

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ERIKA LOGAR

**VREDNOTENJE VPLIVA MATERIALNIH LASTNOSTI  
HIPROMELOZE NA SPROŠČANJE DOBRO TOPNE  
ZDRAVILNE UČINKOVINE**

**INFLUENCE OF HYPROMELLOSE MATERIAL PROPERTIES  
ON RELEASE OF HIGHLY SOLUBLE DRUG**

Ljubljana, 2018

Magistrsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani, na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, pod mentorstvom prof. dr. Odon Planinška, mag.farm.

### *Zahvala*

*Hvala mentorju prof. dr. Odonu Planinšku ter delovnemu mentorju Dejanu Lamešiču, mag. farm. za strokovno pomoč, nasvete in usmeritve pri opravljanju magistrskega dela.*

*Hvala tudi bližnjim za vso potrpežljivost v času nastajanja magistrske naloge.*

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Odon Planinška, mag.farm.

Erika Logar

### **Komisija za zagovor**

Predsednica diplomske komisije: izr. prof. dr. Mojca Lunder

Mentor: prof. dr. Odon Planinšek, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Matej Sova

# KAZALO VSEBINE

|                                                                  |     |
|------------------------------------------------------------------|-----|
| KAZALO VSEBINE.....                                              | i   |
| POVZETEK .....                                                   | iii |
| ABSTRACT .....                                                   | iv  |
| SEZNAM OKRAJŠAV .....                                            | v   |
| 1. UVOD .....                                                    | 1   |
| 1.1. Prirejeno sproščanje zdravilne učinkovine .....             | 1   |
| 1.2. Polimeri za dosego podaljšanega sproščanja.....             | 2   |
| 1.3. Hidrofilni ogrodni sistemi .....                            | 3   |
| 1.4. Hipromeloza .....                                           | 4   |
| 1.5. S funkcionalnostjo povezane lastnosti HPMC polimera .....   | 6   |
| 1.5.1 Molekulska masa HPMC.....                                  | 6   |
| 1.5.2 Stopnja substitucije.....                                  | 8   |
| 1.5.3 Velikost HPMC delcev.....                                  | 9   |
| 1.5.4 Vpliv učinkovine .....                                     | 10  |
| 1.5.5 Vpliv pomožnih snovi .....                                 | 10  |
| 1.6. Reologija .....                                             | 11  |
| 1.6.1. Reološko preučevanje viskoelastičnih lastnosti snovi..... | 13  |
| 1.6.2. Viskoelastične lastnosti tekočin .....                    | 13  |
| 1.7. Razvoj z vgrajeno kakovostjo (QbD).....                     | 16  |
| 2. NAMEN DELA.....                                               | 18  |
| 3. MATERIALI IN METODE DELA.....                                 | 19  |
| 3.1. Materiali .....                                             | 19  |
| 3.2. Aparature .....                                             | 22  |
| 3.3. Metode dela .....                                           | 23  |
| 3.3.1 Priprava zmesi za direktno tabletiranje .....              | 23  |
| 3.3.2 Izdelava tablet s tabletirko na udarec .....               | 23  |
| 3.3.3 Določanje prave gostote s helijevim piknometrom .....      | 24  |
| 3.3.4 Poroznost tablete .....                                    | 24  |
| 3.3.5 Priprava puferskega medija za sproščanje.....              | 25  |

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3.6 Testi sproščanja .....                                                     | 25 |
| 3.3.7 UV-VIS spektrometrija .....                                                | 25 |
| 3.3.8 Umeritvena premica .....                                                   | 25 |
| 3.3.9 Analiza vzorcev .....                                                      | 26 |
| 3.4.0 Izguba pri sušenju .....                                                   | 27 |
| 3.4.1 Priprava raztopin za proučevanje reoloških lastnosti .....                 | 28 |
| 3.4.2 Reologija .....                                                            | 28 |
| 3.4.3 Izračun faktorja podobnosti .....                                          | 29 |
| 4. REZULTATI IN RAZPRAVA .....                                                   | 30 |
| 4.1. Preliminarni testi .....                                                    | 30 |
| 4.2 Sproščanje učinkovine iz HPMC ogrodnih tablet .....                          | 34 |
| 4.2.1 Vpliv hitrosti vrtenja vesel na hitrost sproščanja učinkovine .....        | 35 |
| 4.2.2 Vpliv viskoznosti na hitrost sproščanja dobro topne učinkovine .....       | 44 |
| 4.2.3 Vpliv stopnje substitucije na sproščanje dobro topne učinkovine .....      | 46 |
| 4.2.4 Vpliv velikosti delcev polimera na sproščanje dobro topne učinkovine ..... | 49 |
| 4.3. Reološke meritve .....                                                      | 52 |
| 4.3.1. Navidezna viskoznost HPMC raztopin .....                                  | 52 |
| 4.3.2. Viskoelastične lastnosti .....                                            | 59 |
| 4.3.2.1. Amplitudni testi .....                                                  | 59 |
| 4.3.2.2. Frekvenčni testi .....                                                  | 63 |
| 4.4. Povezava materialnih lastnosti s sproščanjem zdravilne učinkovine .....     | 65 |
| 5. SKLEP .....                                                                   | 69 |
| 6. LITERATURA .....                                                              | 71 |
| 7. PRILOGA .....                                                                 | 1  |

## POVZETEK

Hidroksipropilmetil celuloza (HPMC) je med najpogosteje uporabljenimi polimeri za izdelavo hidrofilnih ogrodnih tablet, s katerimi dosežemo podaljšano sproščanja zdravilne učinkovine. Proizvodnja HPMC poteka iz surovin naravnega izvora, zato je variabilnost fizikalno-kemijskih lastnosti med posameznimi serijami neizogibna. V povezavi z variabilnostjo različnih tipov HPMC tako med serijami istega proizvajalca, kot med serijami različnih proizvajalcev, se v fazi razvoja HPMC ogrodnih tablet pojavlja predvsem izziv, kako zagotoviti ponovljivo sproščanje ZU. Ena od pomembnih stopenj razvoja formulacije, ki poteka po načelu vgrajene kakovosti (ang. *Quality by design, QbD*) je tudi opredelitev kritičnih lastnosti pomožnih snovi, ki vplivajo na lastnosti končnega produkta.

V okviru magistrske naloge smo preučevali vpliv fizikalno-kemijskih lastnosti, kot so molska masa in z njo povezana viskoznost, stopnja hidroksipropoksi (HPO) substitucije in velikost delcev HPMC polimera na sproščanja dobro topne učinkovine propranololijevega klorida iz hidrofilnih ogrodnih tablet. Tablete smo pripravili z direktnim tabletiranjem, iz QbD HPMC vzorcev dveh različnih proizvajalcev (Dow in Shin Etsu), nazivne viskoznosti 4000 mPas in substitucijskega tipa 2208. Zanimalo nas je tudi, ali obstaja povezava med reološkimi lastnostmi HPMC raztopin in hitrostjo sproščanja učinkovine iz ogrodnih tablet.

Ugotovili smo, da zgolj na podlagi preučevanih fizikalno-kemijskih lastnosti QbD HPMC vzorcev in rezultatov reoloških meritev, ne moremo sklepati na hitrost sproščanja ZU iz pripravljenih HPMC tablet. V primeru navidezne viskoznosti in točke prekrivanja nismo našli korelacije s hitrostjo sproščanja učinkovine. Rahel trend smo opazili le v primeru stopnje substitucije (% HPO) in deleža sproščene ZU. Ta nakazuje na to, da nižji kot je % HPO skupin, hitreje je sproščanje ZU.

Za postavitev modela, ki bi uspešno napovedal hitrost sproščanja ZU na podlagi različnih fizikalno-kemijskih lastnosti, bi bilo smiselno izmeriti še nekatere druge parametre uporabljenih HPMC vzorcev in ovrednotiti njihov vpliv na sproščanje dobro topne učinkovine.

## ABSTRACT

Hydroxypropylmethyl cellulose (HPMC) is one of the most commonly used polymers for the production of hydrophilic matrix tablets to achieve a prolonged drug release. HPMC is produced from natural raw materials, therefore the variability of physicochemical properties between individual series is inevitable.

Because of HPMC variability, between the batches of the same manufacturer and between the batches of different manufacturers, there is a challenge how to provide a repeatable drug release. One of the most important aspects in the development of tablet formulation is the definition of the critical properties of excipients that have impact on the final product characteristics.

The aim of the master's thesis was to study of the influence of physicochemical properties, (molar mass, viscosity, the degree of hydroxypropyl substitution, and the particle size) on the soluble drug release of propranolol chloride from hydrophilic matrix tablets.

Tablets were prepared by direct compression using QbD HPMC samples of two different manufacturers (Dow and Shin Etsu), with nominal viscosity of 4000 mPas and a 2208 substitution type. We also studied a connection between the rheological properties of HPMC solutions and the rate of drug release from the matrix tablets.

From the studied physicochemical properties of QbD HPMC samples and the results of rheological measurements we cannot conclude about the drug release rates from prepared HPMC tablets. We found no correlation of drug release rates with the apparent viscosity and cross points. A slight trend was observed only in the case of the degree of hydroxypropyl substitution (% HPO) as a function of drug release rate. This indicates that lower % HPO substitution increase the drug release from the matrix tablet.

## SEZNAM OKRAJŠAV

|                      |                                                            |
|----------------------|------------------------------------------------------------|
| <b>f<sub>2</sub></b> | faktor podobnosti                                          |
| <b>FO</b>            | farmacevtska oblika                                        |
| <b>G'</b>            | elastični modul [Pa]                                       |
| <b>G''</b>           | viskozni modul [Pa]                                        |
| <b>HPMC</b>          | hidroksipropilmetil celuloza, hipromeloza                  |
| <b>HPO</b>           | hidroksipropoksi skupina                                   |
| <b>LVO</b>           | linearno viskoelastično območje                            |
| <b>MeO</b>           | metoksi skupina                                            |
| <b>QbD</b>           | načrtovanje z vgrajeno kakovostjo (ang. Quality by Design) |
| <b>rpm</b>           | število obratov na minuto (revolutions per minute)         |
| <b>ZU</b>            | zdravilna učinkovina                                       |

# 1. UVOD

## 1.1. Prirejeno sproščanje zdravilne učinkovine

Skozi zgodovino lahko zasledimo razvoj različnih farmacevtskih oblik, s pomočjo katerih dosegamo želene terapevtske učinke. Med vsemi farmacevtskimi oblikami se najpogosteje zastopane trdne farmacevtske oblike, predvsem tablete in trdne želatinaste kapsule, namenjene peroralni aplikaciji. Peroralna aplikacija je zaradi svoje neinvazivnosti, dobre sprejemljivosti in absorpcije učinkovin v gastrointestinalnem traktu najprimernejši način jemanja zdravil. Hkrati imajo trdne FO številne prednosti, saj veljajo za stabilnejše v primerjavi z ostalimi FO in z vidika proizvajalcev, cenovno ugodne farmacevtske oblike (1).

Večina tablet in kapsul, namenjenih *per os* aplikaciji, spada v skupino FO s takojšnjim sproščanjem, za katere velja, da kmalu po aplikaciji sprostijo celotni odmerek zdravilne učinkovine. V plazemskih profilih se to odraža v visokih začetnih plazemskih koncentracijah, ki jim sledi nagel padec, kar lahko vodi do neželenih stranskih učinkov.

Zdravilne učinkovine lahko vgradimo tudi v sisteme s prirejenim sproščanjem. S tem dosežemo nadzorovano hitrost in mesto sproščanja ter vzdrževanje plazemskih koncentracij skozi daljše časovno obdobje. Delimo jih na:

- FO s podaljšanim sproščanjem (ang. prolonged release dosage forms)
- FO z zakasnelim sproščanjem (ang. delayed release dosage forms / enteric coated)
- FO s pulzirajočim sproščanjem (ang. pulsatile release dosage forms)

Prednost prirejenega sproščanja pred konvencionalnim takojšnjim sproščanjem je predvsem v sposobnosti vzdrževanja optimalnih plazemskih koncentracij in daljšem terapevtskem učinku. Temu sledi manj neželenih učinkov, povezanih s plazemsko koncentracijo, in manjše število potrebnih odmerjanj, kar je z vidika bolnika ugodnejše. Kljub številnim prednostim, pa se moramo zavedati tudi potencialnih težav, ki lahko nastanejo v primeru, ko je FO poškodovana, kar lahko vodi do takojšnje sprostitve celotnega odmerka zdravilne učinkovine



(ang. *dose-dumping*) in prekoračitve kritične plazemske koncentracije. Slabost pa je tudi višja cena in zahtevnost same proizvodnje (2) (3).

## **1.2. Polimeri za doseg podaljšanega sproščanja**

Za doseg prirejenega sproščanja, po vnaprej predvidenem mehanizmu, je bistvenega pomena pravilno zasnovana formulacija. Pri tem ima poleg tehnološkega postopka in ustrezne FO pomembno vlogo tudi pravilna izbira pomožnih snovi. Med pomožnimi snovmi po svoji funkcionalnosti izstopajo polimeri. Polimeri so makromolekule, sestavljene iz ponavljajočih se monomernih enot, ki se preko reakcijskih mehanizmov polimerizacije povezujejo med seboj in tvorijo kompleksne strukture, ki se v prostoru orientirajo na različne načine. Od ureditve makromolekul v prostoru so odvisne tako termične, fizikalne kot tudi mehanske lastnosti polimerov, pomemben vpliv na lastnosti pa ima tudi molekulska masa polimera ter inter- in intramolekularne povezave (4).

Farmacevtski polimeri imajo širok spekter uporabe. Na začetku je bila njihova uporaba omejena predvsem na vlogo polnila, veziva in razgrajevala. Z razvojem naprednejših FO, pa so jih začeli uporabljati za zaščito učinkovin pred vplivi iz okolja (svetloba, vlaga), za prikrivanje neprijetnega okusa, tarčno dostavo učinkovin, izboljšanje stabilnosti in biološke uporabnosti učinkovin ter predvsem za oblikovanje FO s prirejenim sproščanjem (4).

Dostavne sisteme, s katerimi dosežemo prirejeno sproščanje ZU, delimo na (5):

- monolitni ogrodni sistemi: hidrofilni ogrodni sistemi in inertni ali netopni ogrodni sistemi
- rezervoarni sistemi: difuzijsko/erozijsko nadzorovani in osmotsko nadzorovani sistemi

Poleg ustreznega izbora pomožnih snovi, pa moramo pri razvoju FO s prirejenim sproščanjem upoštevati tudi:

- fizikalno-kemijske lastnosti učinkovine,
- odmerek, stabilnost in topnost učinkovine v različnih področjih gastrointestinalnega trakta,
- mesto, način ter obseg absorpcije,

- farmakokinetične lastnosti vgrajene učinkovine (metabolizem, distribucija in eliminacija) (5)

### 1.3. Hidrofilni ogrodni sistemi

Hidrofilne ogrodne tablete so med najpogostejše proizvedenimi in uporabljenimi FO za podaljšano sproščanje, v katerih je ZU dispergirana v topnem polimernem nosilcu. Izdelujemo jih lahko z direktnim tabletiranjem, v nekaterih primerih pa izvedemo vmesno stopnjo granuliranja z namenom izboljšanja stisljivosti in pretočnih lastnosti tabletirne zmesi, ter izboljšanja enakomernosti vsebnosti (3).

Najpogostejše uporabljamo polysintezne polimere, med katere sodijo celulozni derivati, ki v prisotnosti vode gelirajo: metilceluloza (MC), hidroksipropilmetilceluloza (HPMC), natrijeva karboksilmetilceluloza (Na CMC) in hidroksipropilceluloza (HPC). Vedno večja pozornost pa je namenjena tudi preučevanju in uporabi polimerov naravnega izvora. Med te sodijo polisaharidi: alginat, karagenani, dekstran, gelan, gvarjev gumi, puluan in drugi (3) (6).

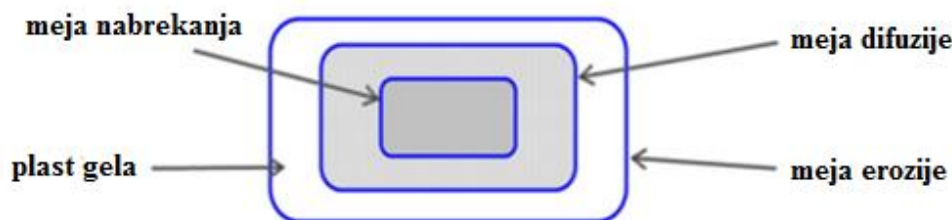
Za izdelavo hidrofilnih ogrodnih tablet uporabljamo polimere, ki imajo sposobnost vezave vode in v stiku z njo ne razpadejo, ampak nabrekajo. Hidratacija in relaksacija polimernih verig na površini polimernega ogrodja vodi do znižanja temperature steklastega prehoda  $T_g$  in do tvorbe gela, ki nadzoruje transport vode v ogrodje tablete in proces sproščanja učinkovine. Polimer tako prehaja iz trdnega v zmehčano elastično stanje. Več vode kot sprejme sistem, debelejši je gelski sloj in počasnejše je sproščanje učinkovine. Sam mehanizem sproščanja učinkovine iz hidrofilnega ogrodnega sistema je tako kombinacija hidratacije in nabrekanja polimernega ogrodja, raztapljanja in difuzije raztopljene ZU iz ogrodja tablete v okoliški medij. Sočasno s procesom tvorbe gela, pa se polimerne verige, ki so najdlje izpostavljene vodnemu mediju, popolnoma hidratirajo in raztapljajo, kar vodi do površinske erozije in izgube konsistence polimernega ogrodja. Vsi ti procesi vplivajo na nastanek mej, kar prikazuje Slika 1(7) (8).

**Penetracijska meja:** Je meja med suhim jedrom tablete in hidratiranim polimerom v steklastem stanju. Obe področji vsebujeta neraztopljeno učinkovino.

**Meja nabrekanja:** Je ločnica med polimerom v steklastem stanju in polimerom v elastičnem stanju. Voda, ki vstopa v sistem ima vlogo mehčala, kar pomeni, da zniža temperaturo steklastega prehoda  $T_g$ . Ogrodje tablete se hidratira in tvori gelski sloj. Pri tem je bistvena hitrost tvorbe in čvrstost nastalega gela. Ta je odvisna od koncentracije in molske mase polimera kot tudi od kemijske strukture polimera v zmehčanem stanju.

**Difuzijska meja:** Nahaja se med mejo nabrekanja in mejo erozije. Znotraj geliranega polimera ločuje področje z neraztopljeno učinkovino od področja z raztopljeno učinkovino.

