh ločenih matrikah podatkov:

- ➔ iz matrike X , sestavljene iz K števil neodvisnih spremenljivk x
- ➔ in matrike Y z M številom odvisnih spremenljivk y .

Vsak objekt/vrednost matrike obstaja v svojem X oz. Y -prostoru koordinatnega sistema in v vsakem izmed njiju lahko izvedemo PCA ter dobimo posebej komponenti za oba prostora (t in u komponenta na Sliki 6). Projekcija točk v t - u ravnini predstavlja najboljšo obstojno korelacijo med X in Y . Tako lahko s PLSR metodo zanesljivo analiziramo X podatke visokih kolinearnosti, velikega števila in šumov ter hkrati modeliramo številne odzive spremenljivk Y , kar MLR ne omogoča (36, 39).

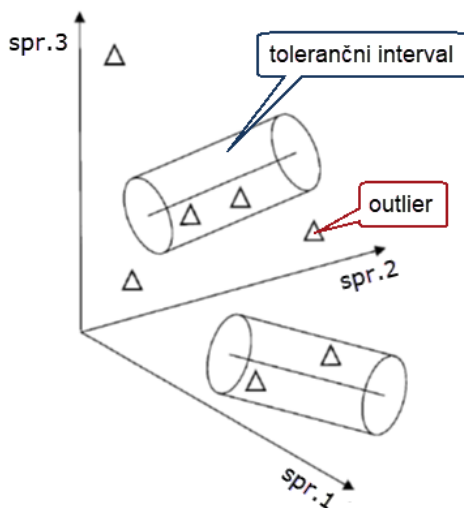


Slika 6: Princip PLSR metode; PCA se izvede na obeh, odvisnih (x) in neodvisnih (y) spremenljivkah (X in Y prostor); prekinjena premica v projekcijskem grafu t - u ponazarja linearno korelacijo med X in Y (36).

1.3.2. NADGRADNJA MVDA

Učinkovitejšo obdelavo podatkov in boljšo interpretacijo modela nam omogočajo razširitveni pristopi k standardno uporabljenim tehnikam MVDA. V povezavi s PCA se pogosto uporablja klasifikacijska metoda SIMCA (ang. Soft independent modelling of class

analogies, Slika 7), s katero konstruiramo interval oz. območje tolerance okrog ravnin glavnih komponent (po navadi 95%). Objekti PCA so tako dodeljeni različnim razredom, glede na njihovo lego v tolerančnih intervalih; objekti, ki ležijo izven območja se smatrajo kot ekstremne vrednosti z nedefinirano skupino (ang. outliers) (36).

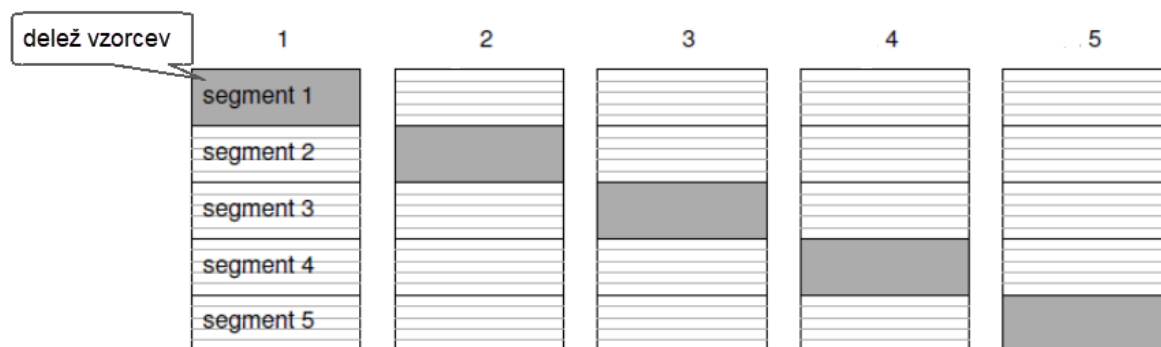


Slika 7: Metoda SIMCA (36).

Kot razširitev PLS se je zelo dobro izkazala hierarhična metoda »**multiblock**« PLS modeliranje, ki z razvrstitvijo X in Y podatkov v enakomerno smiselne skupine (ang. blocks), bistveno olajša preglednost modela. Koncept metode je v obravnavanju skupine oz. bloka spremenljivk kot samostojno entiteto in izvedbi PLS med posameznimi bloki. Dobljeni rezultati so prikazani v blokih hierarhično višjega nivoja, med katerimi lahko ponovno izvedemo PLS itd. (40)

1.3.3. VALIDACIJA MODELOV

Vsako multivariatno modeliranje prinaša model, ki je dober v kolikor mu dopušča njegova **validacija**. Z njo preverimo kakovost oz. napovedno sposobnost modela. Validacijo lahko izvedemo na številne načine; najpogosteje uporabljamo navzkrižno validacijo (ang. Cross-validation), kjer določen sklop podatkov izključimo iz procesa modeliranja in razvijemo model na osnovi preostalega dela vzorcev (Slika 8). Izpuščeni vzorci se preverijo glede na prileganje v ustvarjen model in se nato ponovno vrnejo v osnovni nabor podatkov. Postopek se ponovi in odstrani se nov sklop podatkov, dokler se vsak vzorec uporabi za validacijo in modeliranje natanko enkrat (33).



Slika 8: Shematski prikaz primera 5-kratne navzkrižne validacije; številka nad stolpcem podatkov predstavlja posamezno validacijo, kjer sivo obarvan segment vzorcev uporabimo za testiranje modela ustvarjenega iz preostalih neobarvanih segmentov (33).

Pri ocenjevanju kakovosti modela sta zelo pomembni vrednosti R^2 in Q^2 . Z njima ugotovimo prileganje ter napovedno moč modela. V kolikšni meri model opiše varianco neodvisnih spremenljivk X , nam pove vrednost R^2 . Pri izvedbi navzkrižne validacije dobimo vrednost Q^2 , ki nam pove koliko variance X lahko z modelom napovemo. V obeh primerih se vrednosti gibljejo od 0 do 1, kjer višja vrednost pomeni boljši model (32, 39).

1.3.4. UPORABNOST MVDA

Nekateri primeri uporabe MVDA v farmacevtski industriji so: razvoj kalibracijskih modelov spektroskopskih metod, analiza in nadzor lastnosti surovin, identifikacija procesnih ter materialnih spremenljivk z največjim vplivom na kakovost glavnega produkta, ... (32) V zadnjih letih se MVDA uporablja tudi kot orodje **QbD** (ang. Quality by Design) principa razvoja farmacevtskih izdelkov, katerega glavna naloga je zagotoviti oz. vgraditi kakovost končnega produkta med samim procesom izdelave. Obstajajo poročila aplikacije MVDA skupaj z QbD na nekaterih že obstoječih, komercialnih postopkih izdelave farmacevtskih izdelkov, z namenom izboljšanja učinkovitosti proizvodnje (32, 41). Takšen primer uporabe multivariatnih metod je tudi glavna tematika te magistrske naloge.

2. NAMEN DELA

Izdelki farmacevtske industrije so kompleksni sistemi, katerih kakovost je odvisna od številnih dejavnikov ali faktorjev. Proces izdelave in fizikalno-kemijske lastnosti vstopnih surovin sta primera takšnih dejavnikov, ki jih je za uspešen razvoj in nenazadnje proizvodnjo končnega produkta potrebno dobro poznati ter neprestano nadzorovati. S tem namenom bomo v okviru magistrske naloge preiskali fizikalno lastnost močljivosti različnih kontrolnih števil modelne ZU in izbranih pomožnih snovi (MCC in κ -karagenan), ki vstopajo v formulacijo pelet izdelanih s tehnologijo iztiskanja in krogličanja. Pri tem bomo izvedli meritve stičnih kotov za določitev spremenljivke hitrosti pronicanja tekočega medija v trdno snov MCC, κ -karagenana in ZU. Rezultate bomo vključili v razvoj multivariatnega (MVDA) modela, skupaj s podatki procesnih in formulacijskih parametrov, ki jih bomo zbrali iz internih, predhodno izvedenih raziskav na proizvodnih serijah pelet.

Z izgradnjo modela bomo lahko ovrednotili vse fizikalno-kemijske lastnosti vstopajočih sestavin formulacije ter parametre procesa izdelave, ki značilno vplivajo na lastnost sproščanja ZU iz pelet. Te bomo v sklopu QbD pristopa izdelave farmacevtskih izdelkov z vgrajeno kakovostjo (ang. Quality by Design) okarakterizirali kot kritične procesne parametre (CPP – ang. Critical Process Parametres) ter kritične lastnosti surovin (CMA – ang. Critical Material Attributes), ki vplivajo na kritično lastnost kakovosti produkta (CQA – ang. Critical Quality Attributes), tj. sproščanje modelne ZU iz pelet. Končni cilj uporabe MVDA metode bo izgradnja modela z ustreznim prileganjem in napovedno močjo, ki bo prinesel posodobljeno optimizacijo na že uveljavljenem, komercialnem postopku izdelave pelet.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

3.1.1. POMOŽNE SNOVI ZA IZDELAVO PELET

- **Mikrokristalna celuloza (MCC)**

MCC, ki smo jo uporabili je Avicel[®] Ph-101 proizvajalca FMC Biopolymer. Od ostalih komercialnih različic, kot so Avicel[®] Ph-102, Avicel[®] Ph-105, Avicel[®] Ph-112, Avicel[®] Ph-200 in Avicel[®] Ph-200 LM se razlikuje po velikosti delcev, vsebnosti vlage ter nasipni gostoti (42). Ima naslednje fizikalno-kemijske lastnosti (podatki so pridobljeni iz internih specifikacij):

IZGLED: bel, fin, pretočen, kristaliničen prah

STOPNJA POLIMERIZACIJE: ≤ 350

pH: 5,0 – 7,5

VSEBNOST VLAGE: $\leq 7,0 \%$

NASIPNA GOSTOTA: 0,26 – 0,31 g/ml



Slika 9: Vzorec MCC Ph 101.

- **κ -karagenan**

Lastniški imeni uporabljenih κ -karagenanov sta Gelcarin[®] GP 812 in Gelcarin[®] GP 911 (proizvajalec DuPont Nutrition USA, Inc.). Fizikalno-kemijske lastnosti (podatki so pridobljeni iz internih specifikacij):

IZGLED: rumenkasto oz. rumenorjav do bel prah

VSEBNOST VLAGE: $\leq 12,5 \%$ (GP 812); $\leq 12,0 \%$ (GP 911)

VISKOZNOST: ≥ 5 mPas



Slika 10: Vzorec κ -karagenana.

3.1.2. MODELNA UČINKOVINA

Učinkovina, ki smo jo uporabili za naš model sodi v II. razred Biofarmacevtskega klasifikacijskega sistema (angl. Biopharmaceutical Classification Scheme – BCS). Za te je značilna dobra permeabilnost oz. dobro prehajanje lipofilne bariere in slaba topnost v vodnih raztopinah (43). Glede na kislinsko-bazične lastnosti je ZU šibka baza.