**Meja erozije:** Ločuje ogrodje tablete od okoliškega medija (9) (7).

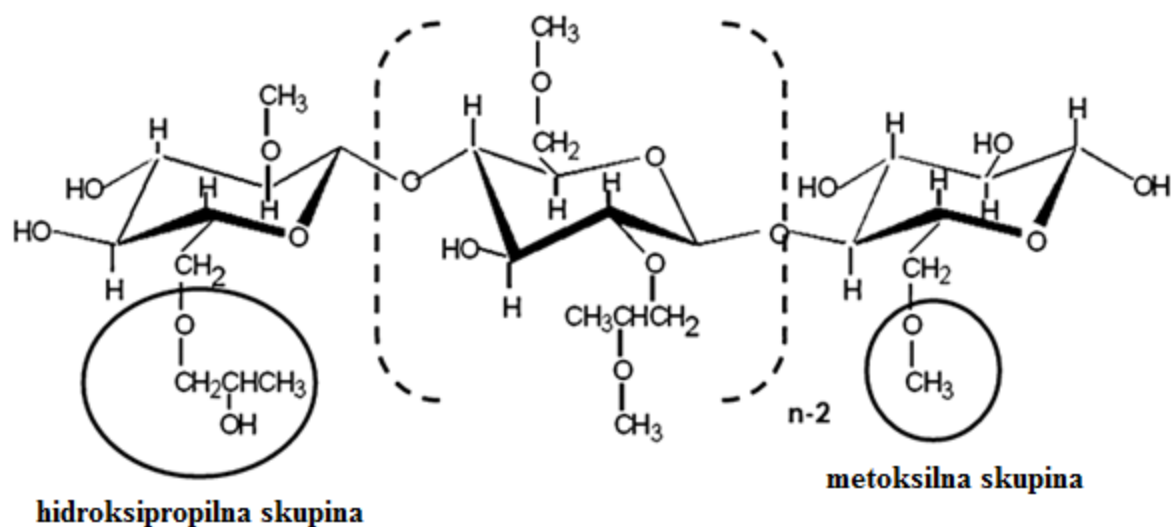


*Slika 1: Shematski prikaz omočenega hidrofilnega ogrodnega sistema. Prirejeno po (7).*

## 1.4. Hipromeloza

Hidroksipropilmetil celuloza ali hipromeloza je med najpogostejše uporabljene polimeri za izdelavo hidrofilnih ogrodnih tablet. Je delno O-metilirana in O-hidroksipropilirana celuloza, ki jo pridobivamo iz celulozne pulpe (Slika 2). Ni toksična, je brez vonja in okusa, kremno bele barve ter enostavna za uporabo. Zaradi svoje neionske narave omogoča pH neodvisno sproščanje učinkovine, hkrati pa je stabilna in primerna tako za proces direktnega tabletiranja kot tudi granulacije. Topna je v hladni vodi, s katero tvori viskozno koloidno raztopino. V vroči vodi, brezvodnem etanolu in etru je težko topna oz. netopna. Fizikalno kemijske lastnosti hipromeloze so močno povezane z molsko maso in s stopnjo substitucije oz. razmerjem med metoksi in hidroksipropoksi substituenti. Razmerje med obema substituentama opiše štiri mestna številka – npr. HPMC 2208, pri kateri prvi dve številki HPMC 2208 podata povprečni

delež metoksi skupine ( $\text{OCH}_3$ ), zadnji dve pa HPMC 2208 povprečni delež hidroksipropoksi skupine ( $\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ ). Tako za stopnjo substitucije kot tudi za viskoznost so farmakopejsko določene specifikacijske meje znotraj katerih HPMC razvrščamo v posamezne razrede (10) (5). Preglednica I prikazuje različne substitucijske tipe HPMC polimerov, s pripadajočo zgornjo in spodnjo specifikacijsko vrednostjo.



**Slika 2:** Strukturna formula hipromeloze. Prirejeno po (8).

**Preglednica I:** Različni substitucijski tipi HPMC polimera s pripadajočimi mejnimi specifikacijskimi vrednostmi (11).

| Tip HPMC substitucije<br>(USP, JP in Ph. Eur) | Delež metoksilne skupine<br>[%] |      | Delež hidroksipropilne skupine<br>[%] |      |
|-----------------------------------------------|---------------------------------|------|---------------------------------------|------|
|                                               | min.                            | max. | min.                                  | max. |
| <b>1828</b>                                   | 16,5                            | 20,0 | 23,0                                  | 32,0 |
| <b>2208</b>                                   | 19,0                            | 24,0 | 4,0                                   | 12,0 |
| <b>2906</b>                                   | 27,0                            | 30,0 | 4,0                                   | 7,5  |
| <b>2910</b>                                   | 29,0                            | 30,0 | 7,0                                   | 12,0 |

## **1.5. S funkcionalnostjo povezane lastnosti HPMC polimera**

Pomožne snovi so definirane kot farmakološko inertne snovi, kljub temu pa veljajo za nepogrešljiv del vsake formulacije. Predstavljajo lahko majhen ali večinski delež celotne mase zdravila, kar poslednično pomeni velik vpliv na končne lastnosti farmacevtskega izdelka. Pridobivamo jih iz različnih surovin ter z različnimi tehnološkimi postopki, kar je tudi razlog za pojav variabilnosti v fizikalno-kemijskih lastnostih pomožnih snovi. Tej variabilnosti se v celoti ni mogoče izogniti, lahko pa jo minimiziramo. Variabilnost pomožnih snovi ima vrsto vplivov na funkcionalnost in kakovost izdelane FO (12).

V primeru hipromeloze se medserijske razlike lahko kažejo predvsem v raznolikosti stopnje substitucije in polidisperznosti (molske mase). K temu prispeva različen vir izhodnih surovin, kot sta les in bombaž, naravna variabilnost molekulske mase celuloze, kot tudi sam proizvodni proces. Kljub temu, da proizvajalci z analiznimi testi zagotavljajo, da se določeni fizikalno-kemijski parametri posamezne serije hipromeloze nahajajo znotraj farmakopejsko postavljenih meja, je variabilnost še vedno prisotna tako med serijami istega proizvajalca, kot tudi med različnimi dobavitelji hipromeloze. Razlike se kažejo tudi v lastnostih povezanih z molekulsko maso in kemijsko sestavo materiala. Zato je poznavanje in ustrezen nadzor ključnih fizikalno-kemijskih parametrov, ki vplivajo na funkcionalnost končne FO, bistvenega pomena. Nekatere od teh lastnosti, so predstavljene v nadaljevanju (8) (12) (13).

### **1.5.1 Molekulska masa HPMC**

Molekulska masa polimera, pogosto posredno merjena tudi kot viskoznost polimerne raztopine, ima velik vpliv na sproščanje ZU iz hidrofilnih ogrodnih tablet. Zaradi samega proizvodnega procesa, lahko vsebuje serija polimera polimerne verige različnih dolžin (molekulskih mas), kar lahko privede do razlik v povprečni molski masi ali porazdelitvi molekulske mase. Zato polimernega materiala z različnimi polimernimi verigami ni mogoče opredeliti kot molekulo s specifično molekulsko maso, ampak je potrebno upoštevati številčno  $M_n$  in utežno  $M_w$  povprečje molekulskih mas. V primeru ko so polimerne verige podobnih

dolžin, sta vrednosti  $M_n$  in  $M_w$  ekvivalentni, v nasprotnem primeru, pa se vrednosti masnega povprečja odmikajo od številčnega povprečja molekulskih mas. Ta odmik opišemo s polidisperznim indeksom PD, ki nam poda informacijo o tem ali ima obravnavani polimer ozko ( $PD=1$ ) (monodisperzni sistem) ali široko ( $PD \gg 1$ ) (polidisperzni sistem) porazdelitev molekulskih mas (4) (14). Pomembnost poznavanja polidisperznega indeksa lahko razložimo na primeru, ko imamo na razpolago dve različni seriji enakega polimera z različno dolžino polimernih verig, vendar enakim številčnim povprečjem ( $M_n$ ) molekulskih mas. Kljub enaki vrednosti  $M_n$ , pa se seriji izrazito razlikujeta v utežnem povprečju molekulskih mas ( $M_w$ ), kar posledično pomeni razliko v porazdelitvi molekulske mase. Zgolj na podlagi številčnega povprečja molekulskih mas ( $M_n$ ), bi lahko sklepali, da sta obe seriji polimera med seboj podobni in zamenljivi, kar pa se ob poznavanju  $M_w$  in PD izkaže za napačno sklepanje. V primeru, da sta oba polimera topna v vodi, se bo polimer s krajšimi verigami raztapljal hitreje, kar vodi tudi do razlik v sproščanju ZU (4).

Poleg tega, molekulska masa vpliva na debelino in hitrost nastanka gelskega sloja na površini ogrodne tablete, pomemben pa je tudi delež polimera v formulaciji. Z višanjem molekulske mase se namreč povečuje debelina in hitrost nastanka gela, hkrati pa polimer višje molekulske mase tvori močnejši gelski sloj, ki odločilno vpliva na erozijsko odpornost samega gela. Tekom nabrekanja je tako omejen prehod molekul vode skozi nastali gel, kar se kaže v upčasnjem sproščanju ZU iz ogrodja tablete (7) (15). Moč nastalega gela in stopnja nabrekanja hidrofilnega ogrodnega sistema pa sta odvisni tudi od kritične koncentracije polimera  $c_{krit}$  na stiku gel/raztopina. Kritična koncentracija polimera je namreč minimalna koncentracija, pri kateri polimerne verige, zaradi medsebojne povezanosti, prenesejo strižne sile, ki obdajajo gel ter preprečujejo njegovo raztapljanje (13). V primeru hipromeloze se je izkazalo, da višja molekulska masa izkazuje nižjo  $c_{krit}$ , višjo viskoznost raztopine ter posledično počasnejši profil sproščanja (16).

Ana Virden in sodelavci (13) so preučevali, kateri so kritični parametri HPMC polimera, ki vplivajo na sproščanje ZU iz hidrofilnih ogrodnih tablet. Tablete so izdelali iz štirih različnih serij hipromeloze s substitucijskim tipom 2208, 2906 in 2910 in primerljive molekulske mase. Kljub podobnim molekulskim masam, so bile razlike v hitrosti sproščanja polimera znatne, kar kaže na to, da molekulska masa ni edini faktor z vplivom na hitrost sproščanja.

### **1.5.2 Stopnja substitucije**

Osnova HPMC je celuloza, ki zaradi svoje kristalinične strukture ni topna v vodi. Sestavljena je iz glukoznih enot, povezanih z  $\beta(1-4)$  vezjo. Vsaka molekula glukoze vsebuje tri hidroksilne skupine, ki se razlikujejo po reaktivnosti. HPMC pridobivajo tako, da celulozna vlakna termično obdelajo z raztopino natrijevega hidroksida in na ta način prekinajo vodikove vezi, ki povezujejo posamezne celulozne verige med seboj. Z dodatkom klorometana in propilen oksida poteče na hidroksilnih skupinah proces etrifikacije, te skupine pa imajo zaradi prej omenjenih razlik različno sposobnost substituiranja (17).

Z uvajanjem hidrofobnih metoksi (MeO) in hidroksipropoksi (HPO) skupin na celulozno verigo, se poruši kristalinična struktura, kar se odraža v povečani topnosti. Hkrati pa s stopnjo substituiranosti narašča tudi hidrofobnost polimernih verig. Na področjih, substituiranih z višjim deležem MeO skupin, se pod vplivom povišane temperature vzpostavijo hidrofobne interakcije, kar vodi do nastanka reverzibilnega gela (18). Povišana temperatura pa ne vpliva zgolj na hidratacijo, ampak tudi na obarjanje molekul polimera. Temperatura, pri kateri se prepustnost svetlobe skozi raztopino polimera zmanjša na 50% oziroma 96% se imenuje točka zamotnitve (ang. *cloud point*, *CP*). Odvisna je tako od molekulske mase, kot tudi od hidrofilnosti polimera. Vpliv hidrofilnosti polimera na točko zamotnitve je v svojem delu preučevala Ana Viriden (13). Opazila je, da ne glede na razlike v hidrofilnosti MeO in HPO skupin, obe substituenti prispevata k večji celokupni hidrofobnosti HPMC polimera, kar se kaže v znižanju točke zamotnitve in nižji stopnji nabrekanja. Kljub temu, pa so MeO skupine izkazovale nekoliko večji doprinos k znižanju vrednosti CP.

Poleg stopnje substitucije ima velik vpliv na topnost polimera tudi razporeditev MeO in HPO substituent vzdolž HPMC verige. Viriden in sodelavci (18) so s postopkom encimske hidrolize preučevali kemijsko sestavo različnih serij hipromeloze enakega substitucijskega tipa (2208). Izkazalo se je, da so razlike v heterogenosti porazdelitve substituentov med posameznimi serijami velike in da so serije z bolj heterogeno razporeditvijo substituentov izkazovale počasnejše sproščanje ZU, hkrati pa večjo erozijsko odpornost. To predpisujejo predvsem amfifilnemu značaju heterogeno substituiranih verig, ki preko hidrofobnih interakcij tvorijo

gelu podobne strukture. Rezultat tega je višja viskoznost nastalega gela, kar posledično pomeni manjšo površinsko erozijo ogrodja tablete.

### **1.5.3 Velikost HPMC delcev**

Velikost delcev vpliva predvsem na hitrost tvorbe gelskega sloja in sicer bližje kot so si delci, hitreje se gel tvori. Manjši delci v primerjavi z večjimi nabrekajo hitreje, nastali koherentni gelski sloj pa upočasni sproščanje ZU. Razlik v hitrosti sproščanja ZU pa ni mogoče razložiti zgolj na podlagi velikosti delcev, ampak je potrebno upoštevati tudi delež polimera (19).

Heng in sodelavci (19) so opazili znatno povečanje hitrosti sproščanja ZU iz HPMC K15 ogrodnih tablet v primeru, ko je bila velikost delcev polimera  $> 113 \mu\text{m}$ . Opazili so tudi, da je vpliv velikosti delcev odvisen od koncentracije polimera v ogrodni tableti. In sicer se z višjo koncentracijo polimera vpliv velikosti delcev na sproščanje ZU zmanjšuje.

Odvisnost med velikostjo delcev in koncentracijo polimera pojasnjuje perkolacijska teorija. Ta v nasprotju s klasično teorijo predpostavlja, da je struktura sistema neznana in neskončna. Glavni namen perkolacijske teorije je določiti prag prekolacije. To je tisti delež HPMC polimera, za katerega obstaja verjetnost, da bo tvoril neskončno perkolacijsko gručo. Blizu perkolacijskega praga vsak sistem izkazuje kritično vedenje, saj že majhne spremembe pomembno vplivajo na lastnosti sistema. To se lahko kaže v spremembi mehanizma sproščanja ZU ali pa v modifikaciji strukture tablete. V primeru, ko je delež polimera nad pragom prekolacije, se tvori enakomerni gelski sloj in tako velikost delcev polimera nima izrazitega vpliva na sproščanje ZU. Nasprotno pa velja, ko je delež polimera pod perkolacijskim pragom in se tvori sistem z nehomogenim gelom, ki ne omogoča nadzorovanega sproščanja ZU. To pojasnjuje, da manjši kot je delež polimera v ogrodni tableti, večji je vpliv velikosti delcev na sproščanje ZU (20).



#### **1.5.4 Vpliv učinkovine**

Sproščanje dobro topnih učinkovin poteka predvsem z difuzijo raztopljenih molekul učinkovine skozi gelski sloj, medtem ko je sproščanje slabo topnih učinkovin nadzorovano pretežno z erozijo polimernega ogrodja, kar lahko pripišemo naslednjim razlogom. Slabo topne učinkovine so hidrofobnega značaja in znotraj hidrofilnega ogrodnega sistema tvorijo hidrofobna področja, ki zmanjšujejo prepletenost polimernih verig in posledično zmanjšujejo moč nastalega gela. Polimerno ogrodje tablete tako lažje erodira, kar narekuje tudi prevladujoči mehanizem sproščanja. Pri dobro topnih učinkovinah se zaradi povišanega osmotskega tlaka pospeši prehajanje vode v ogrodje tablete, kar posledično pomeni hitrejše nabrekanje polimera in tvorbo številnih mikroporov, ki pospešujejo sproščanje dobro topne učinkovine z mehanizmom difuzije (20).

Topnost učinkovine ima tako vpliv na hitrost, kot tudi na mehanizem sproščanja učinkovine, v študiji (21) pa so preučevali, ali morda vpliva tudi na perkolacijski prag polimera. V hidrofilne HPMC (K4M) ogrodne tablete so vgradili učinkovine, kot so acetaminofen, teofilin in ranitidinijev klorid. Kljub velikim razlikam v vodotopnosti učinkovin, so prišli do zaključkov, da je prag perkolacije HPMC, neodvisen od topnosti vgrajene učinkovine. Te ugotovitve kažejo na pomembnost poznavanja perkolacijskega praga pomožnih snovi že v fazi predformulacijskih študij, saj je na ta način mogoče racionalnejše oblikovanje hidrofilnih ogrodnih tablet po principu vgrajene kakovosti (ang. *Quality by Design, QbD*).

#### **1.5.5 Vpliv pomožnih snovi**

Z vključevanjem pomožnih snovi v hidrofilne ogrodne tablete, izboljšujemo pretočne lastnosti in stisljivost praškastih komponent, kar omogoča izdelavo tablet z ustreznimi fizikalnimi lastnostmi. Pri izbiri pomožnih snovi se moramo zavedati, da lahko s svojimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi vplivajo tudi na hitrost in mehanizem sproščanja ZU. Da bi raziskali te vplive, so Williams in sodelavci (22) oblikovali hidrofilne ogrodne tablete. Vsaka izmed njih je vsebovala lipofilno učinkovino alprazolam, HPMC (Methocel K4MP), magnezijev stearat, razlikovale pa so se v uporabljeni pomožni snovi. Kot primer dobro topnih pomožnih snovi so

uporabili laktozo monohidrat, saharozo in dekstrozo, predstavniki slabo topnih pomožnih snovi pa so bili dikalcijev fosfat dihidrat, brezvodni dikalcijev fosfat in kalcijev sulfat dihidrat.

V primeru slabo topnih pomožnih snovi sta bila hitrost sproščanja in količina sproščene učinkovine manjša, kot v primeru dobro topnih pomožnih snovi. Slednje so povečale permeabilnost gelskega sloja in hkrati poroznost tablete, kar je pripomoglo k hitrejši difuziji učinkovine in povečani eroziji ogrodja tablete. Z dvokomponentnim sistemom (laktoza monohidrat, dikalcijev fosfat dihidrat) in ustreznim m/m (%) razmerjem med komponentama so dosegli vmesen profil sproščanja, hkrati pa so ugotovili, da vrsta in delež pomožnih snovi v ogrodni tableti vplivata na hitrost sproščanja in obseg sproščene ZU (22).

## **1.6. Reologija**

Reologija je veda o tokovnem obnašanju in deformaciji materiala. Z njo lahko proučujemo mehanske lastnosti tekočin, poltrdnih in viskoelastičnih trdnih snovi. Reološke meritve se pogosto uporabljajo tudi v povezavi s polimeri, saj s poznavanjem njihovih reoloških lastnosti, lahko dobimo vpogled v samo strukturo polimera. Za grafično predstavitev tokovnega obnašanja sistemov, najpogosteje uporabimo tokovne krivulje, ki predstavljajo odvisnost strižne napetosti ( $\tau$ ) od strižne hitrosti ( $\gamma$ ) ali krivulje viskoznosti, ki predstavljajo odvisnost viskoznosti ( $\eta$ ) od strižne hitrosti ( $\gamma$ ) (23).

Glede na reološko obnašanje sistemov, jih v splošnem delimo na dve skupini:

### Newtonske ali idealne tekočine

Za te tekočine velja, da je njihova viskoznost konstantna in je lastnosti snovi. Odvisna je samo od tlaka in temperature, medtem ko smer, jakost in čas striga nanjo nimajo vpliva. Velika večina tekočin ima sicer lastnosti realnih tekočin, kljub temu, pa lahko pri določeni strižni hitrosti izkazujejo obnašanje idealne tekočine. Z višanjem temperature viskoznost idealnih tekočin pada, na spremembo temperature pa so bolj občutljive tekočine z višjo viskoznostjo (23).