3.1.3. TEKOČI MEDIJ

- a) prečiščena voda pridobljena s postopkom reverzne osmoze
- b) 0,04 M trinatrijev fosfat z 1% natrijevim lavril sulfatom (NaLS) – disolucijski medij

Priprava disolucijskega medija:

Medij smo pripravili v laboratoriju s pomočjo standardne laboratorijske steklovine, pH metra in tehtnice. Uporabili smo naslednje reagente:

- trinatrijev fosfat dodekahidrat ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$)
- natrijev lavril sulfat (NaLS) ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$)
- 1 M HCl
- 1 M NaOH
- standardna raztopina s pH 12 (za uravnavanje pH metra)

V 800 ml prečiščene vode smo raztopili 15,21 g $\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ in dodali 9 ml 1 M HCl, premešali ter uravnali pH na $12,0 \pm 0,05$ z 1 M HCl oz. 1 M NaOH. Raztopino smo prelili v 1000 ml bučko in jo z vodo dopolnili do oznake. Nato smo v 1000 mL medija prenesli 10,0 g NaLS in mešali na magnetnem mešalu, dokler se ni NaLS popolnoma raztopil.

3.1.4. LABORATORIJSKA OPREMA IN NAPRAVE

- * steklovina: merilni valj, bučka, čaša, steklena palčka, lijak, merilna pipeta, petrijevke, objektna stekla, prahovke
- * magnetno mešalo
- * precizna tehtnica GH-300-EC, A&d Instruments LTD, Lotrič Metrology, Slovenija
- * tehtalni čolniček
- * ultrazvočna kopel Branson 1510, Branson Ultrasonic Corp., ZDA

- * pH meter Metter Toledo Seven Compact, Švica
- * ročna hidravlična stiskalnica s priloženimi pečati in matrično vdolbino, Specac, Velika Britanija
- * merilnik stičenga kota DSA 100, Krüss, Nemčija
- * dodaten laboratorijski pribor (spatula, žlička, parafilm)

3.1.5. PROGRAMSKA OPREMA

- DSA3, Software for Drop Shape Analysis, Krüss, Nemčija
- Origin Pro 8.0, OriginLab, ZDA
- SIMCA P+ 14.0, Umetrics, Švedska

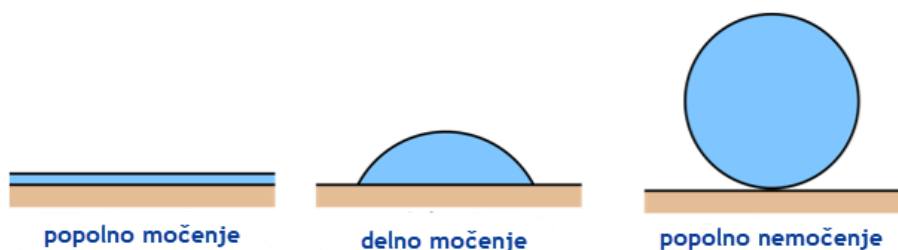
3.2. METODE

3.2.1. DOLOČANJE MOČLJIVOSTI

Poznavanje površinskih lastnosti snovi, ki vstopajo v formulacijo izdelka je pomembno v mnogih tehnoloških postopkih, kot npr. mešanje prahov, vlažno granuliranje, oblaganje, razpadnost, raztapljanje pelet/tablet, dispergiranje tdnih snovi v tekočini, stiskanje prahov itd. Sposobnost močenja je pokazatelj obnašanja površine tekoče snovi ob stiku s trdninami med procesom izdelave FO (44). Npr. med izdelavo pelet je potrebna zadostna močljivost granulirne tekočine s praškasto mešanico suhih komponent za nastanek ustrezno plastične zmesi.

3.2.1.1. Sposobnost močenja

Močenje je sposobnost tekočine, da vzpostavi in ohrani stik s trdno površino, kot posledica intermolekularnih interakcij, kadar se ji približa. V primeru popolnega močenja to opazimo kot razlitje in razmazanje tekočine v tanki plasti po površini trdnine (Slika 11) (44). Stopnja močenja je odvisna od ravnotežja vplivov adhezijskih in kohezijskih sil snovi v kontaktu, kar se odraža na njihovih površinskih ali medfaznih napetostih, katerih vrednosti lahko pridobimo z opazovanjem kota močenja (45).



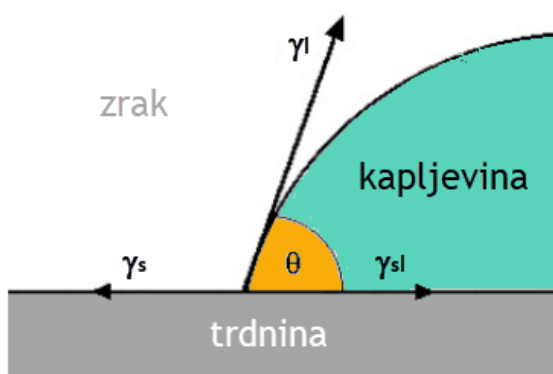
Slika 11: Shematski prikaz različnih stopenj močenja (46).

3.2.1.2. Stični kot

Kot močenja ali **stični kot** je kot, ki ga oklepa tangenta na površino kapljice s stično površino trdne snovi (45). V ospredju raziskav merjenja stičnega kota je ugotovitev Younga iz leta 1805, ki pojasnjuje odnos med stičnim kotom in medfaznimi napetostmi 3-faznega stika (47). Zastavil je naslednjo enačbo:

$$\gamma_s - \gamma_{sl} = \gamma_l \cos\theta$$

θ je kot močenja, γ_s predstavlja površinsko napetost trdne snovi, γ_l površinsko napetost tekočine in γ_{sl} medfazno napetost med tekočino in trdno snovjo (Slika 12). Sicer bi bilo bolj pravilno upoštevati še plinasto fazo in medfazne napetosti trdno-plinasto in tekoče-plinasto, vendar so te interakcije v večini tako majhne, da jih pri sobnih pogojih merjenja lahko zanemarimo (48).



Slika 12: Sile površinskih oz. medfaznih napetosti, v skladu z Youngovo enačbo, ki delujejo na kapljico tekočine po nanosu na trdno površino (48).

3.2.2. METODA SEDEČE KAPLJICE

Stični kot kapljevine sodi pod parametre analize oblike kapljice (ang. drop-shape analysis), ki zajema različne pristope merjenja (45). Mi smo uporabili metodo sedeče kapljice (ang. sessile drop), ki je poleg viseče kapljice (ang. pendant drop) ena izmed najpogosteje uporabljenih metod določanja stičnega kota. Meritve lahko izvajamo na dva načina (48):

- 1) Statičen način – kapljico tekočine kanemo na trdo površino in merimo kot, ki ga oklepa; pri tem se prostornina kapljice ne spreminja in je konstantna
- 2) Dinamičen način – stični kot merimo na »dinamični« kapljici, katere prostornina se veča ali manjša, dozirna igla pa je neprestano v kontaktu s kapljico na trdnini

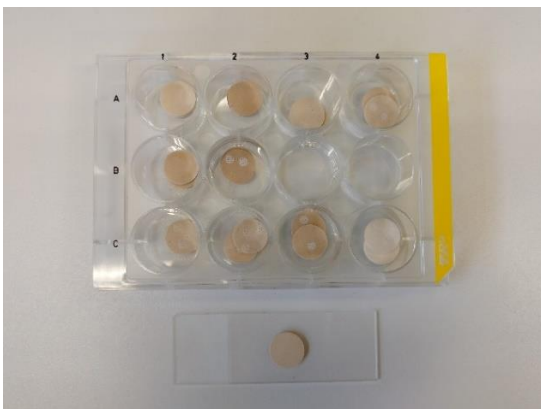
3.2.2.1. Priprava vzorcev

Meriti stični kot na praških bi bilo zaradi neenakomernosti in hrapavosti trdne površine, ki vpliva na prekomerno variiranje meritev, zelo nepraktično (49). Zato smo praškaste snovi (MCC Ph 101, κ -karagenan, modelno ZU) pretvorili v trdne kompakte oz. tabletam podobne ploščice gladkih površin (Slika 14). To smo storili z ročno hidravlično stiskalnico in priloženimi pečati kovinske matrice, v katero smo nasuli naš vzorec (Slika 13).



Slika 13: Hidravlična stiskalnica (levo) in kovinska matrica s pečatom ter spodnjim nastavkom (desno).

Natehta praška posameznega vzorca je bila 200 ± 2 mg, stiskanje pa smo izvajali s silo desetih ton, eno minuto (pri κ -karagenanu) oz. 30 sekund (pri MCC). Ploščice modelne ZU so bile zelo neobstojne in so se pri rokovanju krušile ter lomile. Iz navedenih razlogov smo stiskanje ZU podaljšali na minuto in 30 sekund ter natehto povečali na 300 ± 2 mg. S tem smo problem stisljivosti delno izboljšali, krušenje je bilo manjše, pri previdnem rokovanju pa ni prihajalo do lomov.



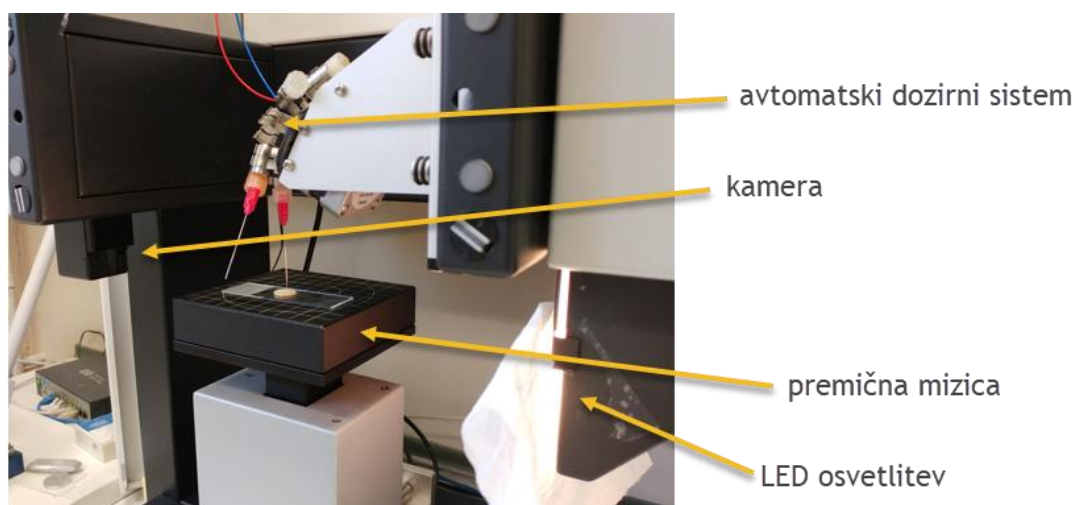
Slika 14: Primeri izdelanih ploščic.

3.2.2.2. Statično merjenje stičnega kota

Instrument, ki smo ga uporabili je merilnik stičnega kota DSA 100 proizvajalca Krüss, Nemčija (Slika 15). Za razliko od klasičnih goniometrov z optičnim mikroskopom, DSA 100 zagotavlja večjo avtomatizacijo, prilagodljivost in računalniško podporo. Sestavlja ga: programsko nadzorovan odmerni sistem z dinamičnim (avtomatsko menjavanje vrste dozirnika/tekočine) ali direktnim (injekcijska brizga) načinom doziranja; polavtomatsko nastavljiva 3-D premična mizica, na katero položimo objektno stekelce z vzorcem; LED žarnica za osvetlitev preiskovanega območja in kamera z monokromatskim senzorjem, sposobno zajetja posnetkov visokih ločljivosti (Slika 16) (50, 51).



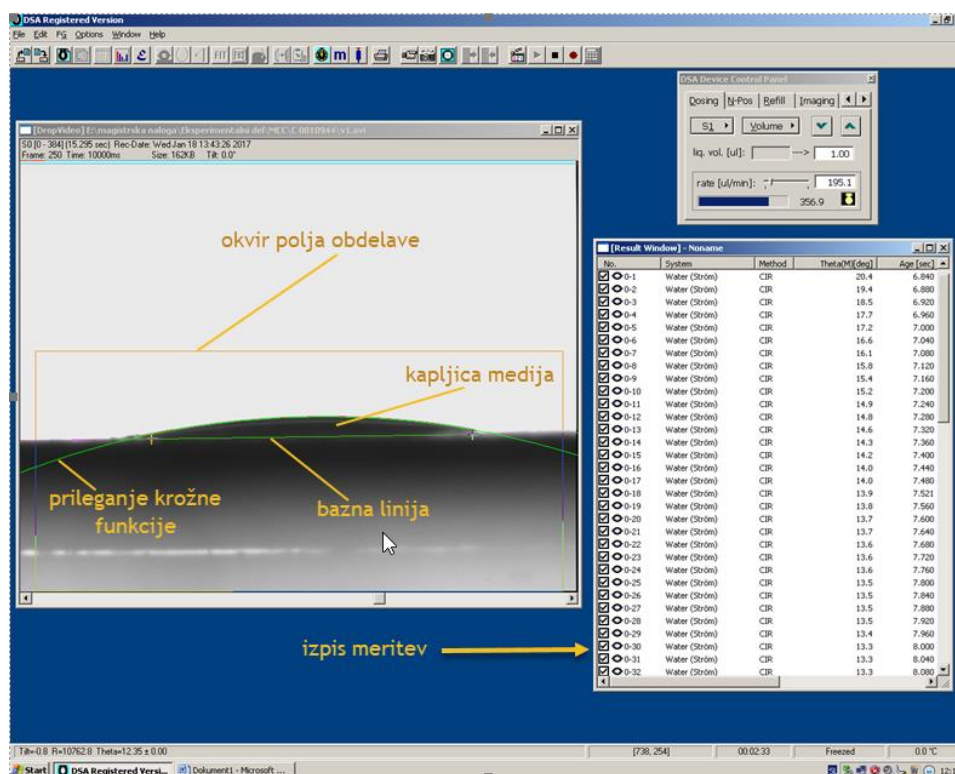
Slika 15: Merilnik stičnega kota DSA 100 (Krüss, Nemčija).



Slika 16: Komponente aparature DSA 100 z analiziranim vzorcem.

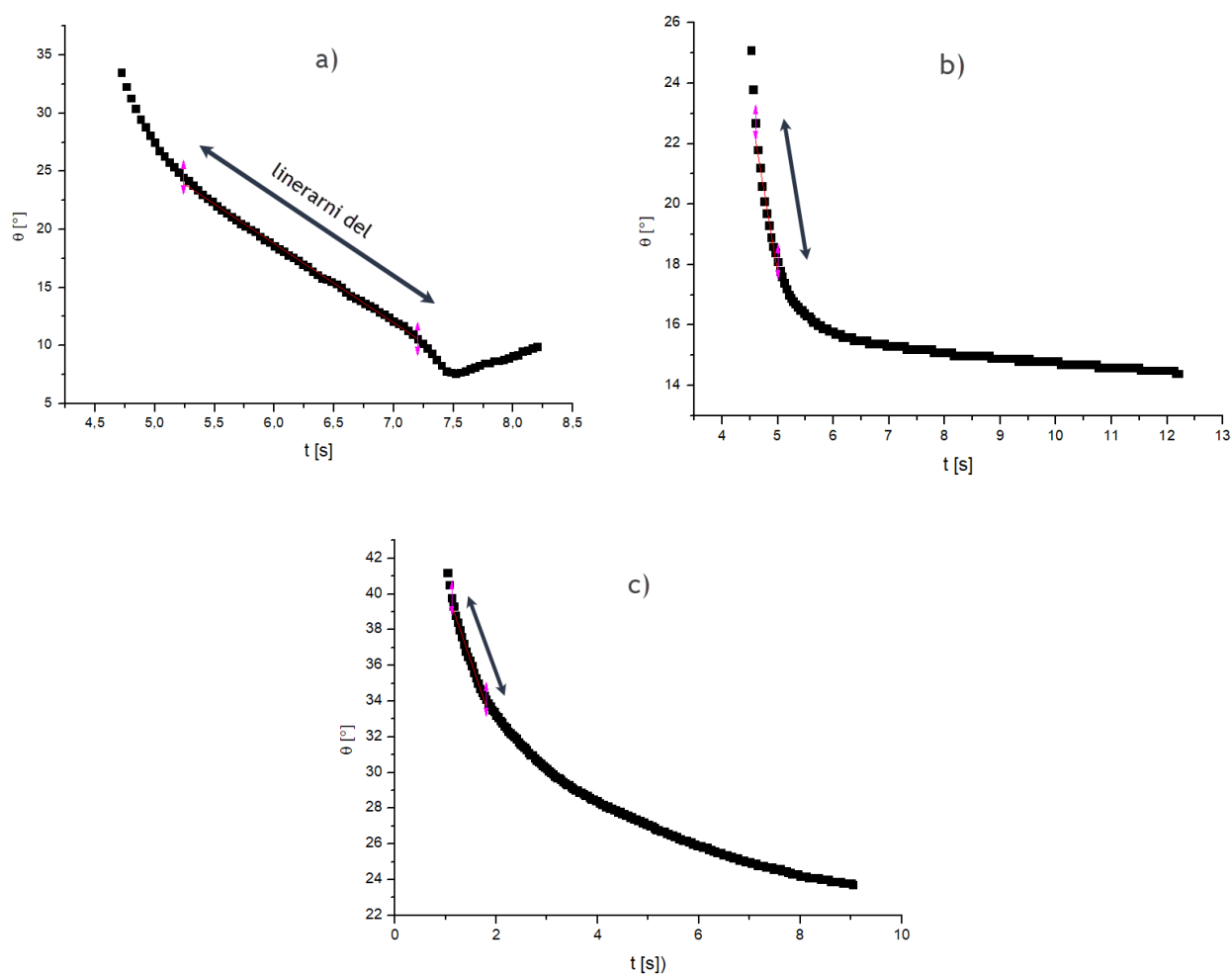
Meritve stičnih kotov smo izvedli na treh različnih trdnih snoveh, to so: MCC (Avicel® Ph 101), κ -karagenan (Gelcarin® GP 812; Gelcarin® GP 911) in modelna ZU, z uporabo naslednjih tekočih medijev: prečiščena voda in puferski/disolucijski medij – 0,04 M trinatrijev fosfat z 1% NaLS. Na vzorcih MCC in karagenana smo uporabili puferski medij, na modelni ZU pa prečiščeno vodo ter pufer. Na vsako izmed predhodno stisnjenih ploščic vzorca smo kanili 2 μ l medija (1 μ l disolucijskega medija v primeru modelne ZU) in zajeli videoposnetek ločljivosti 744 x 576 slikovnih točk s 25 sličicami na sekundo (fps).

Rezultate meritev smo dobili z obdelavo shranjenih videov v priloženem programu DSA3 (Slika 17). Pri tem smo izbrali možnost ovrednotenja stičnega kota z metodo **prileganja kroga** (ang. **Circle fitting method**), ki s prileganjem segmenta krožne funkcije na obliko kapljice v vsaki sličici posnetka, algoritmsko izračuna kot močenja (48). Program upošteva obrobo vseh zajetih predmetov in je za pravilne izračune potrebno ročno nastaviti bazno linijo (linijo stika kapljice s površino trdne snovi) ter paziti da dozirna igla ni v slikovnem polju obdelave. Prav tako smo ročno nastavili začetno točko, od katere se začne obdelava slik. Metoda prileganja kroga je primerna samo za statičen način določanja stičnega kota sedeče kapljice in je v primeru obdelave daljših posnetkov večjega števila vzorcev tudi najhitrejša.



Slika 17: Primer obdelave videa pri določanju stičnega kota.

Na vsakem vzorcu smo naredili najmanj 3 do 5 meritev. Stični kot se je zaradi pronicanja medija skozi površino trdne snovi spreminjal. Zato smo ga merili v nekem vizualno določenem časovnem intervalu – od začetne točke stika kapljice s trdno površino, do končne točke ob pojavu geliranja ali plega kapljice zaradi pronicanja v material. Rezultate smo izvozili kot vrednosti stičnega kota (θ) v časovnih točkah (na vsake 0,04 sekunde) in jih v programu OriginPro prikazali v obliki grafa θ v odvisnosti od časa (Slika 18). Iz linearnega dela grafa smo tako določili naklon (k_n) oz. hitrost pronicanja medija. Iz ponovitev smo nato izračunali povprečje naklona (k) ter standardni odklon (SD). Vrednosti vseh k in SD so navedene v Prilogah I, II in III.