### Nenewtonske ali realne tekočine

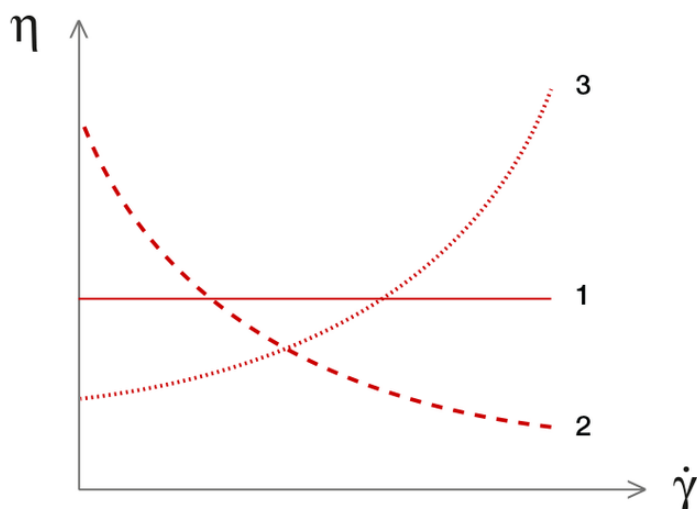
V nasprotju z idealnimi tekočinami, viskoznost realnih tekočin ni konstantna in je odvisna od smeri, jakosti in časa striga. Pod vplivom delovanja strižne sile prihaja do preurejanja notranje strukture tekočine oz. sistema, kar se kaže v spreminjanju viskoznosti. Od urejenosti notranje strukture je odvisen tudi odziv realnih tekočin. Na podlagi tega ločimo časovno in strižno odvisno obnašanje nenewtonskih tekočin (23).

- Časovno odvisno obnašanje tekočin

Viskoznost teh tekočin je odvisna tako od strižne sile kot tudi od časa delovanja striga. Glede na to, ali viskoznost tekočine pri določenih strižnih pogojih s časom delovanja striga pada ali narašča, ločimo tiksotropne in reopeksne sisteme (23).

- Strižno odvisno obnašanje tekočin

Kot že samo ime pove, je viskoznost teh tekočin odvisna od delovanja strižne sile. Izkazujejo lahko dilatantno, plastično ali psevdoplastično tokovno obnašanje. Pri dilatantnih sistemih gre za strižno odvisno naraščanje viskoznosti (ang. *shear thickening*), medtem ko pri psevdoplastičnih tekočinah viskoznost z naraščanjem strižne hitrosti pada (ang. *shear thinning*) (23).

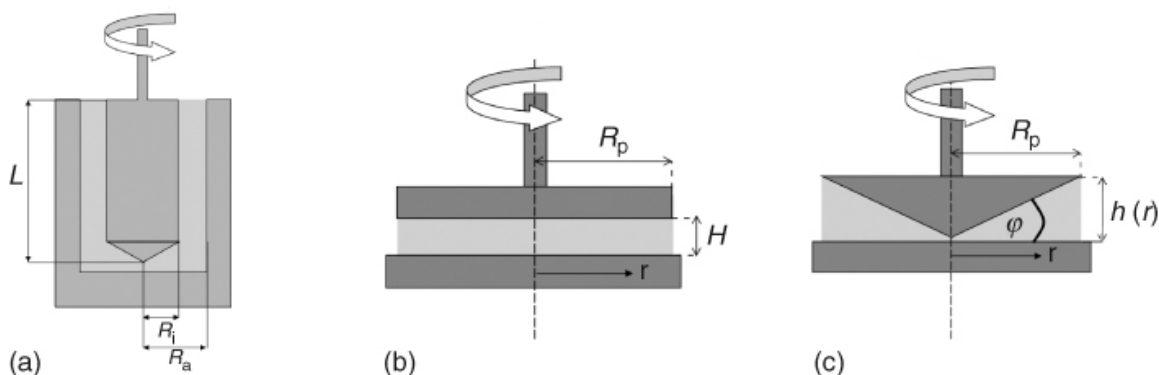


**Slika 3:** Viskozna krivulja za Newtonske (1), psevdoplastične (2) in dilatantne (3) materiale (24).

### 1.6.1. Reološko preučevanje viskoelastičnih lastnosti snovi

Reološko obnašanje tekočin analiziramo z različnimi inštrumenti. Kateri inštrument bomo uporabili, je odvisno od lastnosti testirane snovi ter od informacij, ki jih želimo z reološkim testiranjem pridobiti. Pri meritvah z absolutnimi inštrumenti, med katere sodijo rotacijski reometri in viskozimetri, vrednosti strižnih hitrosti oziroma napetosti izračunamo na podlagi merljivih in nastavljivih količin in geometrijskih lastnosti uporabljenega senzorskega sistema. Pri tem moramo biti pozorni, da meritve izvajamo v pogojih laminarnega toka in enostavnega striga ter pri konstantni temperaturi (23).

Glede na lastnosti testirane tekočine, pogoje merjenja ter temperaturno območje, v katerem želimo analizirati vzorec, je pomembna tudi pravilna izbira senzorskega sistema. Senzorski sistemi se razlikujejo v geometrijskih lastnosti in sicer ločimo tri sisteme: sistem koaksialnih valjev, sistem stožca in plošče ter sistem dveh vzporednih plošč, kar prikazuje slika 4 (23).



**Slika 4:** Geometrija senzorskih sistemov: koksialni valj (a), sistem dveh vzporednih plošč (b) in sistem stožca in plošče (c) (25).

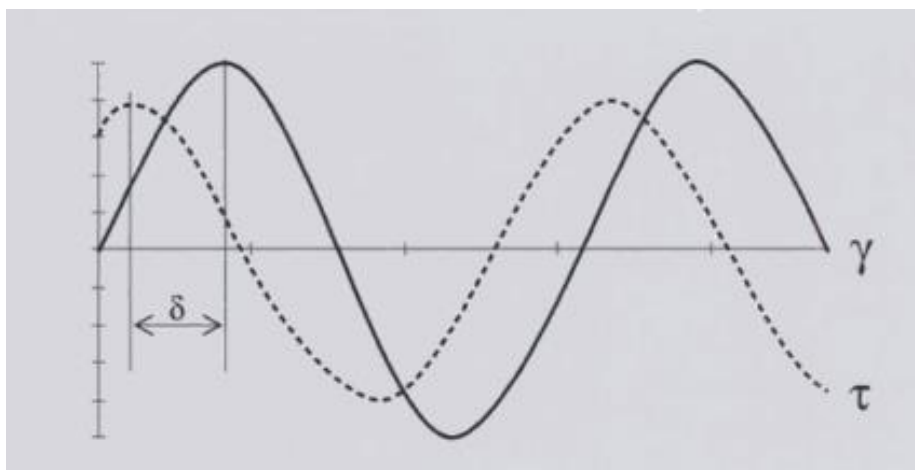
### 1.6.2. Viskoelastične lastnosti tekočin

Za viskoelastične snovi velja, da imajo tako viskozne kot elastične lastnosti. S preučevanjem teh lastnosti, dobimo informacije o mehanskih lastnostih snovi, te pa lahko povežemo z

notranjo strukturo materiala. Meritve izvajamo pri nedestruktivnih strižnih pogojih, to je v območju linearnega viskoelastičnega odziva (LVO) z uporabo dveh merilnih tehnik (23):

- Dinamični testi ali oscilatorni testi
- Statični testi ali testi lezenja in obnove

Pri oscilacijskih testih se strižna deformacija s časom spreminja sinusno z določeno frekvenco in amplitudo. Odziv snovi na vsiljeno sinusno spreminjane strižne deformacije je časovno odvisno spreminjanje strižne napetosti. Nihanje poteka pri enakih frekvencah, vendar pri različni amplitudi in z določenim faznim zamikom. Pri viskoelastičnih snoveh je elastičen odziv snovi v fazi z vsiljeno strižno deformacijo, viskozni odziv snovi pa je izven faze z vsiljeno strižno deformacijo. Ta zamik med vsiljeno strižno deformacijo in odzivom strižne napetosti imenujemo fazni zamik  $\delta$  (slika 5) (23).



**Slika 5:** Shematski prikaz strižne deformacije  $\gamma(t)$  in odziva strižne napetosti  $\tau(t)$ , pri enaki frekvenci in različni amplitudi, ter s faznim zamikom  $\delta$  (11).

Rezultate oscilacijskih meritev lahko predstavimo z dinamičnimi količinami:

- $G'$  [Pa]...*elastični modul*

Elastični modul je merilo za energijo, ki jo sistem tekom obremenitve ohrani in je po končani obremenitvi na voljo za povrnitev vzorca v prvotno stanje (11).

- $G''$  [Pa]... viskozni modul

Viskozni modul je merilo za energijo, ki se tekom procesa deformacije izgubi. Del energije se porabi za preureditev notranje strukture materiala, preostali del pa se izgubi v obliki toplote (11).

$\tan \delta$  [1]... faktor izgube

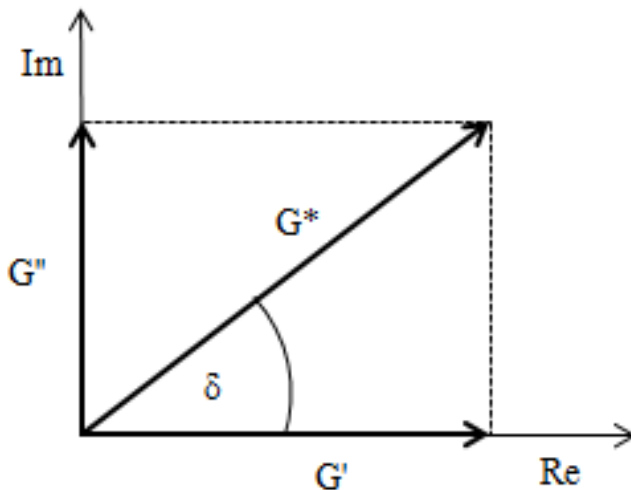
Tanges faktorja zamika je kvocient med izgubljeno in shranjeno energijo oziroma razmerje med viskoznim in elastičnim modulom (11).

Za viskoelastične snovi velja:  $0 \leq \tan \delta \leq 90^\circ$

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'}$$

- $G^*$ ... kompleksni strižni modul

Kompleksni strižni modul je rezultanta elastičnega ( $G'$ ) in viskoznega ( $G''$ ) modula, kar lahko predstavimo z vektorskim diagramom (slika 6). Je celoten odpor viskoelastične snovi na sinusno deformacijo. Naklon strižnega modula, predstavlja fazni zamik  $\delta$ .



**Slika 6:** Vektorski diagram viskoznega ( $G''$ ), elastičnega ( $G'$ ) modula, kompleksnega strižnega modula ( $G^*$ ) ter faznega zamika  $\delta$ .

## 1.7. Razvoj z vgrajeno kakovostjo (QbD)

Tradicionalni pristopi razvoja farmacevtskega izdelka temeljijo predvsem na sistemu testiranja kakovosti (ang. *Quality by Test, QbT*), kar pomeni, da se kakovost izdelka zagotavlja s testiranjem surovin, z izdelavo zdravil po »zaklenjenem« proizvodnem procesu ter z analizo končnega produkta. Vendar so regulatorni organi, predvsem Zvezna agencija za hrano in zdravila (ang. *Food and Drug Administration, FDA*), pri tem tradicionalnem pristopu zaznali vrsto pomanjkljivosti. Te pomankljivosti se najpogosteje kažejo v nestabilnem procesu in pogostih odstopih, slabi stroškovni učinkovitosti in nenazadnje v manjši varnosti izdelanih zdravil (26).

Z razvojem koncepta vgrajevanja kakovosti (ang. *QbD, Quality by Design*), se na področju zagotavljanja kakovosti farmacevtskih izdelkov uvajajo številne spremembe. Do sedaj uveljavljen empirični razvoj zamenjuje bolj znanstveni pristop, ki temelji na oceni tveganja. QbD je sistematični, proaktivni pristop k razvoju farmacevtskega izdelka. Sledi razvoju z vnaprej zastavljenim ciljem, ki temelji na razumevanju produkta in procesa, ter uporabi znanstvenih načel in obvladovanju tveganj kakovosti (26).

V nadaljevanju so predstavljeni najpomembnejši QbD elementi, ki jih je potrebno upoštevati tudi pri razvoju FO z nadzorovanim sproščanjem (3) (26):

- definiran ciljni profil kakovosti (ang. *Quality Target Product Profile, QTPP*). Predstavlja povzetek vseh atributov kakovosti končnega farmacevtskega izdelka, s katerimi se zagotovi varnost in učinkovitost zdravila.
- opredelitev potencialnih kritičnih atributov kakovosti (ang. *Critical Quality Attribute, CQA*). Kritični atributi kakovosti so tiste fizikalne, kemijske, biološke ali mikrobiološke lastnosti oziroma karakteristike končnega produkta, ki s tem, ko se nahajajo znotraj določenih meja, pomembno prispevajo k varnosti in učinkovitosti končnega produkta.

- opredelitev kritičnih materialnih lastnosti (ang. *Critical Material Attribute, CMA*). To so fizikalne, kemijske, biološke in mikrobiološke lastnosti oz. karakteristike vstopnih materialov, predvsem pomožnih snovi, ki vplivajo tudi na CQA in morajo biti zato tudi ustrezno kontrolirane.
- identifikacija kritičnih procesnih parametrov (ang. *Critical Process Parameter, CPP*). Variabilnost teh parametrov ima velik vpliv tudi na CQA, zato je pomembno, da so procesni parametri ustrezno kontrolirani in nadzorovani.



## 2. NAMEN DELA

Hidrofilne ogrodne tablete s HPMC so najpogostejše uporabljena farmacevtska oblika za doseg podaljšanega sproščanja učinkovine. Namen magistrske naloge je raziskati vpliv materialnih lastnosti HPMC polimera, kot so stopnja substitucije, velikost delcev in viskoznost polimerne raztopine znotraj posameznega razreda, ki veljajo za kritične lastnosti pri oblikovanju kakovostne farmacevtske oblike. Kot metodi za preučevanje teh lastnosti bomo uporabili *in vitro* teste sproščanja in reološka testiranja raztopin.

- Najprej bomo pripravili ogrodne tablete, ki se bodo razlikovale v deležu uporabljenega HPMC. Teste sproščanja učinkovine bomo izvajali na napravi z vesli (USP II) in na napravi s košarico (USP I). Na podlagi rezultatov se bomo odločili, katero USP napravo bomo uporabili za nadaljnje teste sproščanja ter kolikšen bo delež HPMC polimera v izdelanih ogrodnih tabletah.
- Nato bomo iz QbD HPMC vzorcev izdelali hidrofilne ogrodne tablete. Teste sproščanja učinkovine bomo izvajali pri dveh različnih hitrostih vrtenja mešal ter na napravi, ki se je v preliminarinih testih izkazala kot najbolj optimalna. Delež sproščene učinkovine bomo analizirali z UV-VIS spektrofotometrom, dobljene rezultate sproščanja pa bomo poskušali povezati s fizikalno-kemijskimi lastnostmi QbD HPMC vzorcev.
- V nadaljevanju bomo iz QbD HPMC vzorcev pripravili polimerne vodne raztopine, ter jim z reološkimi testi izmerili navidezno viskoznost. Z amplitudnimi in frekvenčnimi testi bomo pridobili tudi podatke o viskoelastičnih lastnostih preučevanih polimerov.
- Iz fizikalno-kemijskih karakteristik preučevanih QbD HPMC vzorcev, katerih lastnosti smo pridobili iz strani proizvajalca, in iz rezultatov reoloških testiranj, bomo poskušali napovedati, katere izmed preučevanih lastnosti vplivajo na hitrost sproščanje dobro topne učinkovine iz HPMC ogrodnih tablet.

### 3. MATERIALI IN METODE DELA

#### 3.1. Materiali

##### Hipromeloza

V raziskovalnem delu smo uporabili QbD HPMC vzorce, dveh različnih proizvajalcev, substitucijskega tipa 2208 in nazivne viskoznosti 4000 mPas (Preglednica II).

- Proizvajalec Dow® : tržno ime Methocel K4M
- Proizvajalec Shin Etsu®: tržno ime Metolose 90SH-4000SR

***Preglednica II:** Opredelitev vzorcev glede na proizvajalca, tip substitucije, nazivno viskoznost in uporabljeno oznako v nalogi.*

|    | Proizvajalec | Tip<br>substitucije | Viskoznost<br>(mPas) | Vzorec                     | Uporabljena<br>oznaka |
|----|--------------|---------------------|----------------------|----------------------------|-----------------------|
| 1  | Dow®         | 2208                | 4000                 | CC Central point           | CC Central point      |
| 2  | Dow®         | 2208                | 4000                 | CC High Substitution       | CC HS                 |
| 3  | Dow®         | 2208                | 4000                 | CC Low Substitution        | CC LS                 |
| 4  | Dow®         | 2208                | 4000                 | CC High viscosity          | CC HV                 |
| 5  | Dow®         | 2208                | 4000                 | CC Low viscosity           | CC LV                 |
| 6  | Dow®         | 2208                | 4000                 | CC High % pass 230<br>mesh | CC HPS                |
| 7  | Dow®         | 2208                | 4000                 | CC Low % pass 230<br>mesh  | CC LPS                |
| 8  | Shin Etsu®   | 2208                | 4000                 | SE Standard                | SE Standard           |
| 9  | Shin Etsu®   | 2208                | 4000                 | SE High Substitution       | SE HS                 |
| 10 | Shin Etsu®   | 2208                | 4000                 | SE Low Substitution        | SE LS                 |
| 11 | Shin Etsu®   | 2208                | 4000                 | SE High viscosity          | SE HV                 |
| 12 | Shin Etsu®   | 2208                | 4000                 | SE Low viscosity           | SE LV                 |
| 13 | Shin Etsu®   | 2208                | 4000                 | SE Fine particle           | SE FP                 |
| 14 | Shin Etsu®   | 2208                | 4000                 | SE Coarse particle         | SE CP                 |

QbD HPMC vzorci imajo pomembno vlogo predvsem v prvih fazah razvoja formulacije, saj služijo kot podpora za prepoznavanje kritičnih materialnih lastnosti (ang. CMA), kritičnih lastnosti produkta CQA in tako prispevajo k uspešnejšemu formuliranju robustnih hidrofilnih ogrodnih tablet. Lastnosti uporabljenih QbD HPMC vzorcev se nahajajo znotraj specifikacijskih meja, posamezni tipi pa imajo posamezno lastnost (kot so: viskoznost, stopnja hidroksipropoksi substitucije in velikost delcev (Preglednica III, Preglednica IV)) na sredini, spodnji ali zgornji meji specifikacije.

**Preglednica III:** Specifikacije QbD HPMC vzorcev, povzete po Analiznem certifikatu (CoA) proizvajalca Dow.

| QbD HPMC vzorec      | Viskoznost (mPas) <sup>a</sup> | HPO (%) | Velikost delcev <sup>b</sup><br>% skozi 230 US sito |
|----------------------|--------------------------------|---------|-----------------------------------------------------|
| CC Central point     | 3389                           | 8,45    | 53,2                                                |
| CC HS                | 3410                           | 10,2    | 50,3                                                |
| CC LS                | 3710                           | 8       | 55,8                                                |
| CC HV                | 4938                           | 8,6     | 51                                                  |
| CC LV                | 3233                           | 8,4     | 54,9                                                |
| CC LPS               | 3528                           | 8,5     | 36,9                                                |
| CC HPS               | 3300                           | 8,8     | 60,1                                                |
| Specifikacijske meje | 2663-4970                      | 7,7-9,5 | 50-80                                               |

a... 2 % vodna raztopina HPMC polimera b... % masa delcev, ki preide 230 US sito (63 µm).