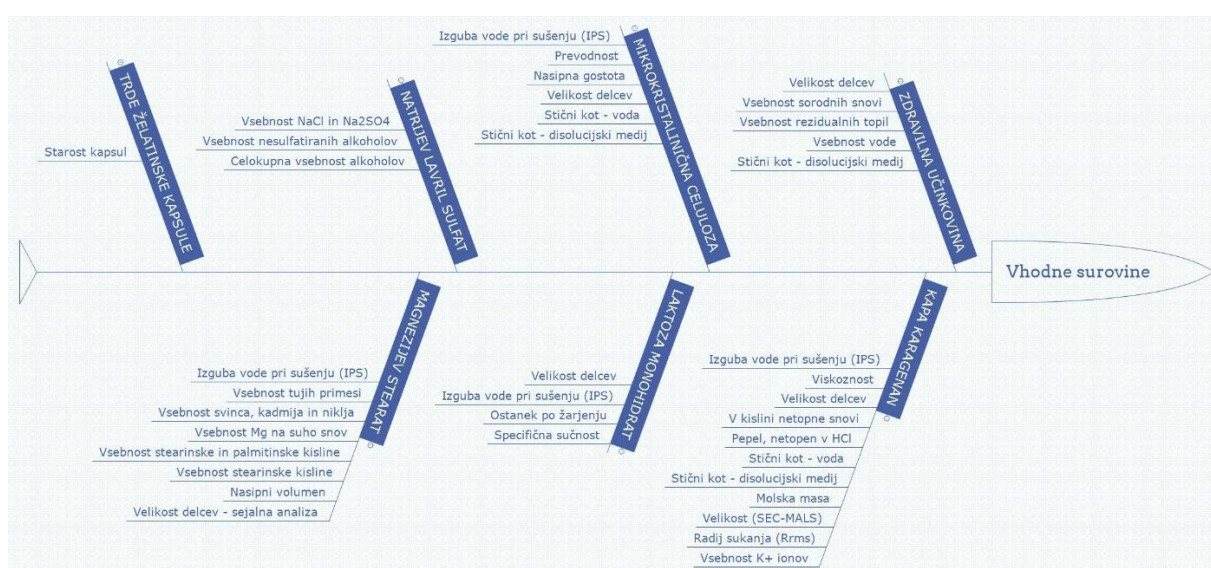
Slika 18: Primeri izrisanih grafov stičnega kota v odvisnosti od časa v programu Origin pro za a) κ -karagenan, b) MCC in c) modelno ZU za uporabljen disolucijski medij.

3.2.3. STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV Z MVDA

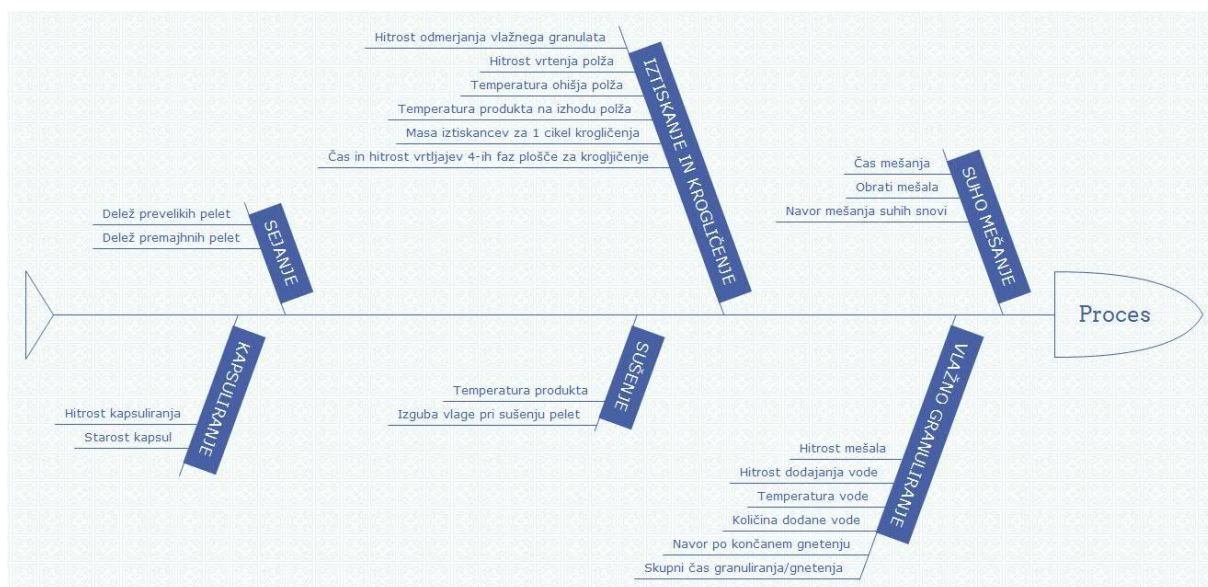
Eksperimentalne podatke močljivosti smo statistično obdelali skupaj podatki, ki smo jih pridobili iz predhodno izvedenih raziskav na proizvodnih serijah pelet. Ti zajemajo:

- fizikalno-kemijske lastnosti sestavin izdelka (interni specifikacijski in eksperimentalno določeni parametri)
- in procesne parametre iz vsake faze priprave pelet,

ki potencialno vplivajo na hitrost sproščanja modelne ZU. Za preglednejšo predstavo so vsi proučevani formulacijski in procesni parametri navedeni v spodnjih dveh »ribjih« (Ishikawa) diagramih (Sliki 19 in 20).



Slika 19: Preučevane fizikalno-kemijske lastnosti sestavin izdelka.



Slika 20: Opazovani procesni parametri za vsak posamezni korak priprave pelet.

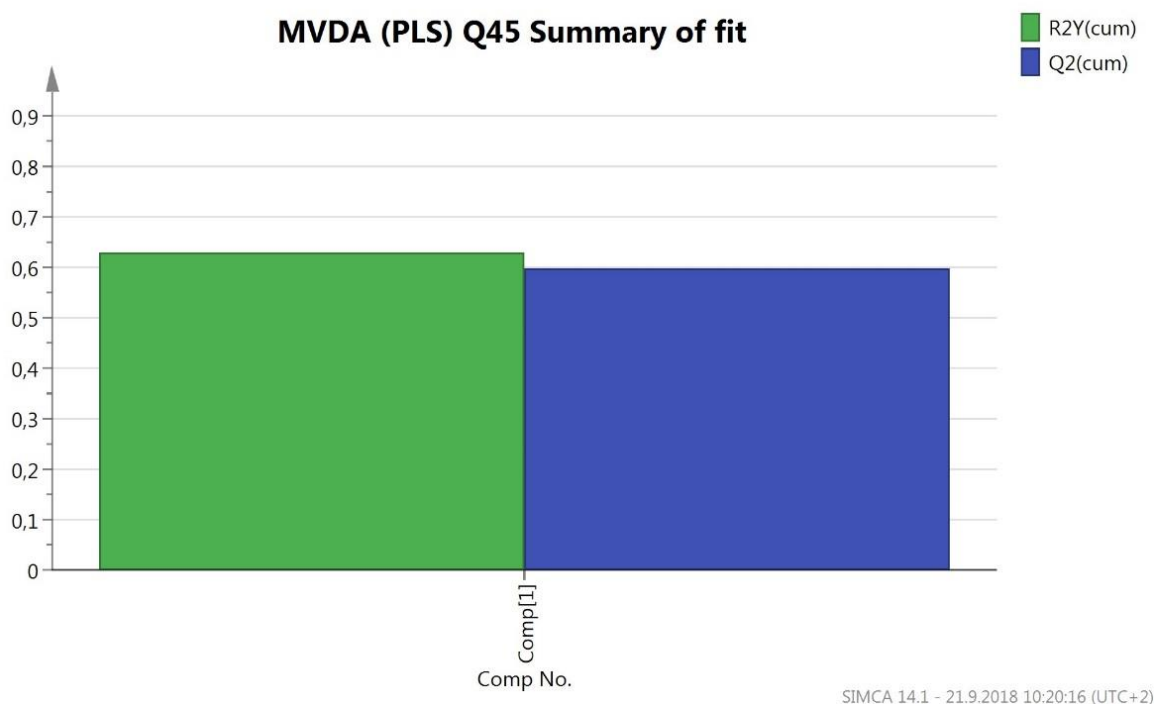
Za statistično orodje smo izbrali nehierarhično MVDA metodo **delnih najmanjših kvadratov** (ang. **PLSR – Partial least squares regression**). Matriko X (neodvisnih) spremenljivk so gradile vrednosti procesnih in formulacijskih parametrov, hitrost sproščanja ZU v 45. minuti pa smo določili kot opazovan **odziv** odvisne spremenljivke Y.

Programska oprema, ki smo jo uporabili za multivariatno obdelavo podatkov, grafično predstavitev rezultatov in razvoj ter validacijo modela je SIMCA P+ 14.0 (Umetrics, Švedska). Bili smo pozorni na dobro prilaganje (vrednost R^2) in napovedno moč (Q^2) modela. S tem namenom smo v model vključili le x spremenljivke s statistično značilnim vplivom, pri katerih je njihov odziv večji od razpršenosti (standardnega odklona) podatkov.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

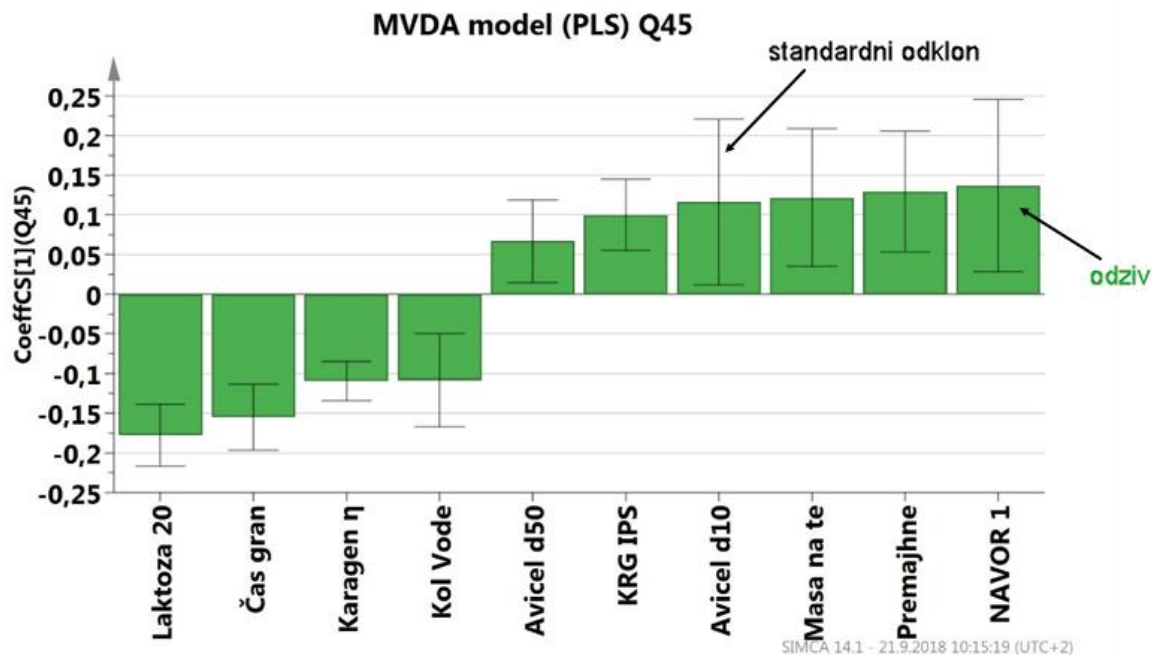
Izgradnjo modela smo pričeli s 117 spremenljivkami, ki smo jih pridobili iz specifikacijskih parametrov vstopajočih surovin in zabeleženih eksperimentalnih podatkov (vključno z določenimi nakloni pronicanja tekočega medija v trdno snov κ -karagenana, MCC in modelne ZU iz meritev stičnih kotov). Vse procesne in formulacijske parametre smo v statističnem programu ovrednotili glede na doprinos h kritični lastnosti produkta oz. hitrosti sproščanja ZU iz pelet v 45. minuti (Q_{45}).