**Preglednica IV:** Specifikacije QbD HPMC vzorcev, povzete po Analiznem certifikatu (CoA) proizvajalca Shin Etsu.

| QbD HPMC vzorec | Viskoznost (mPas) <sup>a</sup> | HPO (%) | Velikost delcev<br>(µm) |
|-----------------|--------------------------------|---------|-------------------------|
| SE Standard     | 4100                           | 9,4     | 67,5                    |
| SE HS           | 3970                           | 10,7    | 63,2                    |
| SE LS           | 3630                           | 8,1     | 70,8                    |
| SE HV           | 5470                           | 9,5     | 75,1                    |
| SE LV           | 3040                           | 9,5     | 68,1                    |

|                             |                  |                 |              |
|-----------------------------|------------------|-----------------|--------------|
| <b>SE FP</b>                | 3530             | 9,2             | 60,2         |
| <b>SE CP</b>                | 3730             | 9,3             | 83,4         |
| <b>Specifikacijske meje</b> | <b>3000-5600</b> | <b>8,5-10,5</b> | <b>50-80</b> |

a... 2 % vodna raztopina HPMC polimera

### **Laktoza sušena z razprševanjem**

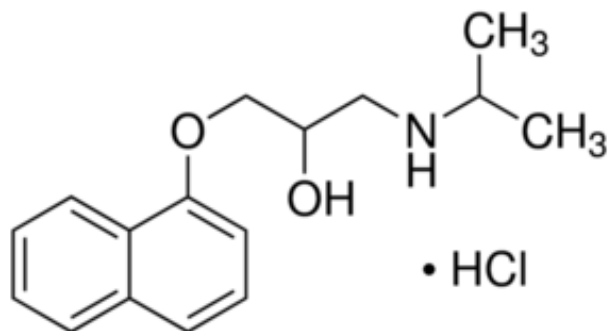
Laktoza, sušena z razprševanjem, se najpogosteje uporablja kot polnilo za direktno tabletiranje. Je brez vonja in rahlo sladkega okusa. Laktozo, sušeno z razprševanjem, primarno namenjeno direktnemu stiskanju, sestavlja 80-90 %  $\alpha$ -laktoze monohidrata in 10-20 % amorfnе laktoze. Ti delci laktoze so pretežno sferične oblike, kar se odraža v dobrih pretočnih lastnostih in dobri stisljivosti (10).

### **Magnezijev stearat, Peter Greven, Nemčija**

Magnezijev stearat je fin, svetlo bel prah, masten na dotik in z rahlim vonjem po stearinski kislini. K zmesi za tabletiranje ga dodajamo predvsem zaradi njegovih antiadhezivnih lastnosti, saj znižuje adhezijo med praškom in pečati tabletirke ter tako preprečuje lepljenje zmesi na pečate tekom tabletiranja. Je hidrofobne narave in ga pri izdelavi tablet in kapsul uporabljamo v nizkih koncentracijah, to je med 0,25 % in 5,0 % (m/m) (10).

### **Propranololijev klorid**

Modelna učinkovina, propranololijev klorid, je neselektivni beta adrenergični blokator, ki se pogosto uporablja za zdravljenje angine pectoris, hipertenzije in številnih drugih bolezni srca in ožilja. Po peroralni poti se skoraj popolnoma absorbira, vendar je zaradi predsistemskega metabolizma v jetrih, njegova biološka uporabnost omejena (30 %). Po biofarmacevtski klasifikaciji zdravil (ang. *The Biopharmaceutics Classification System, BSC*) ga uvrščamo v I skupino, kar pomeni, da je dobro topna in permeabilna učinkovina (27) (28).



**Slika 7:** Strukturna formula učinkovine propranololijevega klorida (29).

### Material za pripravo medija za sproščanje

- Brezvodni natrijev hidrogen fosfat, Merck KGaA, Nemčija
- citronska kislina, Lek d.d

### 3.2. Aparature

- tehtnica, Sartorius BP1200, Nemčija
- analizna tehtnica, Sartorius AX224, Nemčija
- mehansko mešalo Eurostar power control-visc P1, IKA, Nemčija
- mešalnik Paul Schatz, Tumbler Mixer 2L, Švica
- tabletirka na udarec, Killian SP 300, Nemčija
- naprava za merjenje trdnosti tablet, VK 200, Vankel Vanderkamp, ZDA
- helijev piknometar, AccuPyc 1330, Micromeritics, ZDA
- aparat za testiranje sproščanja, aparat z vesli, VK 7000, VanKel Technology Group, Cary, ZDA
- UV/VIS spektrofotometer, Agilent 8453; Agilent technologies, ZDA
- pH meter, MP 220, Mettler Tolledo, Švica
- avtomatska pipeta 100-1000  $\mu$ L, Eppendorf research, Nemčija
- avtomatska pipeta 500-2500  $\mu$ L, Eppendorf research, Nemčija

- reometer, Anton Paar, Physica MCR 301, Nemčija
- termogravimetrični analizator vlage, B-302, Büchi, Švica
- sejhalno sito, 500  $\mu\text{m}$ , RETSCH, Nemčija
- lab dancer, Ika, Nemčija
- digitalna stoparica
- električni kuhalnik
- termometer
- ledomat
- filtri z velikostjo por 10  $\mu\text{m}$  (na napravi za sproščanje)

### **3.3. Metode dela**

#### **3.3.1 Priprava zmesi za direktno tabletiranje**

Tabletirna zmes je vsebovala 49 ut/ut % polnila laktoze sušene z razprševanjem, 25 ut/ut % učinkovine propranolol klorida, 1% ut/ut % antiadheziva magnezijevega stearata ter 25 ut/ut % HPMC polimera, katerega lastnosti so se razlikovale od formulacije do formulacije. Ustrezno maso polnila, učinkovine in polimera smo na precizni tehtnici natehtali v plastični lonček ter zmes presejali skozi 500  $\mu\text{m}$  sito. Da bi dosegli homogeno zmes, smo plastični lonček s presejano zmesjo prenesli v Paul Schatz mešalnik in pri nastavitvi 60 obratov/minuto zmes homogenizirali 5 min. Nato smo zmesi dodali še antiadheziv magnezijev stearat, ki smo ga predhodno natehtali na analitski tehtnici ter nastalo zmes še 1 minuto mešali pri predhodni nastavitvi obratov.

#### **3.3.2 Izdelava tablet s tabletirko na udarec**

Pripravljeno zmes za tabletiranje smo z uporabo tabletirke na udarec (Killian SP 300) stisnili v tablete. Pri hitrosti tabletiranja 35 tablet/min ter legi spodnjega (11,4 mm) in zgornjega pečata (9,00 mm), smo z okroglimi, ravnimi pečati premera 12 mm, dosegli ciljno trdnost  $70 \pm 5$  N. Za vsako tableto posebej smo  $400 \pm 5$  mg zmesi za tabletiranje natehtali na tehtič, jo prenesli v matrično vdolbino ter jo ročno stisnili v tableto. Spremljali smo silo stiskanja na zgornjem

pečatu (kN) ter silo izmeta (N), trem tabletam iz vsake serije pa smo pomerili tudi maso (mg) in trdnost (N).

### 3.3.3 Določanje prave gostote s helijevim piknometrom

Za določanje prave gostote tablet, samo uporabili helijev piknometer. V prazno celico za vzorec, ki smo jo pred tem kalibrirali, smo na analitski tehtnici natehtali 1-2 g tablet. Natančno maso zatehte smo nato vnesli v aparaturo, ki je iz povprečja treh meritev gostote, podala pravo gostoto vzorca.

### 3.3.4 Poroznost tablete

Poroznost tablet smo izračunali na podlagi prave in navidezne gostote tablet /enačba 3/. Podatek o pravi gostoti smo pridobili po postopku opisanemu v poglavju 3.3.3., medtem ko smo za izračun navidezne gostote trem tabletam iz vsake serije pomerili dimenzije, kot so: premer, debelina in masa tablete. Za izračun poroznosti smo uporabili spodaj napisane enačbe 1-3. Končna poroznost tablete, je podana kot povprečje poroznosti treh tablet.

$$V_{tab} = \left(\frac{D}{2}\right)^2 * \pi * h * 0,001 \text{ /enačba 1/}$$

$$\rho_{tab} = \frac{m_{tab}}{1000 * V_{tab}} \text{ /enačba 2/}$$

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_{tab}}{\rho_{prava}} \text{ /enačba 3/}$$

$V_{tab}$ ... volumen tablete (cm<sup>3</sup>)

D...premer tablete (mm)

h... debelina tablete (mm)

$m_{tab}$ ... masa tablete (mg)

$\rho_{tab}$ ... gostota tablete (g/cm<sup>3</sup>)

$\rho_{prava}$ ...prava gostota tabletne zmesi (g/cm<sup>3</sup>)

$\varepsilon$ ... poroznost tablete (/)

### 3.3.5 Priprava puferskega medija za sproščanje

Disolucijski medij, ki je bil v našem primeru fosfati pufer s pH 6,80, smo pripravili po USP 38. Na precizni tehtnici smo zatehtali 21,72 g brezvodnega dinatrijevega fosfata in 4,94 g citronske kisline monohidrat, ki smo ju kvantitativno prenesli v 1 L merilno bučko in z destilirano vodo dopolnili do oznake. Tako pripravljenem mediju smo preverili pH s pH metrom.

### 3.3.6 Testi sproščanja

Teste sproščanja smo izvajali na napravi z vesli VanKel VK 7000, ZDA. V vsako od osmih posod smo z merilnim valjem odmerili 900 mL fosfatnega pufera s pH 6,80 ter ga s pomočjo vodne kopeli termostatirali na 37 °C. V termostatiran medij smo nato v čim krajšem časovnem razmiku aplicirali tablete, ki smo jih zaradi težav s prijemanjem na dno posode vstavili v obteževalce (*ang. sinker*).

Vzorčenje je potekalo skozi filter s pomočjo avtomatskega vzorčevalnika v časovnih točkah 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 in 14h ter pri dveh hitrostih vrtenja mešala 50 rpm in 100 rpm. Volumen odvzetega vzorca je znašal 10 mL. Medija nismo nadomeščali. Vzorce smo analizirali naslednji dan.

### 3.3.7 UV-VIS spektrometrija

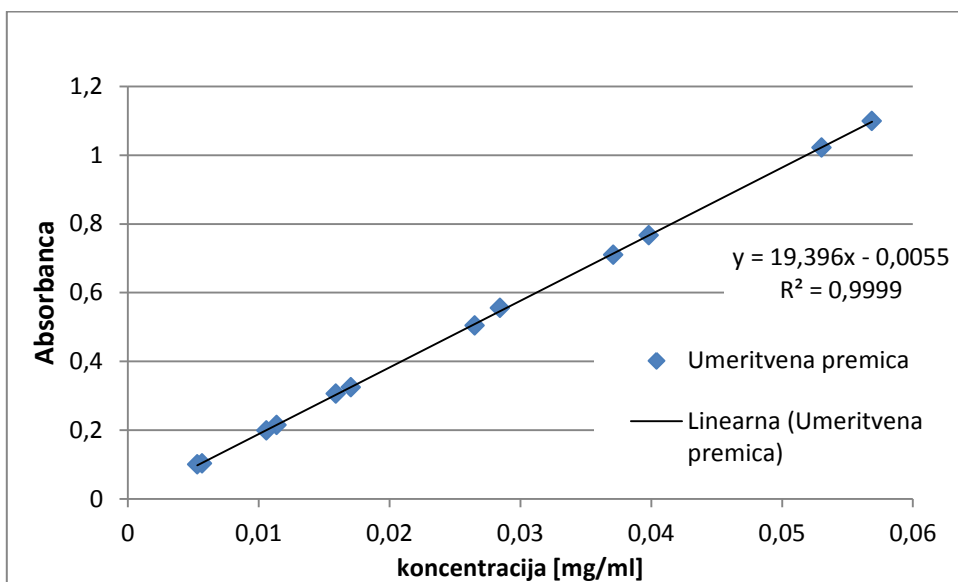
Delež sproščene učinkovine smo določali z UV-VIS spektrofotometrom Agilent 8453, ZDA. Najprej smo pripravili osnovno raztopino delovnega standarda, ki je bil v našem primeru propranololijev klorid. Na tehtalni čolnička smo dvakrat natančno natehtali približno 20 mg učinkovine in zatehti kvantitativno prenesli v 200 mL bučki, ter s puferskim medijem s pH 6,80 dopolnili do oznake. Tako pripravljeni osnovni raztopini, s koncentracijo 100 mg/L, smo posneli absorpcijski spekter, iz katerega smo odčitali absorpcijski maksimum učinkovine, ki je znašal 289 nm.

### 3.3.8 Umeritvena premica

Za določitev enačbe umeritvene premice smo osnovni raztopini, s koncentracijo 100 mg/L, ponovno ustrezno redčili z medijem in pripravili raztopine v koncentracijskem intervalu 5 mg/L – 50 mg/L, s katerimi smo pokrili celotno koncentracijsko območje, v katerem daje instrument še linearni odziv. Tem raztopinam smo izmerili absorbanco pri absorpcijskem



maksimumu in določili enačbo premice ter determinacijski koeficient  $R^2$ , ki je znašal 0,9999. Umeritveno premico prikazuje Graf 1.



**Graf 1:** Umeritvena premica za propranololijev klorid.

### 3.3.9 Analiza vzorcev

Po zaključenem testu sproščanja smo vzorcem spektrofotometrično izmerili absorbance pri absorpcijskem maksimumu 289 nm in nastavitvi valovne dolžine med 200 nm in 400 nm. V kiveti iz kvarčnega stekla, dolžine 1 cm smo najprej posneli slepi vzorec, ki je bil medij za sproščanje brez učinkovine in nato absorpcijske spektre vzorcev, ki smo jih po potrebi predhodno 5-krat redčili (600  $\mu$ L vzorca + 2400  $\mu$ L medija). Iz izmerjenih absorbanc smo po spodaj opisanih enačbah izračunali deleže sproščene učinkovine.

Splošna enačba umeritvene premice:

$$A = k * c + b$$

A...izmerjena absorbanca vzorca

k...odsek umeritvene premice na abscisni osi

c...koncentracija merjenega vzorca v n-ti časovni točki (mg/mL)

b... odsek umeritvene premice na ordinatni osi

Iz enačbe umeritvene premice smo izrazili  $c$  (mg/mL), ki nam poda koncentracijo učinkovine v določeni časovni točki vzorčenja:

$$c = \frac{A - b}{k}$$

Volumen vzorčenja je znašal 10 mL, ker pa tekom testa medija nismo nadomeščali, smo v enačbo uvedli korekturo, ki to upošteva.

$$V_n = V_{medij} - 10 * (n - 1)$$

$V_n$ ... volumen medija po n-tem vzorčenju (mL)

$V_{medija}$ ... začetni volumen medija (mL)

$n$ ...zaporedno število vzorčenja

Maso učinkovine, raztopljene v mediju, v  $n$ -ti časovni točki smo izračunali po spodnji enačbi:

$$m_n = c_n * V_n + 10 * (c_1 + c_2 + c_3 + \dots c_{(n-1)})$$

$m_n$ ...masa učinkovine raztopljene v vzorcu, odvzetem v  $n$ -ti časovni točki (mg)

Iz tega je sledil izračun deleža raztopljene učinkovine, ki se je sprostila iz ogrodne tablete v okoliški medij.

$$\%_{sproščene\ učinkovine} = \frac{m_n}{m_{uč}} * 100\%$$

$m_{uč}$ ... odmerek učinkovine v testirani tableti (mg)

### 3.4.0 Izguba pri sušenju

Vsebnost vlage v HPMC vzorcih smo določili z uporabo avtomatskega analizatorja vlage B-302, Büchi. Na kovinski nosilec znotraj analizatorja smo enakomerno po vsej površini nanegli približno 1g HPMC vzorca ter ga pri 105 °C sušili 1h. Podatek o odstotku zmanjšanja mase pri sušenju smo uporabili za izračun mase vzorca glede na suho snov.

### 3.4.1 Priprava raztopin za proučevanje reoloških lastnosti

Za proučevanje reoloških lastnosti smo pripravili 4 % vodne raztopine HPMC-ja. Na tehtič smo najprej zatehtali 4 g HPMC vzorca, preračunanega na suho snov. V stekleno čašo smo nato odmerili 1/3 celotnega volumna prečiščene vode, potrebnega za pripravo 4 % raztopine polimera in jo segreli na 80 °C – 85 °C. Med mešanjem smo v vročo vodo počasi dodajali natehto HPMC-ja in mešali dokler se delci niso popolnoma dispergirali in omočili. Ker pa se HPMC v vroči vodi ne raztaplja, smo k suspenziji polimera dodali preostanek vode, ki smo jo predhodno ohladili (10 °C) in s tem dosegli večjo hidratacijo in raztapljanje polimera, kar se je kazalo v povečani viskoznosti raztopine. Čašo z raztopino smo postavili v ledeno kopel in mešali še približno 30 min, dokler se polimer ni povsem raztopil.

### 3.4.2 Reologija

Reološka testiranja smo izvajali na reometru Anton Paar, Physica MCR 301. Z merjenjem navidezne viskoznosti, amplitudnimi in frekvenčnimi testi smo analizirali viskoelastične lastnosti pripravljenih 4 % HPMC raztopin oz. gelov. S tem smo želeli ugotoviti, ali obstaja korelacija med viskoelastičnimi lastnostmi analiziranih raztopin in sproščanjem učinkovine iz HPMC ogrobnih tablet.

Eno uro pred začetkom testiranja smo polimerne raztopine, ki smo jih predhodno hranili v hladilniku, postavili na sobno temperaturo. Na spodnjo, stacionarno ploščo s konstantno temperaturo 20 °C, smo nanесли vzorec in merilni sistem v obliki stožca do merilne lege 0,209 mm. Pred začetkom meritev smo s spatulo odstranili izpodrinjeni vzorec in pri tem pazili, da nismo vplivali na robne pogoje.

#### Določanje viskoznosti

Viskoznost polimernih raztopin smo določali z rotacijskimi testi. Spremljali smo, kako se spreminjanje strižne hitrosti od 0,01 s<sup>-1</sup> do 100 s<sup>-1</sup> odraža na viskoznosti preučevanega sistema. Meritve smo izvajali v dveh paralelkah, kot rezultat pa smo vzeli povprečje obeh meritev.

#### Amplitudni testi

Z oscilacijskimi testi smo najprej izvedli amplitudni test. Pri konstantni frekvenci oscilacije 10 rad/s smo spreminjali amplitudo deformacije od 0,01 % do 100 % in merili odvisnost

dinamičnih modulov  $G'$  in  $G''$  od strižne deformacije. V območju, v katerem sta ti dve vrednosti konstantni smo določili linearno viskoelastično območje (LVO), ki nam poda informacijo o tem, pri kateri vrednosti amplitudne oscilacije še lahko izvajamo frekvenčne teste, ne da bi s tem porušili notranjo strukturo analiziranega polimernega vzorca.

### Frekvenčni testi

Amplitudnemu testu je sledil oscilacijski frekvenčni test, pri katerem smo pri konstantni deformaciji  $\gamma = 1\%$  spreminjali frekvenco oscilacije od 0,1 do 628 rad/s. Iz vrednosti  $G'$  in  $G''$  smo dobili informacije o obnašanju testiranega polimernega materiala pod vplivom časovno odvisne strižne deformacije in o viskoelastičnih lastnosti HPMC-ja. Iz točke prekrivanja obeh dinamičnih modulov pa podatke o povprečni molekulski masi polimera.