Odvisnost proučevanega odziva od upoštevanih spremenljivk lahko opišemo z eno glavno komponento (Comp[1], Slika 21). Vrednosti prileganja modela glede na odziv Y (R2Y – zelen stolpec) in napovedne sposobnosti pridobljene iz navzkrižne validacije (Q2 – moder stolpec) sta v obeh primerih med 0,55 in 0,65, kar bi ocenili kot soliden model.



Slika 21: Diagram povzetka končnega MVDA modela ustvarjenega z metodo PLS.

Rezultate smo predstavili v obliki stolpčnega diagrama **koeficientov vpliva** ali **težnosti** posameznih spremenljivk. (Slika 22). Višja kot je težnost spremenljivke, bolj je značilen vpliv na proučevani odziv oz. na hitrost sproščanja modelne ZU v 45. minuti. Ta je lahko pozitiven (večja je hitrost sproščanja ZU) ali negativen (manjša hitrost je sproščanja ZU). V primeru kjer je bil standardni odklon spremenljivke večji od odziva, smo jo iz modela izključili in obravnavali kot statistično neznačilno.



Slika 22: Koeficienti vpliva posameznih procesnih in formulacijskih parametrov s statistično značilnim vplivom na obravnavan odziv (hitrost sproščanja ZU v 45. minuti).

LEGENDA PARAMETROV:

- Laktoza 20 – delež delcev laktoze (tip – 200 mesh) s premerom manjšim od 0,100 mm po sejanju
- Čas gran – skupen čas vlažnega granuliranja/gnetenja
- Karagen η – viskoznost κ -karagenana
- Kol Vode – količina dodane vode med granuliranjem
- Avicel d50 – 50% delcev MCC je manjših od določene vrednosti parametra
- KRG IPS – izguba vode pri sušenju κ -karagenana
- Avicel d10 - 10% delcev MCC je manjših od določene vrednosti parametra
- Masa na te – masa iztiskancev v napravi za krogličenje (na tehtnici)
- Premajhne – delež premajhnih pelet
- NAVOR 1 – navor med granuliranjem

Iz rezultatov modela je razvidno, da na hitrost sproščanja ZU iz pelet vpliva 5 procesnih in 4 formulacijski parametri. Pozitiven vpliv imajo:

- Velikost delcev MCC (D_{50} , D_{10})
- Vsebnost vlage κ -karagenana (izguba pri sušenju)
- Masa iztiskanca v napravi za krogličenje
- Delež premajhnih pelet
- Navor med granuliranjem

Parametri z negativnim vplivom, ki zmanjšujejo hitrost sproščanja modelne ZU so:

- Velikost delcev laktoze (sejalna analiza)
- Čas granulacije
- Viskoznost κ -karagenana
- Količina dodane vode med granuliranjem

4.1. Vpliv procesnih parametrov na hitrost sproščanja ZU iz pelet

I) Faktorji s pozitivnim vplivom

Navor med granuliranjem

Spremljanje navora med izvajanjem vlažnega granuliranja je zelo pomembno za nadzor aglomeracije sestavin in s tem določitev končne točke granulacije. Njegova vrednost je odvisna od plastičnih in reoloških lastnosti mokre zmesi. Navor, ki se med mešanjem povečuje, nakazuje na uspešno tvorbo skupkov ali aglomeratov kot posledica medsebojnih interakcij trdnih in tekočih sestavin (52). Pozitiven vpliv navora na hitrost sproščanja ZU iz pelet bi si lahko razlagali, da se učinkovina, ki je v osnovi slabo topna, pri višjem navoru bolje aglomerira z ostalimi sestavinami in tvori aglomerate boljše močljivosti kot jih ima sama. V tem primeru bi se učinkovina potencialno nahajala na površini strukture aglomeratov in s tem omogočila hitrejše sproščanje (53).

Delež premajhnih pelet

Topnost ZU je pogosto povezana z velikostjo njenih osnovnih delcev. Pri zmanjšanju velikosti se poveča razmerje med površino in prostornino delca. Enaka trditev velja tudi za

pelete. Večja specifična površina delca/pelete omogoča več interakcij s topilom, kar povzroči večjo topnost ter pozitiven vpliv na hitrost sproščanje modelne ZU (54).

Masa iztiskanca v napravi za krogličenje

Obremenjenost naprave za krogličenje je vsekakor povezana s kakovostjo pelet. V literaturi najdemo navedbo, da najpogosteje vpliva na nasipno in zbito gostoto ter porazdelitev velikosti končnih pelet. Večja obremenjenost naprave za krogličenje (večja masa iztiskanca na tehtnici naprave za krogličenje) rezultira v peletah manjših velikosti in z njo povezano večjo specifično površino, kar je tudi opazno s pozitivnim učinkom na hitrost sproščanja ZU v našem modelu (55).

II) Faktorji z negativnim vplivom

Količina dodane vode

Dodatek vode kot granulacijske tekočine za pripravo mokre peletirne zmesi ima svojo zgornjo in spodnjo mejo preden zaznamo dva ekstremna pojava. Premajhna količina vodi do izgub procesa zaradi prašenja zmesi in nezmožnosti tvorbe enakomerno okroglih pelet (nezadostna plastičnost). Preveliko količino dodane vode pa zaznamo kot pelete prekomernih velikosti, ki so posledica vpliva preostale nevezane vode. Slednja povzroči nalaganje praškastih fragmentov v obliki vlažnih slojev na peletna jedra med krogličanjem. Ta pojav sekundarne aglomeracije se v angleški literaturi pogosto označuje kot tvorjenje »snežnih kep« (ang. »snow balling« effect) (22, 56). Razlog negativnega vpliva ob večji količini dodane vode med fazo granuliranja se tako nahaja v večji celokupni aglomeraciji praškastih komponent, kar vodi do večjih, bolj okroglih pelet, z manjšo specifično površino in posledično počasnejšo disolucijo. Če se navežemo na prejšnji parameter velikosti pelet, opazimo da imata delež premajhnih pelet in količina dodane vode ravno inverzen vpliv na odziv.

Skupen čas vlažnega granuliranja/gnetenja

Fazo vlažnega granuliranja oz. mokrega gnetenja zmesi definiramo kot časovno določen postopek dodajanja vezivne tekočine v zmes praškastih sestavin ob mešanju z dano hitrostjo. Sklepamo, da daljši skupen čas vlažnega granuliranja privede do kompaktnejše zmesi z večjo

gostoto in plastičnostjo, ki enako kot pri parametru količini dodane vode, prinaša večje pelete s počasnejšo disolucijo (53, 57).

4.2. Vpliv formulacijskih parametrov na hitrost sproščanja ZU iz pelet

I) Faktorji s pozitivnim vplivom

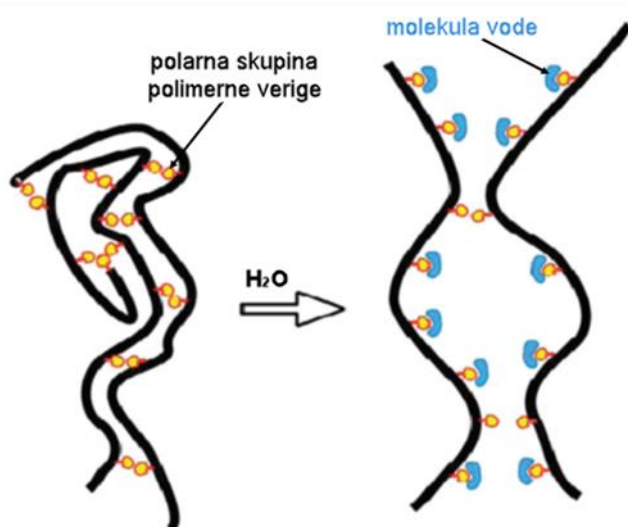
Velikost delcev MCC

MCC ima izjemno visoko intraparikularno poroznost, saj 90 do 95% površine predstavlja notranjost njenih delcev (12). MCC delci večje velikosti (poroznosti) so sposobni večjega privzemanja in zadrževanja vode. Z ozirom na »kristaliničen-gel« model se lahko gelska struktura MCC med postopkom sušenja pelet, zaradi izgube vode, zgosti oz. »skrči« (večja je vsebnost vode v MCC, večje je krčenje strukture pri sušenju). Predpostavljamo, da ta pojav sicer ne velja za ZU, lahko pa bi posredno izpodrinil delce učinkovine iz notranjosti formulacije na površino. ZU, ki se nahaja na površini peletnega jedra se bo hitreje raztapljala kot v notranjosti (pozitiven učinek na sproščanje). Do podobnega sklepa so prišli v citiranem znanstvenem članku o vplivu MCC ob povečani prisotnosti vode na lastnost sproščanja učinkovine paracetamola iz pelet narejenih z iztiskanjem in krogličanjem (53).

Vsebnost vlage κ -karagenana

Vsebnost vlage κ -karagenana je specifikacijski parameter, ki je poleg sposobnosti materiala za vezavo vode, odvisen od relativne vlažnosti okolja v katerem shranjujemo pomožne snovi ter z njimi rokujemo. Rezultat našega MVDA modela pravi, da večja kot je izguba mase pri sušenju (vsebnost vlage) κ -karagenana, hitrejša je sproščanje učinkovine iz pelet. Pojav si razlagamo s predpostavko, da količina vode, potrebna za lastnost geliranja oz. nabrekanja κ -karagenana je konstanta. Torej, višji kot je začetni % vlage v κ -karagenanu, manj vode se porabi za tvorbo gela, kar pomeni večjo količino razpoložljive vode za disolucijo modelne ZU v krajšem času. Dodatna razlaga, ki jo najdemo v literaturi je, da se absorbirane molekule vode, bodisi iz okolja bodisi iz procesa izdelave, z vodikovimi vezmi vežejo na polarne funkcionalne skupine polimera (κ -karagenana) in s tem zmanjšajo privlačne sile med njegovimi verigami (medsebojna razdalja verig se poveča – Slika 23). Nastala večja

prostornina med verigami polimera (manjša premreženost) omogoča večjo mobilnost v njem ujetih/vezanih molekul ZU in posledično hitrejšo sproščanje (58).



Slika 23: Vpliv absorbirane vode na povečanje prostornine med verigami polimera (57).