### **3.4.3 Izračun faktorja podobnosti**

Za primerjavo profilov sproščanja smo uporabili matematični izračun faktorja podobnosti ( $f_2$ ). V primeru, ko je vrednost  $f_2$  med 50 in 100, lahko trdimo, da sta si profila podobna oziroma bližje kot je  $f_2$  vrednosti 100, večja je podobnost med profiloma (30).

$$f_2 = 50 \times \text{Log} \left\{ \left[ 1 + \left( \frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \times 100 \right\}$$

Log    desetiški logaritem

n      število časovnih točk vzorčenja

$R_t$     % sproščene ZU referenčnega zdravila v času t

$T_t$     % sproščene ZU testnega zdravila v času t

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1. Preliminarni testi

Za določitev sestave hidrofilnih HPMC ogrodnih tablet, metode in pogojev, pri katerih bomo proučevali vplive fizikalno-kemijskih lastnosti HPMC na sproščanje ZU, smo na samem začetku naredili preliminarne teste. Naš cilj je bil oblikovati osnovno formulacijo, ki bo omogočala podaljšano sproščanje vgrajene učinkovine, hkrati pa oblikovati dovolj robustno formulacijo, ki bo zagotavljala njeno ponovljivo sproščanje. Ponovljivo sproščanje iz farmacevtskih oblik s podaljšanim sproščanjem je še posebej pomembno v primerih, ko vgrajujemo v le-te ZU z ozkim terapevtskim oknom.

Pri tem ima pomembno vlogo delež polimera, ki tvori ogrodje tablete in s katerim lahko prilagajamo profil sproščanja ZU. Z višjim deležem polimera dosežemo višjo robustnost hidrofilnih ogrodnih tablet, hkrati pa se lahko zakrijejo tudi nekatere razlike v fizikalno kemijskih lastnostih hipromeloze. Torej, bolj kot je formulacija robustna, manjši vpliv različnih fizikalno-kemijskih lastnosti pričakujemo, ki bi se tekom testa sproščanja, lahko izkazale za kritične lastnosti materiala. Zato smo v sklopu preliminarnih testov, pripravili dve formulaciji, katerih sestavo predstavlja Preglednica V.

**Preglednica V:** Sestava formulacije z 20 % (m/m) in 25 % (m/m) HPMC polimera.

| Snov                           | % Sestava (m/m)             |                             |
|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                                | Delež polimera<br>20% (m/m) | Delež polimera<br>25% (m/m) |
| Propranololijev klorid         | 25                          | 25                          |
| Laktoza sušena z razprševanjem | 54                          | 49                          |
| HPMC QbD SE Standard           | 20                          | 25                          |
| Magnezijev stearat             | 1                           | 1                           |
| <b>Skupaj</b>                  | <b>100</b>                  | <b>100</b>                  |

Ogrodne tablete smo izdelali z direktnim tabletiranjem. Trem tabletam iz vsake serije smo določili maso, trdnost, ter izračunali poroznost. Rezultati so prikazani v Preglednica VI. S t-testom smo preverili ali med formulacijama obstajajo statistično pomembne razlike v mehanskih lastnostih. Merilo za stopnjo značilnosti je p-vrednost, ki je tako v primeru mase ( $p=0,595$ ), kot tudi trdnosti ( $p=0,188$ ) in poroznosti ( $p=0,236$ ) znašala  $p > 0,05$ , kar pomeni, da med mehanskimi lastnostmi ene in drug formulacije ni statistično pomembnih razlik.

**Preglednica VI:** Povprečne mase, trdnost in poroznost tablet s standardnimi deviacijami.

| Vzorec QbD<br>HPMC | HPMC<br>[%] | Masa [mg]   | Trdnost<br>[N] | Poroznost [/] |
|--------------------|-------------|-------------|----------------|---------------|
| SE standard        | 20          | 399,7±1,8   | 67,2±4,1       | 0,1667±0,0095 |
| SE standard        | 25          | 401,8 ± 2,5 | 72,5 ± 2,1     | 0,1760±0,0010 |

Preliminarne teste sproščanja smo izvajali na aparaturi USP I (aparatura s košarico) in USP II (aparatura z vesli). Kot medij, smo uporabili 900 mL fosfatnega pufra s pH 6,8, hitrost vrtenja mešala je bila 100 rpm, kar prikazuje Preglednica VII.

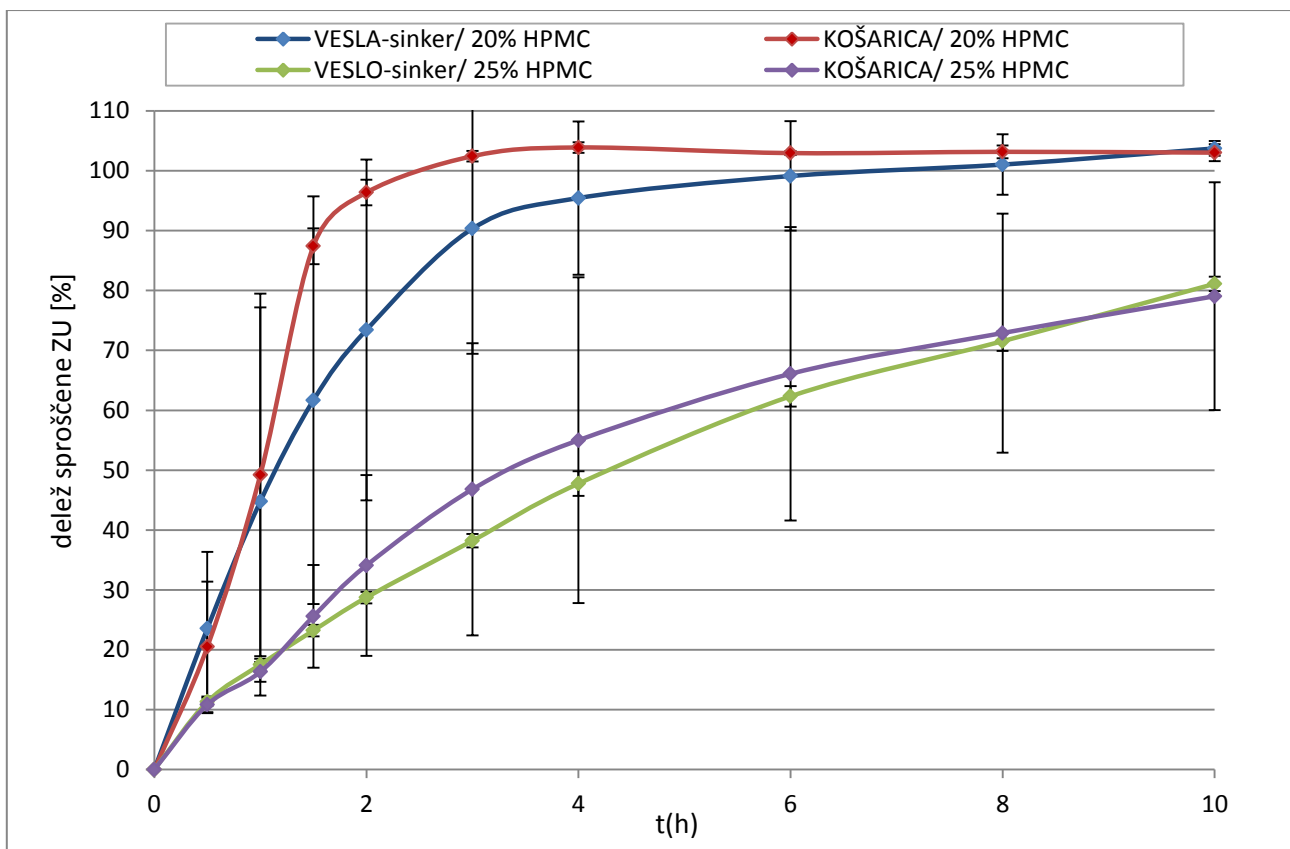
**Preglednica VII:** Pogoji pri katerih smo izvajali preliminarne teste sproščanja.

| Vzorec QbD<br>HPMC | HPMC<br>[%] | Volumen<br>medija<br>[mL] | pH<br>medija | USP<br>naprava | Hitrost<br>vrtenja vesla<br>(rpm) | Temperatura<br>medija [°C] |
|--------------------|-------------|---------------------------|--------------|----------------|-----------------------------------|----------------------------|
| SE Standard        | 20          | 900                       | 6,8          | USP I          | 100                               | 37 ± 0,5                   |
|                    |             |                           |              | USP II         |                                   |                            |
| SE Standard        | 25          |                           |              | USP I          |                                   |                            |
|                    |             |                           |              | USP II         |                                   |                            |

Tablete smo pred začetkom testa vstavili v sinkerje, saj smo opazili, da se v nasprotnem primeru lepijo na dno posode. Pri tem smo bili pozorni, da smo tableto namestili tako, da je potem, ko smo jo spustili v medij ostala v sinkerju, hkrati pa je sinker tekom nabrekanja ni utesnjeval.

Teste sproščanja smo izvajali v treh paralelkah, iz odstotka sproščene učinkovine pa smo izračunali povprečne vrednosti in standardno deviacijo (SD). Iz povprečnih profilov sproščanja (Graf 2) vidimo, da tako delež polimera, kot tudi tip uporabljene aparature, vplivata na sproščanje učinkovine iz tablet.

Formulacija z 20 % HPMC izkazuje bistveno hitrejši profil sproščanja učinkovine, v primerjavi s formulacijo 25 % HPMC. Do 1h sta povprečna profila pri 20 % HPMC USP I in USP II skoraj povsem poravnana, od te ure dalje pa je sproščanje ZU iz tablet testiranih z USP I metodo hitrejše. Že z opazovanjem tablet med samim testom, smo lahko ugotovili, da se tablete obnašajo povsem različno, kar potrjuje visoke standardne deviacije v primeru 20 % HPMC polimera. Predvidevamo, da smo z 20 % HPMC polimera ravno na prevoju, kjer se že minimalne razlike med tabletami, kot je nap. trdnost tablete, odražajo v veliki variabilnosti rezultatov testov sproščanja. Hitrejše sproščanje iz ogrodnih tablet z 20 % deležem HPMC-ja si lahko deloma razlagamo tudi z vidika perkolacijske teorije (20). Sklepamo, da smo z 20 % uporabljenega HPMC polimera v tem primeru pod ali pa v bližini perkolacijskega praga, torej se v ogrodju tablete ne tvorijo v celoti kontinuirane povezave med delci polimera, ki bi bile v medsebojnem stiku in ki bi omogočale nastanek homogenega gela na površini tablete. Delci HPMC polimera niso med seboj povezani, zato med njimi ostanejo prazni prostori oziroma pore, ki omogočajo prost prehod vode v ogrodje tablete. Temu sicer sledi nabrekanje polimera, vendar pa gel, ki se pri tem tvori, ni homogen in je zaradi tega manj erozijsko odporen, kar je pogosto vzrok za razpad hidrofilnega ogrodja tablete in pospešenega sproščanja učinkovine. Poleg nizkega deleža polimera, k hitrejšemu sproščanju učinkovine lahko prispeva tudi višji odstotek laktoze. Ta zaradi dobre topnosti v vodi zviša osmotski tlak, kar pospeši transport vode v ogrodje tablete, ter tvorbo krhkega gela (31).



Graf 2: Profili sproščanja ZU iz formulacij s 20 % HPMC in 25 % HPMC, pri 100 rpm ter na dveh različnih aparaturah USP I (košarica) in USP II (veslo).

Podobnost med profili smo preverili z izračunom faktorja podobnosti ( $f_2$ ). V primeru 25 % HPMC (USP I in USP II) je  $f_2$  znašal 64,54, kar pomeni, da sta si profila podobna, medtem ko v primeru 20 % HPMC (USP I in USP II)  $f_2$  znaša 42,04, torej se profila med seboj bistveno razlikujeta. Kljub podobnosti profilov, v primeru formulacije s 25 % HPMC polimera, opazimo slabšo ponovljivost med paralelkami v primeru testov izvedenih na aparaturi USP I. Tablete so se lepile na zgornji del košarice oziroma na njen nosilec, ter se nato v različnih časovnih točkah odlepile, kar je tudi morebitni razlog za variabilnosti v hitrosti sproščanja učinkovine. Na podlagi rezultatov preliminarne testov, smo se tako odločili, da bomo nadaljnje teste izvajali na aparaturi USP II (aparatura z vesli) ob uporabi sinkerjev, s formulacijo, ki vsebuje 25 % HPMC polimera.



## 4.2 Sproščanje učinkovine iz HPMC ogrodnih tablet

Teste sproščanja dobro topne učinkovine iz hidrofilnih ogrodnih tablet smo izvajali na napravi USP II (naprava z vesli) pri dveh različnih hitrostih vrtenja vesel - 50 rpm in 100 rpm. Ogrodne tablete so se med seboj razlikovale v fizikalno-kemijskih lastnostih uporabljenega HPMC polimera, katerih lastnosti so predstavljene v Preglednici II in Preglednici III. Povprečne profile sproščanja ZU prikazujejo Grafi 3-6.

Podobnosti med posameznimi profili sproščanja, smo določili na podlagi izračunanega faktorja podobnosti ( $f_2$ ), za lažjo kvantitativno primerjavo pa smo z metodo linearne interpolacije iz profilov sproščanja določili vrednosti  $T_{50}$  in  $T_{80}$ . Ti dve vrednoti predstavljata čas, v katerem se iz ogrodja tablete sprosti 50 % oz. 80 % učinkovine. S statistično analizo ANOVA smo preverili, ali med izračunanimi urami posameznih tipov HPMC vzorcev obstajajo signifikantne razlike. Statistične teste smo izvajali pri stopnji značilnosti  $p=0,05$ . V primeru, ko je  $p \leq 0,05$  med vzorci obstajajo statistično pomembne razlike, medtem ko pri  $p > 0,05$  statistično pomembnih razlik ne moremo dokazati. Vrednosti  $T_{50}$  in  $T_{80}$  s standardno deviacijo in p-vrednostmi prikazujeta Preglednica VIII in Preglednica IX.

**Preglednica VIII:** Vrednosti  $T_{50}$  in  $T_{80}$  tablet narejenih iz QbD HPMC vzorcev, proizvajalca Dow®.

| vzorec           | $T_{50}$ (h), 50 rpm | $T_{80}$ (h), 50 rpm | $T_{50}$ (h), 100 rpm | $T_{80}$ (h), 100 rpm |
|------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| CC Central point | 5,0±0,3              | 12,0±1,0             | 4,2±0,4               | 10,0±0,8              |
| CC HS            | 4,4±0,2              | 10,6±0,6             | 4,8±0,9               | 11,4±1,4              |
| CC LS            | 3,6±0,3              | 8,2±0,8              | 3,1±0,4               | 7,3±0,7               |
| CC HV            | 4,3±0,2              | 10,5±0,3             | 5,1±0,4               | 12,7±1,1              |
| CC LV            | 4,7±0,3              | 11,2±0,4             | 4,9±0,2               | 11,9±0,3              |
| CC HPS           | 4,1±0,1              | 9,8±0,2              | 5,0±0,8               | 12,2±1,1              |
| CC LPS           | 4,7±0,7              | 11,8±1,3             | 4,1±0,7               | 10,3±1,8              |
| p-vrednost       | 0,000                | 0,000                | 0,001                 | 0,000                 |

**Preglednica IX:** Vrednosti  $T_{50}$  in  $T_{80}$  tablet narejenih iz QbD HPMC vzorcev, proizvajalca Shin Etsu®.

| vzorec      | $T_{50}$ (h), 50 rpm | $T_{80}$ (h), 50 rpm | $T_{50}$ (h), 100 rpm | $T_{80}$ (h), 100 rpm |
|-------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| SE Standard | 4,9±0,3              | 11,4±0,9             | 4,8±0,8               | 11,5±2,5              |
| SE HS       | 5,4±0,4              | 11,5±1,0             | 5,6±0,8               | 11,3±0,5              |
| SE LS       | 4,2±0,5              | 9,9±1,4              | 3,7±0,7               | 9,0±2,1               |
| SE HV       | 4,9±0,3              | 12,2±0,7             | 4,8±0,2               | 11,5±1,2              |
| SE LV       | 5,0 ±0,6             | 11,5±1,0             | 4,2±0,3               | 9,8±0,9               |
| SE FP       | 4,9±0,5              | 11,3±1,4             | 5,0±0,1               | 11,5±0,4              |
| SE CP       | 4,5±0,7              | 10±1,3               | 4,9±0,4               | 10,7±1,5              |
| p-vrednost  | <b>0,072</b>         | <b>0,087</b>         | <b>0,002</b>          | <b>0,086</b>          |

#### **4.2.1 Vpliv hitrosti vrtenja vesel na hitrost sproščanja učinkovine**

- **100 rpm / proizvajalec Shin Etsu**

Iz profilov sproščanja pri 100 rpm (Graf 3) opazimo najhitrejšo sproščanje v primeru SE LS, sledita mu SE LV in SE CP. Profila sproščanja SE FP in SE HV, sta skoraj povsem poravnana s SE Standard, ki v primerjavi z ostalimi profili izkazuje srednjo hitrost sproščanja učinkovine. Kljub temu, da ima SE HS vse do 10 h najpočasnejši profil, v zadnji časovni točki doseže primerljiv delež sproščene učinkovine s SE LS, SE LV in SE CP. Glede na vrednosti  $T_{80}$  pri 100 rpm, se vzorci razvrščajo v naslednjem vrstnem redu:

SE LS < SE LV < SE CP < SE HS < SE FP ~ SE Standard ~ SE HV.

Pri tem največjo razliko v  $T_{80}$  opazimo med vzorcema SE HV in SE LS, ki znaša 2,5 h. Kljub tej razliki, pa sta si profila sproščanja glede na faktor podobnosti  $f_2$  še vedno med seboj podobna ( $f_2=54,29$ ).

- **50 rpm / proizvajalec Shin Etsu**

Pri tabletah, testiranih pri 50 rpm, so profili do 2h povsem prekriti (Graf 4). Iz tega lahko sklepamo, da je hitrost tvorbe hidrofilnega sloja pri posameznih tipih HPMC tablet, primerljiva. Tudi tu vzorec SE LS nekoliko pospeši sproščanje, njegov profil pa sovпада s SE CP. Profili sproščanja SE Standard, SE LV, SE FP, SE HS in SE HV se skoraj povsem prekrivajo, le pri SE HV opazimo nekoliko nižji končni delež sproščene učinkovine. Glede na vrednosti  $T_{80}$  pri 50 rpm, se vzorci razvrščajo v naslednjem vrstnem redu:

SE LS ~ SE CP < SE FP < SE Standard ~ SE LV ~ SE HS < SE HV.

Tako pri 100 rpm, kot tudi pri 50 rpm opazimo največjo razliko med  $T_{80}$  vrednostnima pri vzorcih SE LS in SE HV in sicer je sproščanje iz tablet SE LS za 2,3 h hitrejše v primerjavi s SE HV. Profila pa sta si kljub razliki med seboj podobna ( $f_2=61,56$ ).

Glede na vrednosti  $T_{50}$  in  $T_{80}$ , določenih pri 50 rpm in 100 rpm, lahko zaključimo, da hitrost vrtenja vesel nima izrazitega vpliva na hitrost in delež sproščene učinkovine. Časi, v katerih se pri 50 rpm in 100 rpm, sprosti 50 % oz. 80 % učinkovine, so namreč primerljivi ( $p>0,05$ ) (Preglednica X, Preglednica XI). Na hitrost vrtenja vesla je najbolj občutljiva formulacija s SE LV in sicer višja kot je hitrost vrtenja vesla, hitrejše je sproščanje učinkovine. Višja hitrost vrtenja mešal, se odraža tudi v nekoliko višjih standardnih deviacijah, le-te se povprečno zvišajo iz 2,76 na 3,51.

Tako pri  $T_{50}$  kot tudi pri  $T_{80}$  najhitrejši profil sproščanja izkazuje SE LS. Pri vrednosti  $T_{50}$  se učinkovina najpočasneje sprošča iz ogrodnih tablet SE HS, pri  $T_{80}$  pa iz ogrodnih tablet SE HV. To lahko razložimo z vidika hidrofobnosti HPMC polimera. Tip SE HS namreč vsebuje večje število HPO substituent, ki prispevajo k večji hidrofobnosti, kar lahko pomeni manjši transport vode v gelski sloj ter posledično tudi manjše nabrekanje polimera. Zaradi omejene količine vode, ki je na razpolago za raztapljanje vgrajene ZU, je sproščanje ZU počasnejše. V primeru SE HV, pa lahko razlog za počasnejše sproščanje v času  $T_{80}$  pripišemo viskoznosti polimera. Zaradi višje viskoznosti, se ob stiku polimer/medij na površini tablete tvori čvrst gelski sloj, pri katerem raztapljanje in odpletanje polimernih verig poteka počasneje, erozijska

odpornost gela pa je večja. Zaradi višje viskoznosti gela, je upočasnjena tudi difuzija ZU iz HPMC tablete v okoliški medij.

**Preglednica X:** Rezultati t-testa odvisne spremenljivke T50 od hitrosti vrtenja mešala (50 rpm/100 rpm), proizvajalec Shin Etsu.

| 50 rpm_T50/100 rpm_T50 | P     |
|------------------------|-------|
| SE LV                  | 0,186 |
| SE HV                  | 0,329 |
| SE LS                  | 0,405 |
| SE HS                  | 0,524 |
| SE FP                  | 0,601 |
| SE CP                  | 0,695 |
| SE Standard            | 0,847 |

**Preglednica XI:** Rezultati t-testa odvisne spremenljivke T80 od hitrosti vrtenja mešala (50 rpm/100 rpm), proizvajalec Shin Etsu.

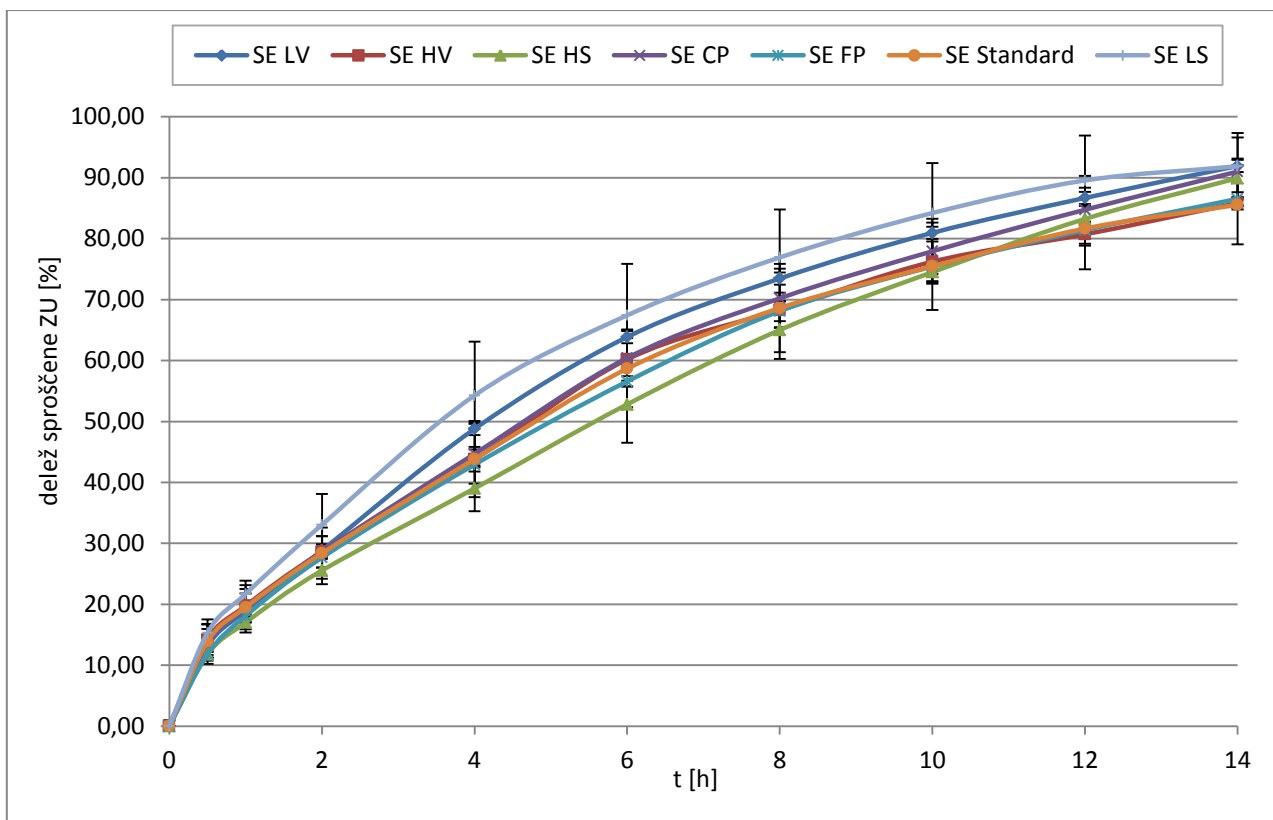
| 50 rpm_T80/100 rpm_T80 | p     |
|------------------------|-------|
| SE LV                  | 0,090 |
| SE HV                  | 0,272 |
| SE LS                  | 0,552 |
| SE HS                  | 0,768 |
| SE FP                  | 0,788 |
| SE CP                  | 0,472 |
| SE Standard            | 0,648 |

100 rpm T80 : SE LS < SE LV < SE CP < SE HS < SE FP ~SE Standard < SE HV.

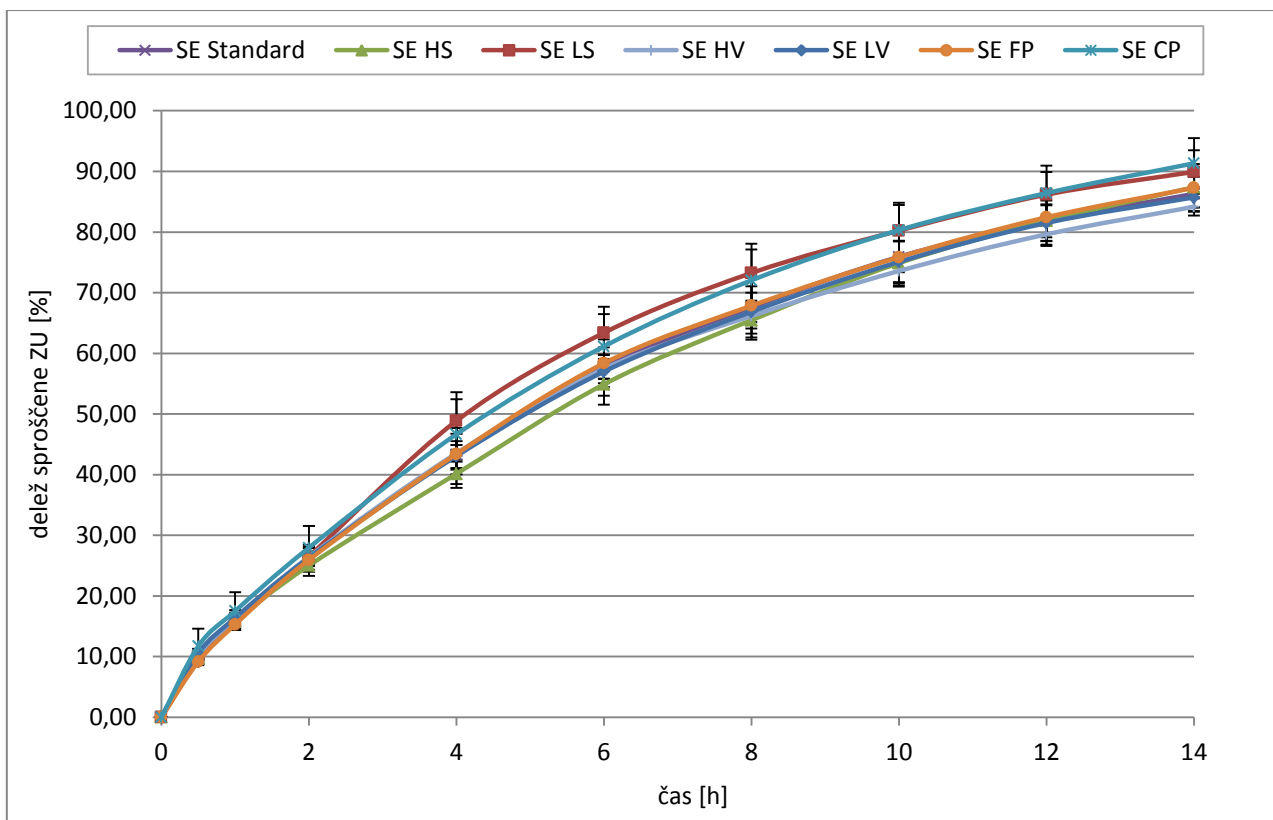
50 rpm T80: SE LS ~ SE CP < SE FP < SE Standard~ SE LV ~SE HS < SE HV.

50 rpm T50: SE LS < SE CP < SE FP ~ SE Standard~ SE LV ~SE HV < SE HS.

100 rpm T50: SE LS < SE LV < SE CP ~ SE HV ~SE Standard < SE FP < SE HS.



**Graf 3:** Profili sproščanja iz formulacij s 25 % HPMC polimera, proizvajalca Shin Etsu; profili predstavljajo potek sproščanja ZU pri hitrosti vrtenja mešal 100 rpm, na aparaturi USP II.



**Graf 4:** Profili sproščanja ZU iz formulacij s 25 % HPMC polimera, proizvajalca Shin Etsu; profili predstavljajo potek sproščanja ZU pri hitrosti vrtenja mešal 50 rpm, na aparaturi USP II.

- **100 rpm/ proizvajalec Dow**

Pri hitrosti vrtenja mešal 100 rpm, se profili sproščanja razvrščajo v širokem območju (Graf 5). Tako pri tabletah izdelanih iz QbD HPMC vzorcev proizvajalca Shin Etsu, kot tudi pri tabletah izdelanih iz QbD HPMC vzorcev proizvajalca Dow, se učinkovina najhitreje sprošča iz tablet, narejenih iz HPMC polimera z nizko stopnjo substitucije. Profilu CC LS, po hitrosti sproščanja, sledita CC Central point in CC HPS, ki se v določenih časovnih točkah deloma prekrivata. Ostali vzorci izkazujejo nekoliko počasnejši profil sproščanja in jih lahko, ob upoštevanju vrednosti  $T_{80}$  pri 100 rpm, skupaj z ostalimi vzorci razvrstimo v sledečem vrstnem redu:

CC LS < CC Central point < CC LPS < CC HS < CC LV < CC HPS < CC HV.

Največjo razliko v hitrosti sproščanja ponovno opazimo med CC LS in CC HV. Ta glede na vrednost  $T_{80}$  znaša 5,6 h, kar je v primerjavi s SE LS in SE HV, dvakratna razlika. Faktor podobnosti med profiloma CC LS in CC HV znaša  $f_2=41,83$ . To pomeni, da ti dve formulaciji, glede na faktor podobnosti, dajeta signifikantno različen profil sproščanja. Na podlagi tega lahko pričakujemo, da je sproščanje ZU v telesu bistveno drugačno, taka razlika pa pomeni tudi ne-bioekvivalentnost obeh formulacij.

### **50 rpm/ proizvajalec Dow**

Z znižanjem hitrosti vrtenja vesel iz 100 rpm na 50 rpm, se razlike v hitrosti sproščanja med posameznimi serijami tablet zmanjšajo. Vrstni red po katerem se glede na  $T_{80}$  pri 50 rpm razvrščajo profili je sledeč:

CC LS < CC HPS < CC HV < CC HS < CC LV < CC LPS ~ CC Central point.

Izkazalo se je, da ima CC LS ponovno najhitrejši profil sproščanja. Iz grafičnega prikaza (*Graf 6*) je tudi razvidno, da v primerjavi z preostalimi profili, po hitrosti sproščanja nekoliko izstopa profil CC HPS. Najpočasnejše sproščanje učinkovine opazimo iz ogrodnih tablet CC Central point, pri katerih bi pričakovali vmesni profil sproščanja. Torej je razlika med najhitrejšim in najpočasnejšim profilom sproščanja, CC LS in CC Central point, pri  $T_{80}$  3,6 h. Faktor podobnosti znaša  $f_2=47,91$  kar pomeni, da sta si profila med seboj različna, formulaciji pa nebioekvivalentni.

S t-testom (Preglednica XII, Preglednica XIII) smo preverili ali ima različna hitrost vrtenja mešal vpliv na hitrost sproščanja ZU. Iz izračunanih p-vrednosti pri  $T_{50}$  (CC HV, CC Central point) in  $T_{80}$  (CC LV, CC HV, CC HPS in CC Central point) vidimo, da med časi, v katerih se pri 50 rpm in 100 rpm, sprosti 50 % oz. 80 % učinkovine, obstajajo statistično značilne razlike ( $p<0,05$ ).

**Preglednica XII:** Rezultati t-testa odvisne spremenljivke T50 od hitrosti vrtenja mešala 50 rpm/100 rpm, proizvajalec Dow.

| 50 rpm_T50/100 rpm_T50 | P     |
|------------------------|-------|
| CC LV                  | 0,489 |
| CC HV                  | 0,010 |
| CC LS                  | 0,158 |
| CC HS                  | 0,421 |
| CC HPS                 | 0,073 |
| CC LPS                 | 0,296 |
| CC Central point       | 0,009 |

**Preglednica XIII:** Rezultati t-testa odvisne spremenljivke T80 od hitrosti vrtenja mešala 50 rpm/100 rpm, proizvajalec Dow.

| 50 rpm_T80/100 rpm_T80 | p     |
|------------------------|-------|
| CC LV                  | 0,035 |
| CC HV                  | 0,014 |
| CC LS                  | 0,140 |
| CC HS                  | 0,271 |
| CC HPS                 | 0,025 |
| CC LPS                 | 0,203 |
| CC Central point       | 0,024 |

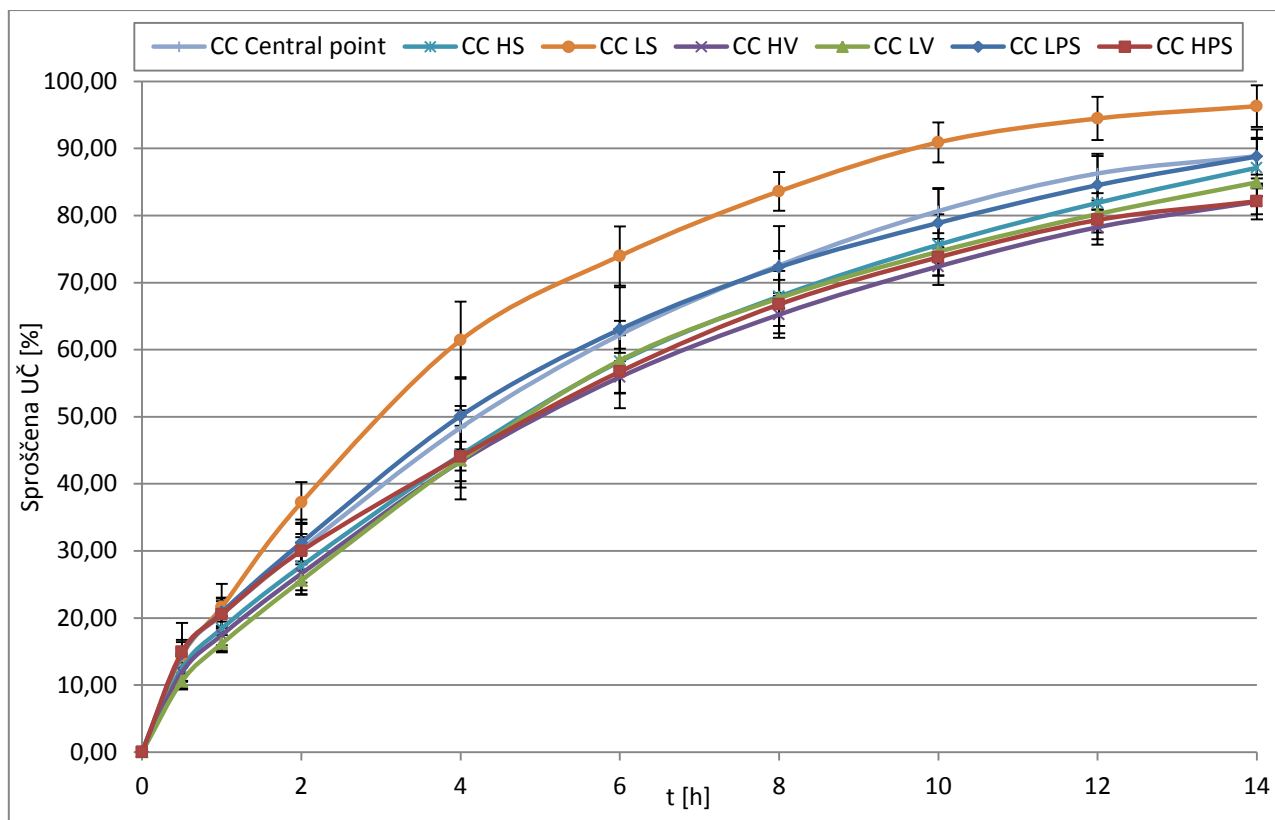
100 rpm T80 : CC LS < CC Central point < CC LPS < CC HS < CC LV < CC HPS < CC HV.

50 rpm T80: CC LS < CC HPS < CC HV < CC HS < CC LV < CC LPS ~ CC Central point.