II) Faktorji z negativnim vplivom

Velikost delcev laktoze

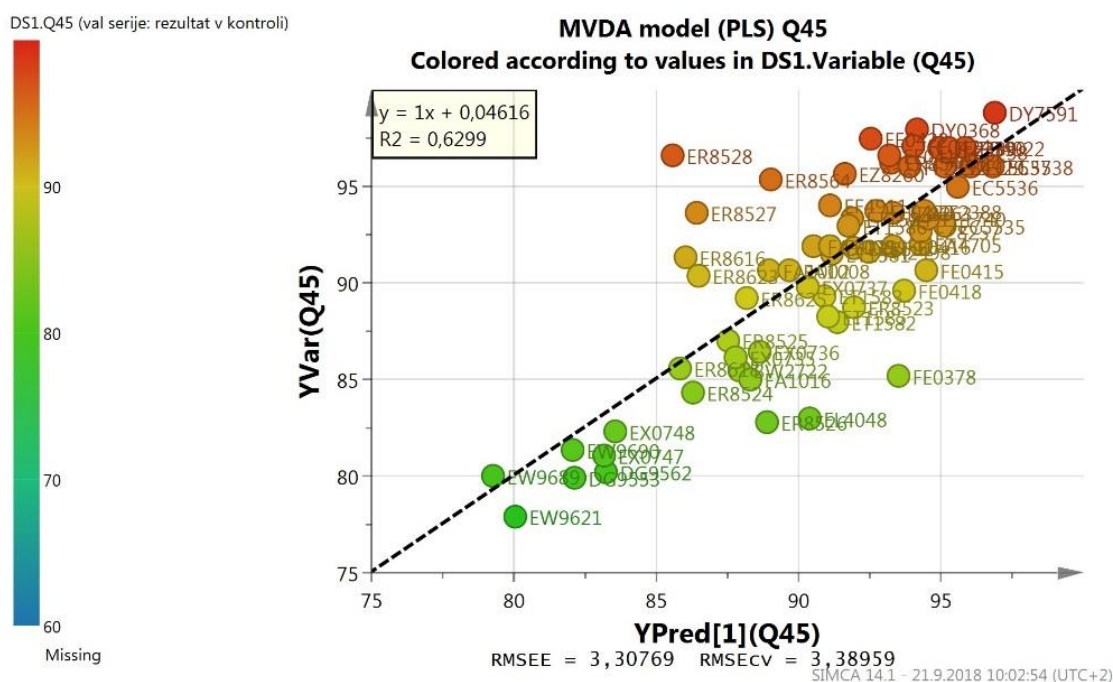
Laktozo kot pomožno snov v farmacevtskih formulacijah najpogosteje uporabljamo v vlogi polnila. Laktoza vgrajena v trdne izdelke kot so pelete se zaradi svoje hidrofilnosti ob kontaktu z vodo popolnoma raztopi in tvori pore. Rezultat tega je večja penetracija vode v peletna jedra, ki je na razpolago za proces sproščanja učinkovine (59). Iz modela sklepamo, da manjša kontaktna površina večjih delcev laktoze s topilom povzroča njihovo počasnejše raztapljanje, penetracija vode v matriko pelet je zato počasnejša in manjša je hitrost sproščanja modelne ZU.

Viskoznost κ -karagenana

Proces sproščanja ZU iz pelet s polimernim ogrodjem vključuje: penetracijo oz. vdor vode v suho peletno jedro, geliranje polimera (κ -karagenana) ter raztapljanje in prehod ZU preko gelske plasti. Slednji je difuzijsko nadzorovan z reološkimi lastnostmi gela. Večja kot je viskoznost gela κ -karagenana, manjša je difuzija ZU preko gelske plasti, ki kot fizična pregrada upočasnjuje hitrost sproščanja (60).

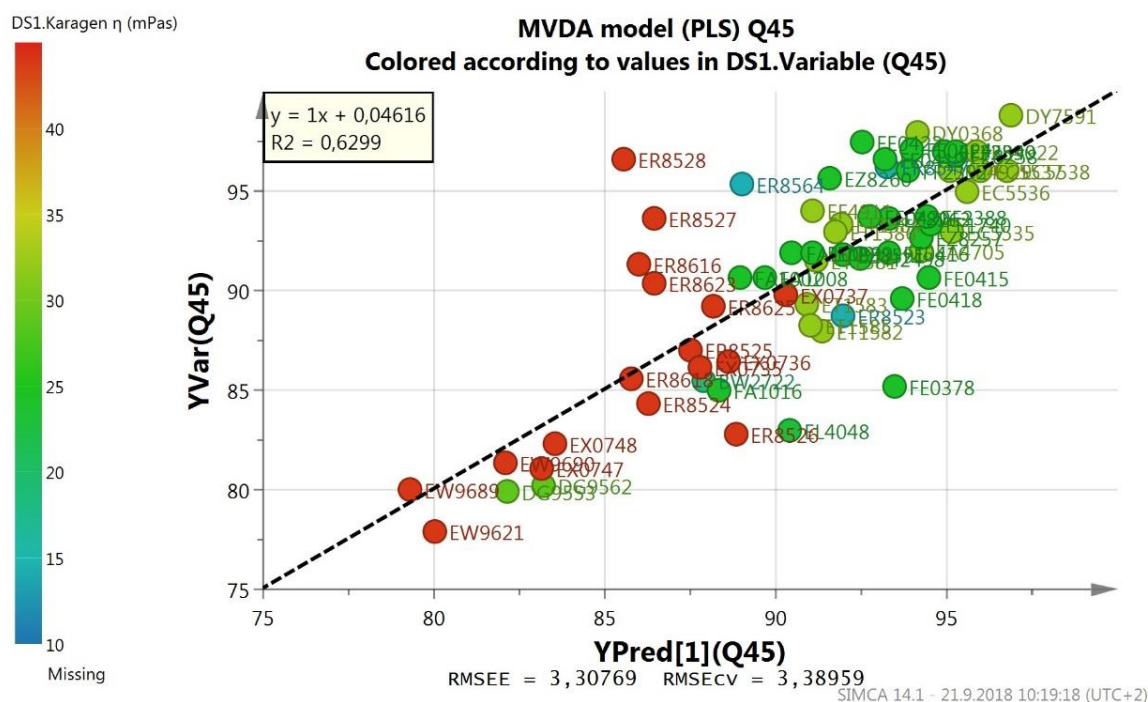
4.3. Kakovost modela

Zmogljivost našega modela smo interpretirali s točkovnim diagramom, ki prikazuje odnos med opazovanim in napovedanim odzivom Y (Slika 24). Točke diagrama predstavljajo posamezne serije izdelanih pelet obravnavane v modelu. Te so barvno ločene glede na intenziteto odziva. Rdeča barva označuje serije pelet z najhitrejšim sproščanjem modelne ZU v 45. minuti, zelena pa z najpočasnejšim. Pri rdeče obarvanih serijah zasledimo tudi pojav grupiranja. S pomočjo regresijske premice smo vizualno preverili prileganje, ki je na račun večje nelinearne razpršenosti serij s hitrejšim sproščanjem slabše.



Slika 24: Graf opazovanega v odvisnosti od napovedanega odziva Y za hitrost sproščanja ZU v 45. minuti.

Podatek RMSEE pod grafom je številčno merilo ujemanja opazovanih vrednosti odzivov z napovedanimi. Opisuje kolikšna je ocena napake korena iz povprečja kvadratov razlike opazovanega in napovedanega odziva (ang. **Root Mean Square Error of Estimation**). Visoka ocena napake nakazuje na slabše prileganje modela. Vrednost RMSEcv je RMSEE napaka iz navzkrižne validacije (ang. **Root Mean Square Error from cross-validation**) in je merilo napovedne sposobnosti modela (61).



Slika 25: Graf opazovanega v odvisnosti od napovedanega odziva Y za hitrost sproščanja ZU v 45. minuti z barvno oznako serij glede na viskoznost κ -karagenana.

Iz podatkov meritev viskoznosti κ -karagenana smo identificirali skupino serij s podobnim odzivom (Slika 25). Serije z najvišjimi viskoznostmi (na zgornjem grafu opazovanega in napovedanega odziva označene z rdečo) imajo upočasnjeno sproščanje modelne ZU v 45. minuti. Pri teh serijah smo potrdili negativen vpliv fizične prepreke visoke viskoznosti κ -karagenena na sproščanje ZU. Izjeme so serije šifer: DG9553, DG9562, FA1016, BW2722 in FA1016.

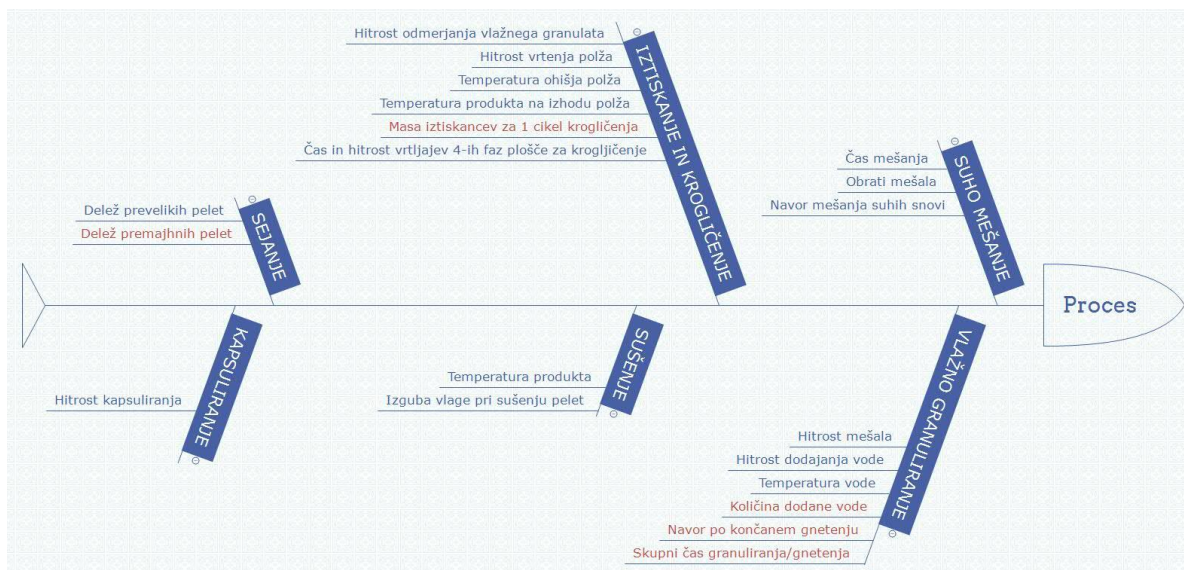
4.4. Uporaba MVDA modela v okolju QbD

Zagotovitev kakovosti med procesom izdelave zahteva prepoznavo parametrov s kritičnim pomenom na lastnost končnega izdelka, ki jih v QbD pristopu proizvodnje definiramo kot (41):