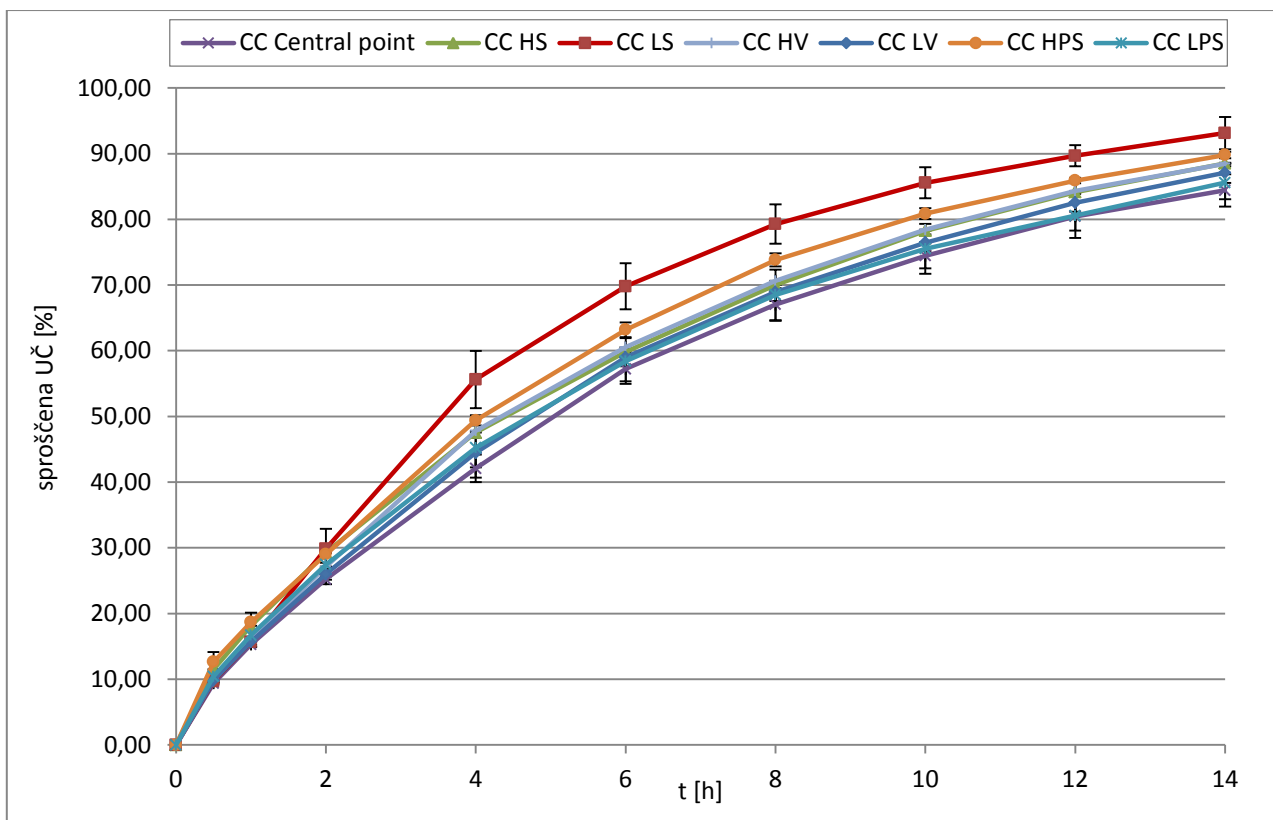
100 rpm T50: CC LS < CC LPS < CC Central point < CC HS ~ CC LV ~ CC HPS < CC HV

50 rpm T50: CC LS < CC HPS < CC HV ~ CC HS < CC LPS ~ CC LV < CC Central point





**Graf 5:** Profili sproščanja iz formulacij s 25 % HPMC polimera, proizvajalca Dow; profili predstavljajo potek sproščanja ZU pri hitrosti vrtenja mešal **100 rpm**, na aparaturi USP II.



**Graf 6:** Profili sproščanja iz formulacij s 25 % HPMC polimera, proizvajalca Dow; profili predstavljajo potek sproščanja ZU pri hitrosti vrtenja mešal 50 rpm, na aparaturi USP II.

S spremembo hitrosti vrtenja mešalnih elementov, se znotraj posode za raztapljanje spremenijo hidrodinamski pogoji (32). Pri tabletah, testiranih pri 100 rpm, smo v začetni fazi testa opazili odplavljanje polimera s površine tablet. To lahko pripišemo močnejšim strižnim silam, ki se pri višjih hitrostih vrtenja mešala ustvarijo na dnu posode za raztapljanje. Zato je tvorba enakomernega gelskega sloja, ki nadzira sproščanje učinkovine iz ogrodja tablete, otežena, posledica pa so višje standardne deviacije. Čeprav vpliv hitrosti vrtenja mešal na samo sproščanje učinkovine ni izrazit, opazimo, da se profili sproščanja pri 100 rpm razvrščajo v drugačnem vrstnem redu, kot pri 50 rpm. Rezultati t-testov (Preglednica X, Preglednica XI in Preglednica XII, Preglednica XIII) pa kažejo tudi na to, da so na spremembo hitrosti vrtenja mešal bolj občutljive ogrodne tablete narejene iz HPMC polimerov proizvajalca Dow. Kljub nekaterim statističnim razlikam, ki so se izrazile med HPMC vzorci,

pa iz izračunanih vrednosti faktorjev podobnosti ( $f_2$ ) vidimo, da so si profili sproščanja glede na tip uporabljenega HPMC polimera med seboj podobni (Preglednica XIV).

**Preglednica XIV:** Faktor podobnosti med hidrofilnimi tabletami, narejenih iz SE HPMC in CC HPMC, pri 50 rpm in 100 rpm.

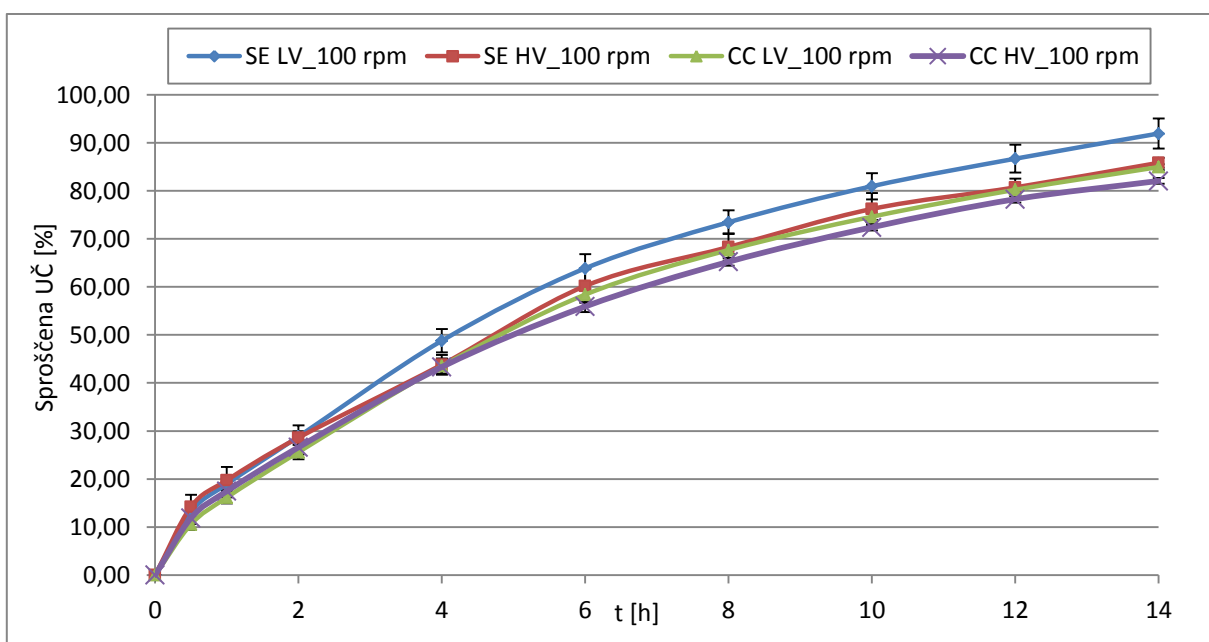
| Vzorci HPMC                    | 50 rpm $f_2$ | 100 rpm $f_2$ |
|--------------------------------|--------------|---------------|
| SE Standard / CC Central point | 91,20        | 68,74         |
| SE HS / CC HS                  | 65,70        | 71,90         |
| SE LS / CC LS                  | 62,96        | 60,38         |
| SE HV / CC HV                  | 69,45        | 75,26         |
| SE LV / CC LV                  | 87,33        | 62,50         |
| SE FP / CC HPS                 | 65,22        | 86,11         |
| SE CP / CC LPS                 | 71,18        | 76,06         |

#### **4.2.2 Vpliv viskoznosti na hitrost sproščanja dobro topne učinkovine**

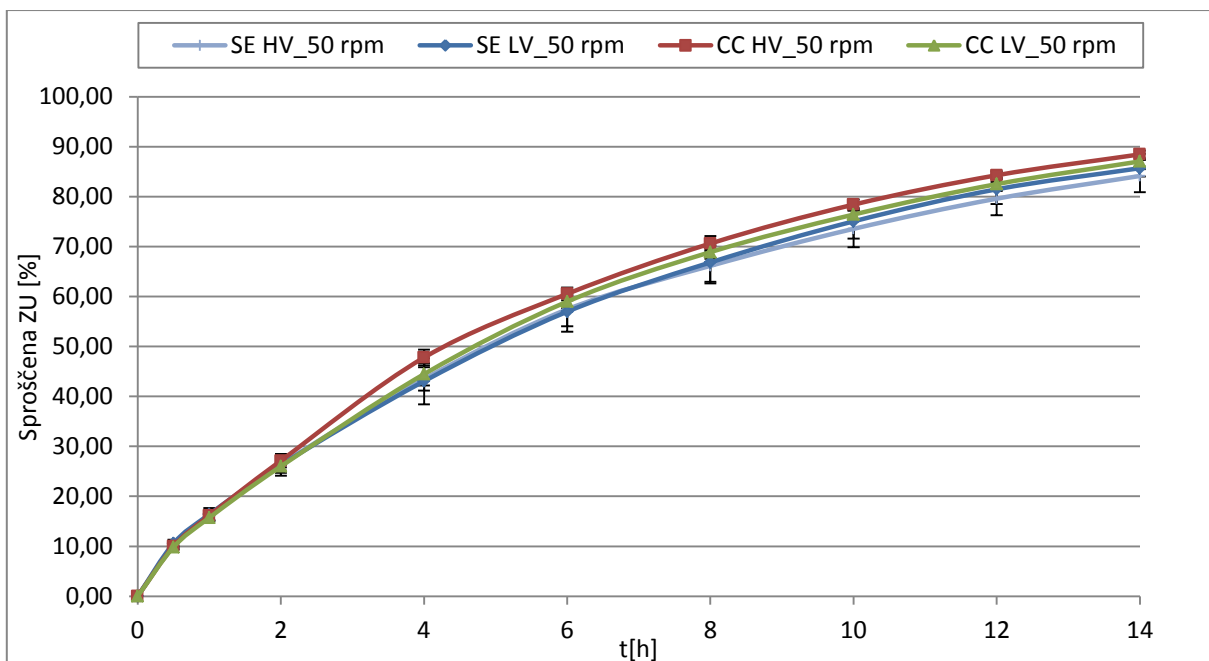
Hidrofilne ogrodne tablete, ki jih tvori HPMC polimer z višjo molekulsko maso oziroma viskoznostjo, bodo ob stiku z vodnim medijem tvorile močnejši in erozijsko bolj odporen gel, ter izkazovale počasnejše sproščanje ZU iz ogrodja tablete (7).

Na podlagi viskoznosti, podanih s strani proizvajalcev bi tako pričakovali, najhitrejšje sproščanje ZU iz tablet SE LV in CC LV, katerih ogrodje tvori tip HPMC polimera z nizko viskoznostjo, najpočasnejše sproščanje pa iz tablet SE HV in CC HV, ki jih tvori polimer z najvišjo navidezno viskoznostjo. V nasprotju s pričakovanji, smo najhitrejši profil sproščanja opazili pri HPMC tabletah z nizko stopnjo substitucije, SE LS in CC LS, medtem ko so tablete SE LV in CC LV, v primerjavi z ostalimi vzorci, izkazovale vmesni profil sproščanja. Proizvajalec Shin Etsu ima glede na proizvajalca Dow, širše postavljene specifikacijske meje, tako za viskoznost, kot za stopnjo substitucije. Zato smo pričakovali večjo variabilnost v sproščanju učinkovine med posameznimi tabletami narejenih iz QbD HPMC vzorcev proizvajalca Shin Etsu. V praksi pa se je izkazalo ravno nasprotno, kar pomeni, da širše

postavljene specifikacije nujno še ne pomenijo večje variabilnosti med vzorci. Torej kljub temu, da je bilo sproščanje iz tablet SE HV in CC HV, v vseh primerih z izjemo CC Central point pri 50 rpm, najpočasnejše lahko zaključimo, da zgolj na osnovi podatkov o navidezni viskoznosti polimera, podanih s strani proizvajalca, ne moremo predvideti hitrost in poteka sproščanja učinkovine iz HPMC ogrodnih tablet. Sproščanje učinkovine iz tablet, ki vsebujejo HPMC različnih viskoznosti HPMC polimera na sproščanje dobro topne ZU, pri različni hitrosti vrtenja mešal, prikazujeta Graf 7 in Graf 8.



**Graf 7:** Vpliv viskoznosti HPMC polimera na sproščanje ZU iz HPMC ogrodnih tablet, pri hitrosti vrtenja mešal 100 rpm.



**Graf 8:** Vpliv viskoznosti HPMC polimera na sproščanje ZU iz HPMC ogrodnih tablet, pri hitrosti vrtenja mešal 50 rpm.

#### **4.2.3 Vpliv stopnje substitucije na sproščanje dobro topne učinkovine**

Preučevani QbD HPMC vzorci substitucijske stopnje 2208 in navidezne viskoznosti 4000 mPas, se med seboj razlikujejo tudi v povprečnem deležu hidroksipropilnih substituent (% HPO), kar prikazujeta Preglednica III in Preglednica IV. Pri vzorcih proizvajalca Dow, povprečni deleži HPO skupin variirajo med 8 % in 10,2 % (m/m), medtem ko je substituiranost pri vzorcih proizvajalca Shin Etsu v povprečju nekoliko višja, deleži HPO substituent pa se gibljejo med 8,1% in 10,7 % (m/m). V obeh primerih deleži hidroksipropilnih substituent ustrezajo farmakopejsko postavljenim mejam, ki po ameriški farmakopeji USP za substitucijski tip 2208, znašajo 4-12 % (m/m) (33). Med testiranimi vzorci sta najbolj substituirana vzorca SE HS in CC HS, najnižji delež HPO skupin pa imata SE LS in CC LS. Sproščanja ZU iz pripravljenih ogrodnih tablet, prikazujeta *Graf 9* in *Graf 10*.

Skupaj z ostalimi vzorci se glede na % HPO, razvrščajo v naslednjem vrstnem redu:

Shin- Etsu: SE HS > SE HV = SE LV > SE Standard > SE CP > SE FP > SE LS

Dow: CC HS > CC HPS > CC HV > CC LPS ~ CC Central point ~ CC LV > SE LS

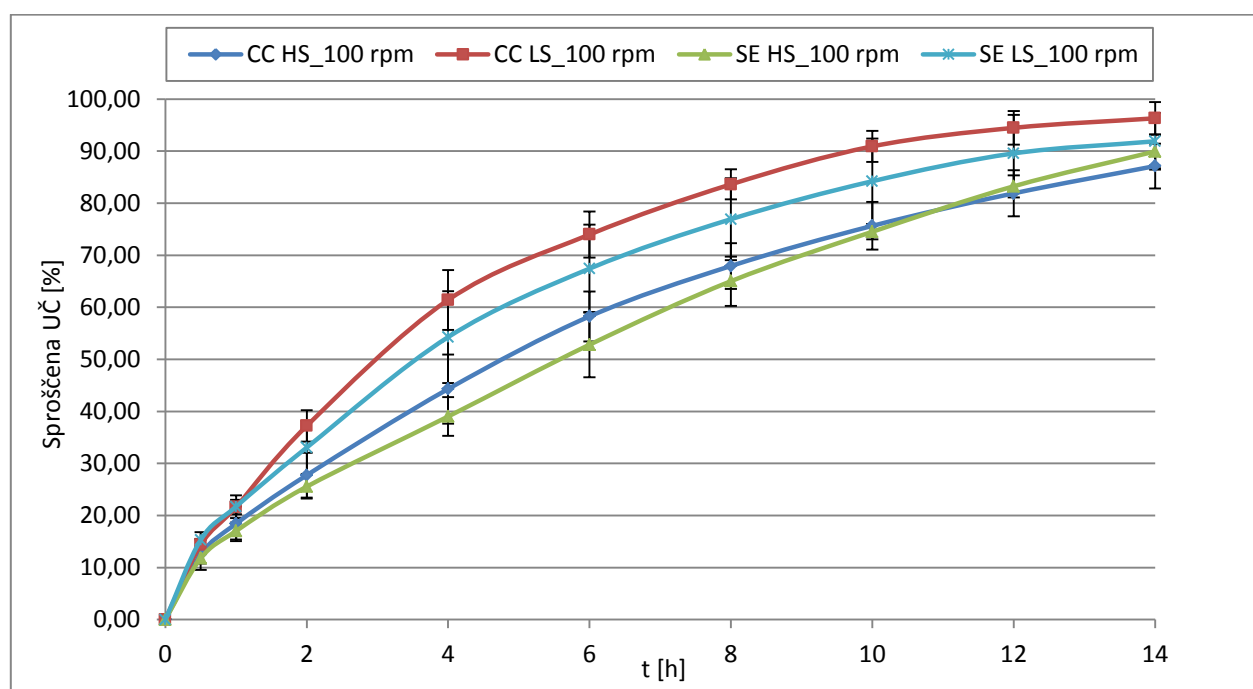
Na hidrofilne lastnosti HPMC polimera in posledično na temperaturo geliranja ima poleg stopnje in vrste substitucije pomemben vpliv tudi razmerje med metoksi (% MeO) in hidroksipropoksi (% HPO) skupinama. Obe skupini sicer prispevata k večji hidrofobnosti polimera, od njunega razmerja pa so odvisne interakcije, ki se vzpostavijo na nivoju polimer-topilo in polimer-polimer. Od teh interakcij je odvisno tudi obnašanje polimera ob stiku z vodnim medijem in posledično sproščanje učinkovine iz ogrodja tablete. Z višanjem % HPO skupin, se manjša moč nastalega gela, kar gre pripisati predvsem steričnemu učinku HPO skupin, zaradi katerega se povečujejo razdalje med sosednjimi polimernimi verigami. Sterične ovire preprečujejo hidrofobne interakcije med MeO skupinami, ter posledično ovirajo interakcije polimer-polimer, kar vodi do tvorbe šibkejšega gela in povišanje temperature geliranja (34).

Ob stiku polimernega ogrodja z vodnim medijem je ključnega pomena tudi hitra tvorba gelskega sloja (~5 min), ki preprečuje takojšnje sproščanje učinkovine. Ker so povprečni profili sproščanja do 2 h skoraj povsem poravnani, predvidevamo, da začetna hitrost tvorbe gela ni razlog za razlike v hitrost sproščanja učinkovine, v nadaljnjih časovnih točkah.