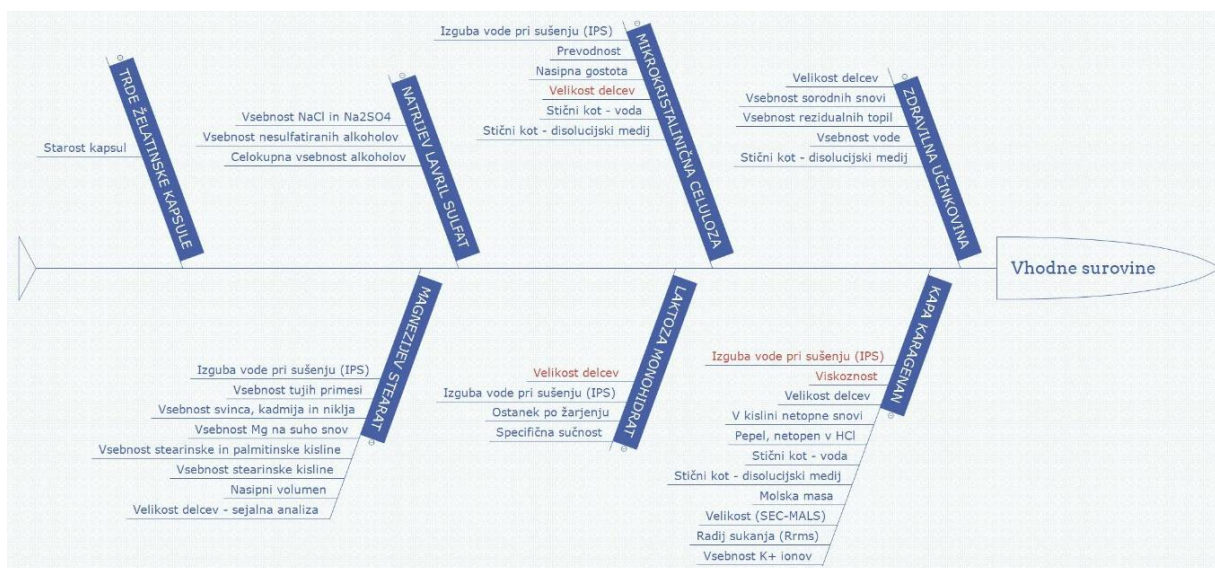
- kritične procesne parametre ali **CPP** (ang. Critical Process Parametres)
- ter kritične lastnosti surovin ali **CMA** (ang. Critical Material Attributes).

CPP in CMA skupaj vplivata na kritično lastnost kakovosti produkta ali **CQA** (ang. Critical Quality Attributes). Implementiranje MVDA modela v okolje QbD nam omogoča identifikacijo procesnih in formulacijskih parametrov s pozitivnim oz. negativnim vplivom

na odziv, kot potencialne CPP in CMA, ki vplivajo na CQA - kritično lastnost pelet sproščanja modelne ZU v 45. minuti. Definirani CPP in CMA modela so z rdeče označeni na slikah 26 in 27.



Slika 26: Prikaz kritičnih procesnih parametrov (CPP), ki smo jih določili z MVDA modelom (označeni rdeče).



Slika 27: Prikaz kritičnih lastnosti sestavin (CMA), ki smo jih določili z MVDA modelom (označeni rdeče).

Kot vidimo iz zadnjih dveh ribjih diagramov in ostalih grafičnih interpretacij MVDA modela, naše meritve hitrosti pronicanja tekočega medija v pomožni snovi (κ -karagenan in MCC) ter ZU, model ni prepoznal kot kritične parametre z vplivom na hitrost sproščanja

modelne ZU. Razlog bi se lahko nahajal v ročnem stiskanju površinsko različnih ploščic pod vplivom človeške napake, kar prinaša manjšo ponovljivost meritev, ki bi jih sicer imele ploščice/tablete enakomerno gladkih površin, stisnjene s kalibrirano, avtomatizirano tabletirko. Iz navedenega argumenta bi bile dodatne študije močljivosti koristne za izboljšanje natančnosti ter točnosti modela.

5. SKLEP

Multivariatni model, ki smo ga razvili v magistrski nalogi, je produkt 117 spremenljivk, pridobljenih iz procesa izdelave pelet (tehnologija iztiskanja in krogličanja) ter specifikacijskih parametrov vstopajočih surovin. Le-te zajemajo tudi naše eksperimentalne meritve hitrosti pronicanja tekočega medija v trdno snov κ -karagenana, mikrokristalne celuloze in modelne ZU. Preučevane procesne in formulacijske parametre (neodvisne spremenljivke x) smo s statističnim programom SIMCA P+ 14.0 ovrednotili glede na doprinos h kritični lastnosti sproščanja modelne ZU iz pelet (odvisna spremenljivka y – odziv). Ugotovili smo, da parametri, ki vplivajo pozitivno oz. pospešujejo hitrost sproščanja ZU v 45. minuti so:

- velikost delcev MCC (formulacijski parameter)
- vsebnost vlage κ -karagenana (formulacijski parameter)
- masa iztiskanca v napravi za krogličanje (procesni parameter)
- delež premajhnih pelet (procesni parameter)
- ter navor med vlažnim granuliranjem (procesni parameter)

Za parametre, ki vplivajo negativno oz. upočasnijo hitrost sproščanja ZU v 45. minuti, so se izkazali naslednji:

- velikost delcev laktoze (formulacijski parameter)
- čas granulacije (procesni parameter)
- viskoznost κ -karagenana (formulacijski parameter)
- in količina dodane vode med granuliranjem (procesni parameter)

Naštete parametre smo v sklopu QbD razvoja farmacevtskih izdelkov definirali kot kritične procesne parametre (CPP) in kritične lastnosti surovin (CMA), ki potencialno vplivajo na kritično lastnost kakovosti produkta (CQA pelet). Iz končnih v rezultatov prileganja (R^2) in napovedne sposobnosti (Q^2) modela lahko povzamemo, da gre za soliden model, katerega kakovost bi z dodatnimi preiskavami procesa izdelave in/ali fizikalno-kemijskih lastnosti vhodnih surovin morda izboljšali.

6. LITERATURA

- 1) Majumbar S: Multiparticulate Drug Delivery Systems for Controlled Release. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2008; (3): 1067-1075.
- 2) Vikash K, Kumar MS, Vikas LA, Ranjit S: Multiple unit dosage form - pellet and pelletization techniques: an overview. *International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy* 2011; 2(1): 121-125.
- 3) Zaman M, Saeed-ul-Hassan S, Sarfraz RM, Batool N, Qureshi MJ, Akram MA, Munir S, Danish Z: Pellets and pelletization: emerging trends in the pharma industry. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research* 2016; 73(6): 1415-1425.
- 4) Yadav N, Verma A: Pharmaceutical Pellets: A Versatile Carrier for Oral Controlled Delivery of Drugs. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research* 2016; 50(3): 146-160.
- 5) Ilić I, Keroč J: Tabletiranje obloženih pelet – večnotne farmacevtske oblike. *Farmaceutski vestnik* 2009; 60: 271-278.
- 6) Sirisha K VR, Vijaya Sri K, Suresh K, Kamalakar Reddy G, Devanna N: A review of pellets and pelletization process - a multiparticulate drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2013; 4(6): 2145-2158.
- 7) Sinha VR, Agrawal MK, Kumria R: Influence of Formulation and Excipient Variables on the Pellet Properties Prepared by Extrusion Spheronization. *Current Drug Delivery* 2005; 2(1): 1-8.
- 8) Swabrick J: *Encyclopedia of pharmaceutical Technology*, 3. izdaja, Informa Healthcare USA, Inc., New York, 2007: 960-2659.
- 9) Muley S, Nandgude T, Poddar S: Extrusion–spheronization a promising pelletization technique: In-depth review. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2016; 2: 684-699.

- 10) Aulton ME: *Pharmaceutics - The science of dosage form design*, 2. izdaja, Churchill Livingstone, Edinburgh ; New York 2002: 375-376.
- 11) Lau CLS, Yu Q, Lister VY, Rough SL, Wilson DI, Zhang M: The evolution of pellet size and shape during spheronisation of an extruded microcrystalline cellulose past. *Chemical Engineering Research and Design* 2014; 1477: 1-12.
- 12) Ardizzone S, Dioguardi Fs, Mussini T, Mussini Pr, Rondinini S, Vercelli B, Vertova A: Microcrystalline cellulose powders: structure, surface features and water sorption capability. *Cellulose* 1999; 6: 57–69.
- 13) Hamdard J, Nagar H: Microcrystalline Cellulose as a Versatile Excipient in Drug Research. *Journal of Young Pharmacists* 2009; 1: 6-12.
- 14) Luukkonen P, Maloney T, Rantanen J, Paulapuro H, Yliruusi J: Microcrystalline Cellulose-Water Interaction - A Novel Approach Using Thermoporosimetry. *Pharmaceutical Research* 2001; 18(11): 1562-1569.
- 15) Thoorens G, Krier F, Leclercq B, Carlin B, Evrard B: Microcrystalline cellulose, a direct compression binder in a quality by design environment - A review. *International Journal of Pharmaceutics* 2014; 473: 64-72.
- 16) Dukic´-Ott A, Thommes M, Remon JP, Kleinebudde P, Vervaet C: Production of pellets via extrusion–spheronisation without the incorporation of microcrystalline cellulose: A critical review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2009; 71: 38-46.
- 17) Ek R, Kleinebudde P: Microcrystalline Cellulose as a Sponge as an Alternative Concept to the Crystallite-Gel Model for Extrusion and Spheronisation. *Pharmaceutical Research* 1998; 15(4): 509-512.

- 18) Kleinebudde P: The Crystallite-Gel-Model for Microcrystalline Cellulose in Wet-Granulation, Extrusion, and Spheronization. *Pharmaceutical Research* 1997; 14(6): 804-809.
- 19) Yu G, Guan H, Ioanoviciu AS, Sikkander SA, Thanawiroon C, Tobacman JK, Toida T, Linhardt RJ: Structural studies on κ -carrageenan derived oligosaccharides. *Carbohydrate Research* 2002; 337: 433-440.
- 20) Thommes M, Kleinebudde P: Use of κ -carrageenan as alternative pelletisation aid to microcrystalline cellulose in extrusion/spheronisation. I. Influence of type and fraction of filler. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2006; 63: 59-67.
- 21) Thommes M, Kleinebudde P: Use of κ -carrageenan as alternative pelletisation aid to microcrystalline cellulose in extrusion/spheronisation. II. Influence of drug and filler type. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2006; 68-75.
- 22) Bornhöft M, Thommes M, Kleinebudde P: Preliminary assessment of carrageenan as excipient for extrusion/spheronisation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2005; 59: 127-131.
- 23) Ghanama D, Hassanb I, Kleinebudde P: Compression behaviour of κ -carrageenan pellets. *International Journal of Pharmaceutics* 2010; 390: 117-127.
- 24) Thommes M, Kleinebudde P: The Behavior of Different Carrageenans in Pelletization by Extrusion/Spheronization. *Pharmaceutical Development and Technology* 2008; 13: 27-35.
- 25) Kara S, Tamerler C, Bermek H, Pekcan Ö: Cation effects on sol-gel and gel-sol phase transitions of κ -carrageenan-water system. *International Journal of Biological Macromolecules* 2003; 31: 177-185.
- 26) Li L, Ni R, Shao Y, Mao S: Carrageenan and its applications in drug delivery. *Carbohydrate Polymers* 2014; 103: 1-11.

- 27) <http://www.danisco.com/pharmaceuticals/pharmaceutical-products/viscarin-gelcarin-and-seaspen/> (dostopano: avgust 2018)
- 28) Swabrick B: *Multivariate Data Analysis for Dummies*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2012: 1-31.
- 29) Dempster AP: An Overview of Multivariate Data Analysis. *Journal of Multivariate Analysis* 1971; 1: 316-346.
- 30) Johnson RA, Wichern D: *Multivariate Analysis*. *Statistics Reference Online* 2014: 1-20.
- 31) Hair Jr. JF, Black WC, Babin BJ, Anderson RE: *Multivariate Data Analysis – Pearson New International Edition*, 7. izdaja, Pearson Education Limited, Harlow, 2014: 3-4.
- 32) Ferreira AP, Tobyn M: Multivariate analysis in the pharmaceutical industry: enabling process understanding and improvement in the PAT and QbD era. *Pharmaceutical Development and Technology* 2015; 20(5): 513-527.
- 33) Wehrens R: *Chemometrics with R - Multivariate Data Analysis in the Natural Sciences and Life Sciences*, Springer, Verlag ; Berlin ; Heidelberg, 2011: 13-184.
- 34) Rajalahti T, Kvalheim OM: Multivariate data analysis in pharmaceuticals: A tutorial review. *International Journal of Pharmaceutics* 2011; 417 280-290.
- 35) Gabrielsson J, Lindberg N-O, Lundstedt T: Multivariate methods in pharmaceutical applications. *Journal of Chemometrics* 2002; 16: 141-160.
- 36) Lindberg N-O, Lundstedt T: Application of Multivariate Analysis in Pharmaceutical Development Work. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 1995; 21(9): 987-1007.

- 37) <https://learnche.org/pid/latent-variable-modelling/principal-component-analysis/interpreting-score-plots-and-loading-plots> (dostopano avgust 2018)
- 38) Pund S, Joshi A, Vasu K, Nivsarkar M, Shishoo C: Multivariate optimization of formulation and process variables influencing physico-mechanical characteristics of site-specific release isoniazid pellets. *International Journal of Pharmaceutics* 2010; 388: 64-72.
- 39) Wold S, Sjöström M, Eriksson L: PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2001; 58: 109-130.
- 40) Wold S, Kettaneh N, Tjessem K: Hierarchical Multiblock PLS and PC Models for Easier Model Interpretation and as An Alternative to Variable Selection. *Journal of Chemometrics* 1996; 10: 463-482.
- 41) Wang J, Kan S, Chen T, Liu J: Application of quality by design (QbD) to formulation and processing of naproxen pellets by extrusion – spheronization. *Pharmaceutical Development and Technology* 2015; 20(2): 246-256.
- 42) Vehovec T, Gartner A, Planinšek O, Obreza A: Influence of different types of commercially available microcrystalline cellulose on degradation of perindopril erbumine and enalapril maleate in binary mixtures. *Acta Pharmaceutica* 2012; 62: 515-528.
- 43) Bogataj M, Mrhar A, Kerec Kos M, Trontelj J, Vovk T, Pišlar M: *Biofarmacija s farmakokinetiko – Učbenik*, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2013: 6.
- 44) http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/FT/Fizikalna_farmacija/3_VAJA_FIFA_2009.pdf (dostopano: avgust 2018)
- 45) Bracco G, Holst B: *Surface Science Techniques*, Springer, Verlag ; Berlin ; Heidelberg, 2013: 4-5.

- 46) <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Wetting.svg> (dostopano: avgust 2018)
- 47) Kwok DY, Gietzelt T, Grundke K, Jacobasch H-J, Neumann AW: Contact Angle Measurements and Contact Angle Interpretation. 1. Contact Angle Measurements by Axisymmetric Drop Shape Analysis and a Goniometer Sessile Drop Technique. *Langmuir* 1997; 13(10): 2880-2894.
- 48) KRÜSS GmbH: DSA3 - Software for Drop Shape Analysis (Manual), V1.72-02, KRÜSS GmbH, Hamburg, 2009: 64-136.
- 49) Buckton G: Assessment of the wettability of pharmaceutical powders. *Journal of Adhesion Science and Technology* 1993; 7(3): 205-219.
- 50) https://www.kruss-scientific.com/fileadmin/user_upload/website/brochures/kruss-bro-dsa100-en.pdf (dostopano: avgust 2018)
- 51) http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/FT/Oprema/Merilnik_sticnega_kota.pdf (dostopano: avgust 2018)
- 52) Sakr WF, Ibrahim MA, Alanazi FK, Sakr AA: Upgrading wet granulation monitoring from hand squeeze test to mixing torque rheometry. *Saudi Pharmaceutical Journal* 2012; 20: 9-19.
- 53) Schmidt C, Peter K: Influence of the Granulation Step on Pellets Prepared by Extrusion/Spheronization. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 1999; 47(3): 405-412.
- 54) Khadka P, Ro J, Kim H, Kim I, Kim JT, Kim H, Cho JM, Yun G, Lee J: Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2014; 9: 304-316.
- 55) Gandhi R, Kaul CL, Panchagnula R: Extrusion and spheronization in the development of oral controlled-release dosage forms. *Pharmaceutical Science & Technology Today* 1999; 2(4): 160-170

- 56) Lustig-Gustafsson C, Johal HK, Podczek F, Newton JM: The influence of water content and drug solubility on the formulation of pellets by extrusion and spheronisation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 1999; 8: 147-152.
- 57) <http://techceuticals.com/wp-content/uploads/2016/07/Article-The-Granulation-Process.pdf> (dostopano: september 2018)
- 58) Szakonyi G, Zelkó R: The effect of water on the solid state characteristics of pharmaceutical excipients: Molecular mechanisms, measurement techniques, and quality aspects of final dosage form. *International Journal of Pharmaceutical Investigation* 2012; 2(1): 18-25.
- 59) Tukaram BN, Rajagopalan IV, Shartchandra PSI: The Effects of Lactose, Microcrystalline Cellulose and Dicalcium Phosphate on Swelling and Erosion of Compressed HPMC Matrix Tablets: Texture Analyzer. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 2010; 9(4): 349-358
- 60) Cheong LWS, Heng PWS, Wong LF: Relationship Between Polymer Viscosity and Drug Release from a Matrix System. *Pharmaceutical Research* 1992; 9(11): 1510-1514.
- 61) <http://131.130.57.230/clarotest190/claroline/backends/download.php?url=L1N0YXQvU0lNQ0EvVXNlciBHdWlkZSB0byBTSU1DQSAxMy5wZGY%3D&cidReset=true&cidReq=300152WS13> (dostopano: september 2018)

Priloga I: Rezultati naklonov za κ -karagenan (disolucijski medij)

KONTROLNA ŠTEVILKA VZORCA	k	SD	RSD (%)
318981	-4,76	0,46	9,69
30194203	-7,05	0,34	4,80
30308336	-10,32	1,54	14,91
30312189	-10,38	1,16	11,15
30489294	-6,91	0,63	9,09
30560790	-3,09	0,09	3,04
30585345	-13,09	2,25	17,16
30591417	-11,30	0,74	6,51
30830199	-7,51	1,01	13,44
30897971	-2,33	0,60	25,62
30998205	-5,06	0,24	4,70
31037407	-35,10	2,44	6,96
31046908	-7,03	6,89	98,08
31089978	-24,36	10,38	42,58
31100566	-5,06	1,30	25,69
31274451	-8,29	0,98	11,87
31874450	-9,25	2,22	23,99

Priloga II: Rezultati naklonov za MCC (disolucijski medij)

KONTROLNA ŠTEVILKA VZORCA	k	SD	RSD (%)
10944	-12,89	3,39	26,29
3073418	-10,98	1,07	9,73
30167802	-13,93	0,53	3,77
30297233	-6,69	0,93	13,89
30453420	-9,80	2,12	21,64
30597171	-13,28	0,48	3,58
30737418	-14,59	0,30	2,03
30749587	-14,44	0,91	6,27
30768532	-14,19	1,03	7,23
30768722	-13,64	0,84	6,13
30792852	-16,92	1,74	10,30
30813468	-18,55	0,77	4,18
30817618	-15,71	2,08	13,23
30827810	-16,63	0,82	4,95
30846595	-15,11	1,73	11,43
30895074	-14,22	0,47	3,34
30917745	-12,31	1,32	10,74
30959345	-11,41	0,84	7,33
30982886	-12,57	0,89	7,11
31027489	-13,31	1,18	8,90
31045701	-15,18	0,68	4,46
31054029	-15,04	0,94	6,28
31134809	-8,64	0,55	6,32
31302527	-9,44	0,19	1,97

Priloga III: Rezultati naklonov za modelno ZU (disolucijski medij)

KONTROLNA ŠTEVILKA VZORCA	k	SD	RSD (%)
B220079	-10,66	4,36	40,86
B220080	-14,22	2,95	20,74
B220081	-7,85	1,81	23,06
B220082	-8,50	1,23	14,42
B224840	-7,01	2,53	36,15
B224841	-9,31	0,45	4,80
B235503	-12,23	5,39	44,09
B235504	-3,92	0,69	17,52
B235505	-12,07	0,62	5,14
B251992	-5,25	1,45	27,59
B268859	-8,28	2,16	26,10
B268860	-6,04	1,89	31,23
B268861	-15,53	1,25	8,03
B271342	-13,43	2,16	16,11
B271343	-7,03	1,53	21,82
B271344	-9,95	3,32	33,38
B271345	-12,07	2,21	18,32
B271346	-6,40	1,24	19,36
B271347	-6,91	2,02	29,21
B271348	-9,90	1,17	11,83
B272172	-8,37	0,94	11,18
B275147	-7,38	2,37	32,09
B275148	-5,75	2,34	40,71
B275149	-5,24	0,87	16,66
B275158	-14,14	4,17	29,48
B275159	-5,81	0,37	6,30
B275160	-7,27	2,77	38,02
B277935	-4,82	2,86	59,40
X00271507H	-7,57	0,69	9,11
X00271607H	-7,93	6,68	84,33

Opomba: Mertive z vodo na modelni ZU nismo vključili v model, ker se stični kot zaradi slabega močenja s časom praktično ni spreminjal.