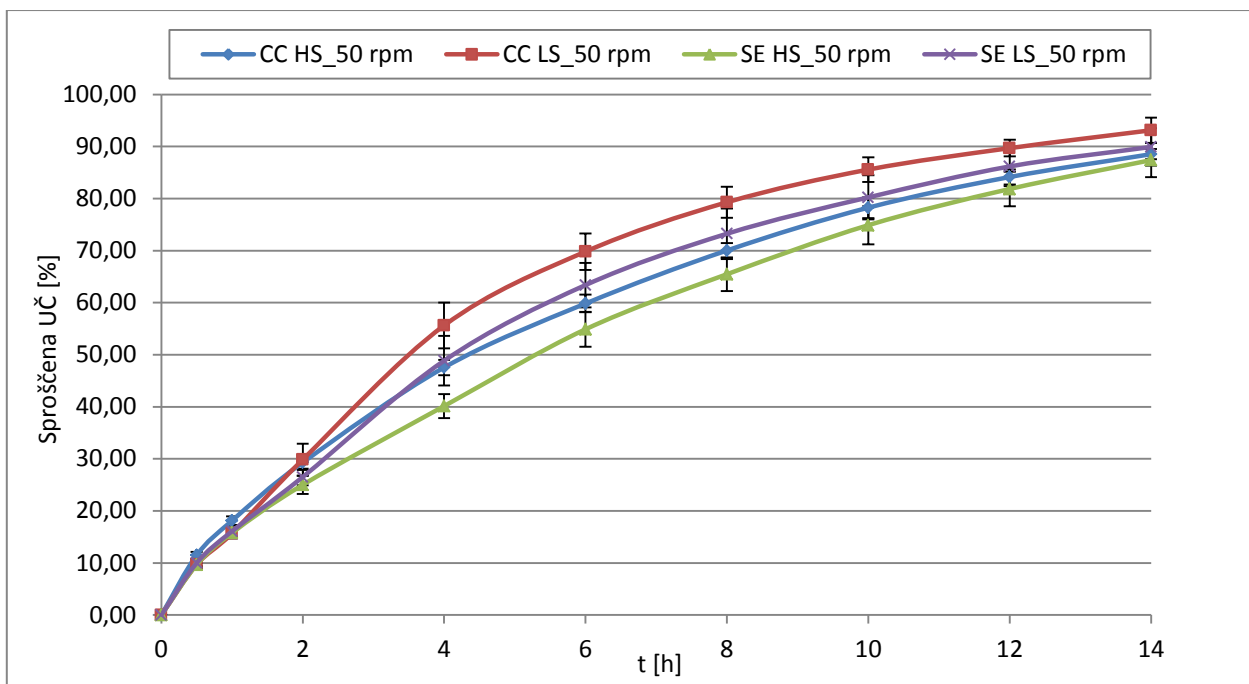
Sproščanje v vodi dobro topnih zdravilnih učinkovin primarno poteka z mehanizmom difuzije raztopljene zdravilne učinkovine iz ogrodja tablete. Uporabljena učinkovina, propranololjev klorid, je v vodi dobro topna, torej je njeno sproščanje pogojeno tudi s hitrostjo vstopa vode v ogrodje HPMC tablete. Najhitrejši profil sproščanja opazimo pri formulaciji izdelani z najnižjim deležem HPO skupin, torej pri SE LS in CC LS (Graf 3-6). Predvidevamo, da je do slednjega prišlo zaradi večjega vstopa vode v začetni fazi testa sproščanja, saj se nižja HPO substituiranost, odraža v višji hidrofilnosti HPMC polimera. Zaradi dobre topnosti ZU je tudi večja verjetnost pojava hipnega sproščanje učinkovine, pri katerem gre predvsem za raztapljanje delcev učinkovine, ki se nahajajo blizu površine tablete. Ker pa učinkovina deluje tudi kot tvorilec por, lahko preko le teh, ob nezadostni hitrosti vzpostavitve barijerne plasti polimera, voda neovirano prehaja v notranjost tablete in raztaplja vgrajeno učinkovino, kar posledično pomeni višjo koncentracijo raztopljene učinkovine v gelski fazi ter večjo hitrost difuzije ZU iz ogrodja tablete. Na geliranje HPMC polimera pa ima velik vpliv tudi prisotnost

ZU. V primeru propranololijevega klorida je prisotno »vsoljevanje« polimera, kar se odraža na večji topnosti polimera, višji temperaturi sol-gel prehoda in manjši moči nastalega gela.

Za boljše razumevanje vpliva stopnje substitucije na sproščanje ZU, bi bilo poleg povprečnih vrednosti HPO substituent, smiselno poznati še nekatere druge strukturne značilnosti, kot sta substituiranost anhidroglukoznih enot in porazdelitev substituent vzdolž celotne verige, saj imata ti dve lastnosti pomemben vpliv na moč nastalega gela in hitrost sproščanja učinkovine (34).



**Graf 9:** Vpliv stopnje substitucije HPMC polimera na sproščanje ZU iz HPMC ogrodnih tablet, pri hitrosti vrtenja mešal 100 rpm.



**Graf 10:** Vpliv stopnje substitucije HPMC polimera na sproščanje ZU iz HPMC ogrodnih tablet, pri hitrosti vrtenja mešal 50 rpm.

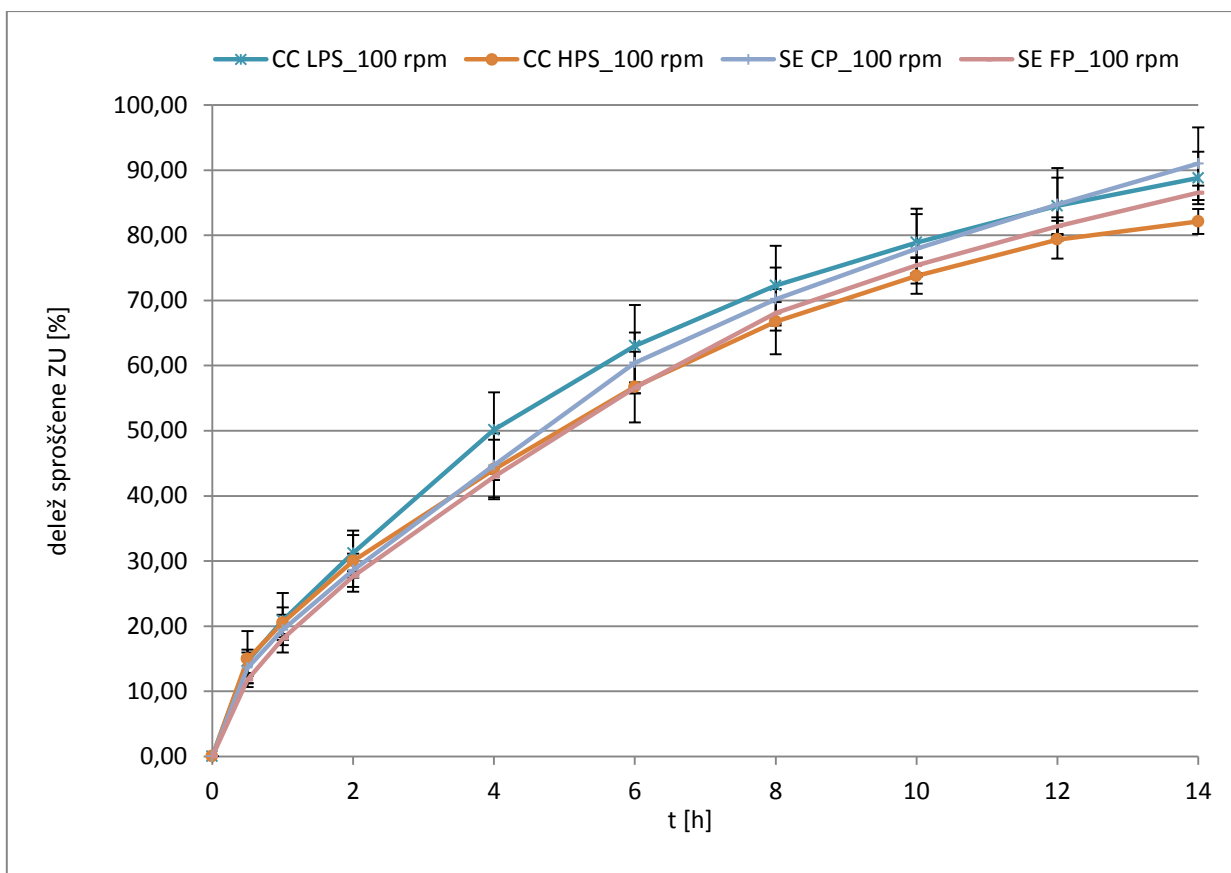
#### **4.2.4 Vpliv velikosti delcev polimera na sproščanje dobro topne učinkovine**

Pri preučevanju vpliva velikosti delcev na hitrost sproščanja učinkovine iz pripravljenih HPMC ogrodnih tablet se je izkazalo, da ta parameter nima izrazitega vpliva. Skladno s pričakovanji, se v primeru hitrosti vrtenja mešal 100 rpm, učinkovina nekoliko hitreje sprošča iz tablet, ki jih tvorijo polimerni delci večjih velikosti (CC LPS in SE CP), medtem ko je bilo sproščanje ZU v primeru manjših delcev polimera (CC LPS in SE FP) počasnejše (Graf 11). Razlog za to so razlike v hitrost tvorbe gelske plasti. Manjši delci se v primerjavi z večjimi hidratirajo hitreje, kar pomeni hitrejši nastanek gelskega sloja, ki je v primeru manjših delcev bolj homogen, sproščanje ZU pa je tako počasnejše (8). Velikosti delcev posameznih HPMC tipov prikazujeta Preglednica III in Preglednica IV.

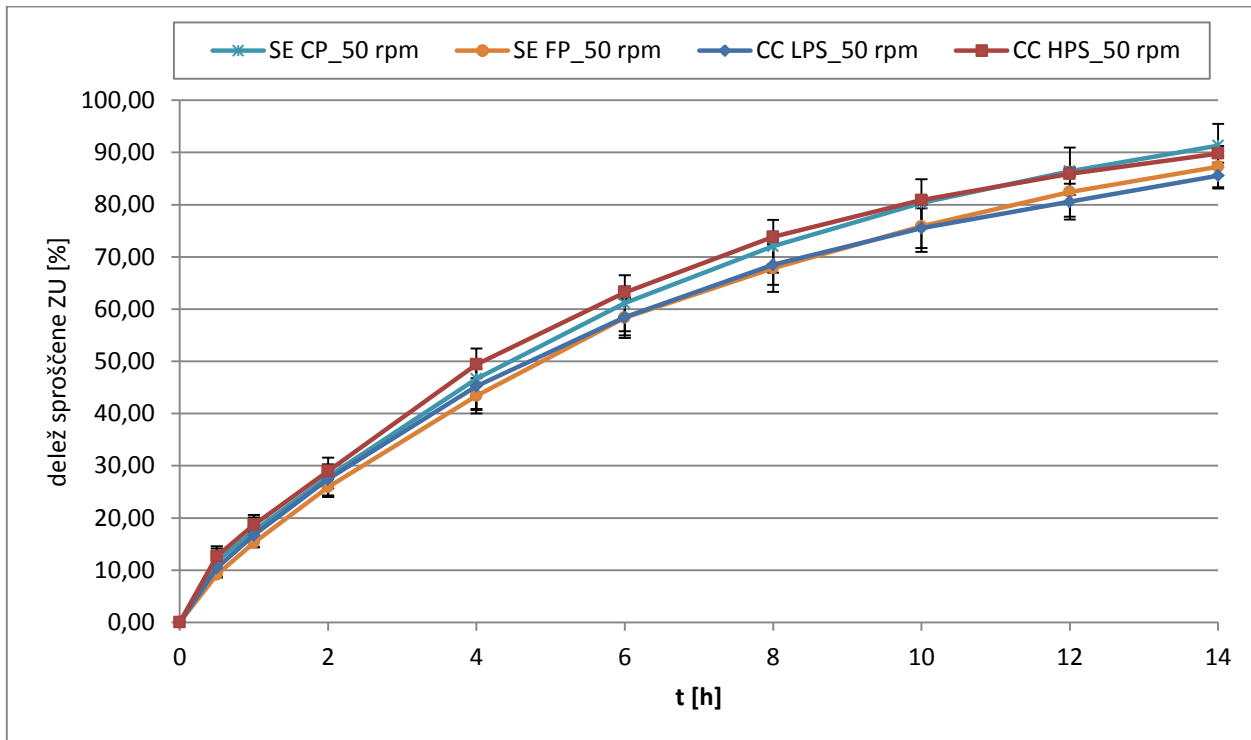
Kljub tej razliki so si profili, glede na faktor podobnosti ( $f_2 > 50$ ), med seboj podobni. Kriteriju za podobnost ( $f_2 > 50$ ) ustrezajo tudi povprečni profili sproščanja, katerih tablete smo testirali



pri nižji hitrosti vrtenja mešal. Razlika, ki jo opazimo v primerjavi s profili pri 100 rpm je predvsem ta, da se v primeru vzorcev proizvajalca Dow, učinkovita hitreje sprošča iz tablet z manjšimi delci polimera CC HPS, kot iz tablet z večjimi delci polimera CC LPS (Graf 12). Ker so velikosti delcev v analiznih certifikatih (Preglednica II in Preglednica III) podane v različnih merskih enotah ( $\mu\text{m}$  in % skozi 230 US sito) med seboj ne moremo primerjati velikosti delcev v enakih enotah in hkrati primerjati profile sproščanja obeh proizvajalcev oz. vpliv velikosti delcev na hitrost sproščanja ZU.



**Graf 11:** Vpliv velikosti delcev na sproščanje ZU iz HPMC ogrodnih tablet, pri hitrosti vrtenja mešal 100 rpm.



**Graf 12:** Vpliv velikosti delcev na sproščanje ZU iz HPMC ogrodnih tablet, pri hitrosti vrtenja mešal 50 rpm.

Bolj kot na samo hitrost sproščanja učinkovine, velikost HPMC delcev vpliva na ponovljivost med posameznimi paralelkami. Ta je slabša v primeru večjih delcev, kar se odraža v višjih standardnih deviacijah.

Številni avtorji so v svojih delih raziskovali, kakšna je povezava med velikostjo HPMC delcev in sproščanjem učinkovine iz hidrofilnih ogrodnih tablet. Ugotovili so, da je vpliv velikosti tesno povezan s koncentracijo HPMC polimera, ki tvori ogrodje tablete. V primeru, ko se z deležem polimera nahajamo nad perkolacijskim pragom, je vpliv velikosti delcev zanemarljiv. V primeru, ko pa je vsebnost polimera v formulaciji prenizka in se nahajamo pod perkolacijskim pragom, pa se razlike v velikosti delcev odražajo na profilih sproščanja učinkovine (20). Glede na to, da razlike v sproščanju med velikimi in majhnimi delci niso izrazite, predvidevamo, da se s 25 % HPMC polimera nahajamo nad perkolacijskim pragom, kar deloma pojasnjuje majhen vpliv velikosti delcev na sproščanje učinkovine.

### 4.3. Reološke meritve

#### **4.3.1. Navidezna viskoznost HPMC raztopin**

Iz QbD HPMC vzorcev smo pripravili 4 % (m/m) vodne raztopine ter jim pri temperaturi 20 °C s pomočjo rotacijskega viskozimetra, v območju strižnih hitrosti 0,01 s<sup>-1</sup>- 100 s<sup>-1</sup>, določili navidezno viskoznost. Meritve smo izvajali v dveh paralelkah.

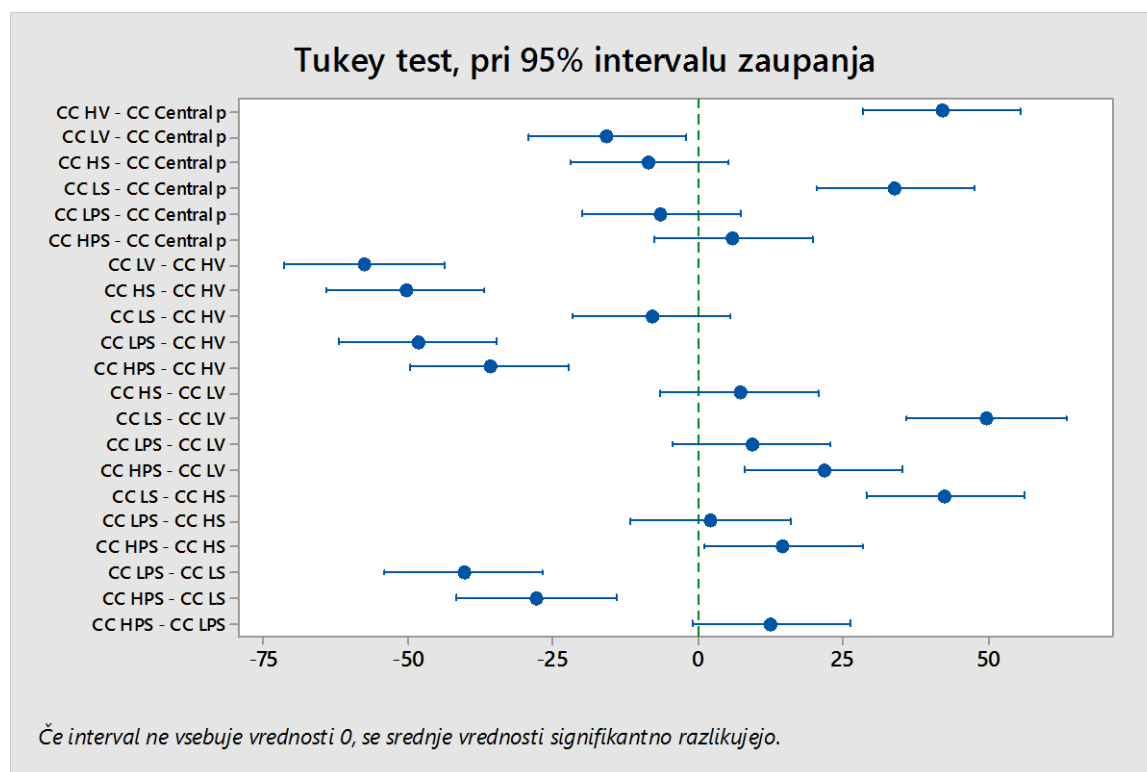
Za statistično analizo pridobljenih rezultatov smo uporabili statistično metodo ANOVA oz. analizo variance. Vrednosti, ki smo jih pri tem uporabili ustrezajo povprečni vrednosti navidezne viskoznosti pri strižni hitrosti 0,1 [s<sup>-1</sup>]. Na podlagi statističnih rezultatov smo želeli ugotoviti, ali obstaja razlika med posameznimi vzorci. Rezultati so pokazali, da povprečne vrednosti vzorcev niso enake, zato smo v nadaljevanju preverili, kateri so tisti QbD HPMC vzorci, ki se v povprečni vrednosti navidezne viskoznosti razlikujejo med seboj. Uporabili smo *post-hoc* (p<0.05) *Tukey test* in s tem pridobili podatke o variabilnosti med vzorci posameznega proizvajalca.

- **Proizvajalec Dow**

Med vzorci proizvajalca Dow obstajajo razlike v povprečnih vrednostih navidezne viskoznosti HPMC raztopin (p=0,000), saj je p-vrednost ≤ 0,05. Poleg tega pa je variabilnost med vzorci večja, kot znotraj samih vzorcev. Iz tega sledi, da so aritmetične sredine vzorcev statistično značilno različne.

S *Tukey* testom, ob upoštevanju 95 % intervala zaupanja, smo pridobili podatke o razlikah v srednji vrednostih za vseh 21 parov vzorcev, kar prikazuje Slika 8. Za vse intervale, ki ne vsebujejo vrednosti 0, lahko trdimo, da obstaja verjetnost, da se ti pari vzorcev med seboj statistično pomembno razlikujejo. Glede na srednje vrednosti, lahko vzorce razporedimo v 4 različne skupine, ki smo jih označili s črkami od A do D (Preglednica XV). Vzorca iz skupine A (CC HV, CC LS), vzorec iz skupine B (CC HPS) in vzorec iz skupine D (CC LV) ne pripadajo nobeni drugi skupini, torej se statistično pomembno razlikujejo od ostalih vzorcev.

Ostali vzorci, kot so CC Central point, ki pripada skupini B in C, vzorec CC LPS, ki pripada skupinam B,C,D in vzorec CC HS, ki pripada skupini C in D, pripadajo več kot eni skupini, kar pomeni, da razlike med srednjimi vrednostmi teh vzorcev niso statistično pomembne.

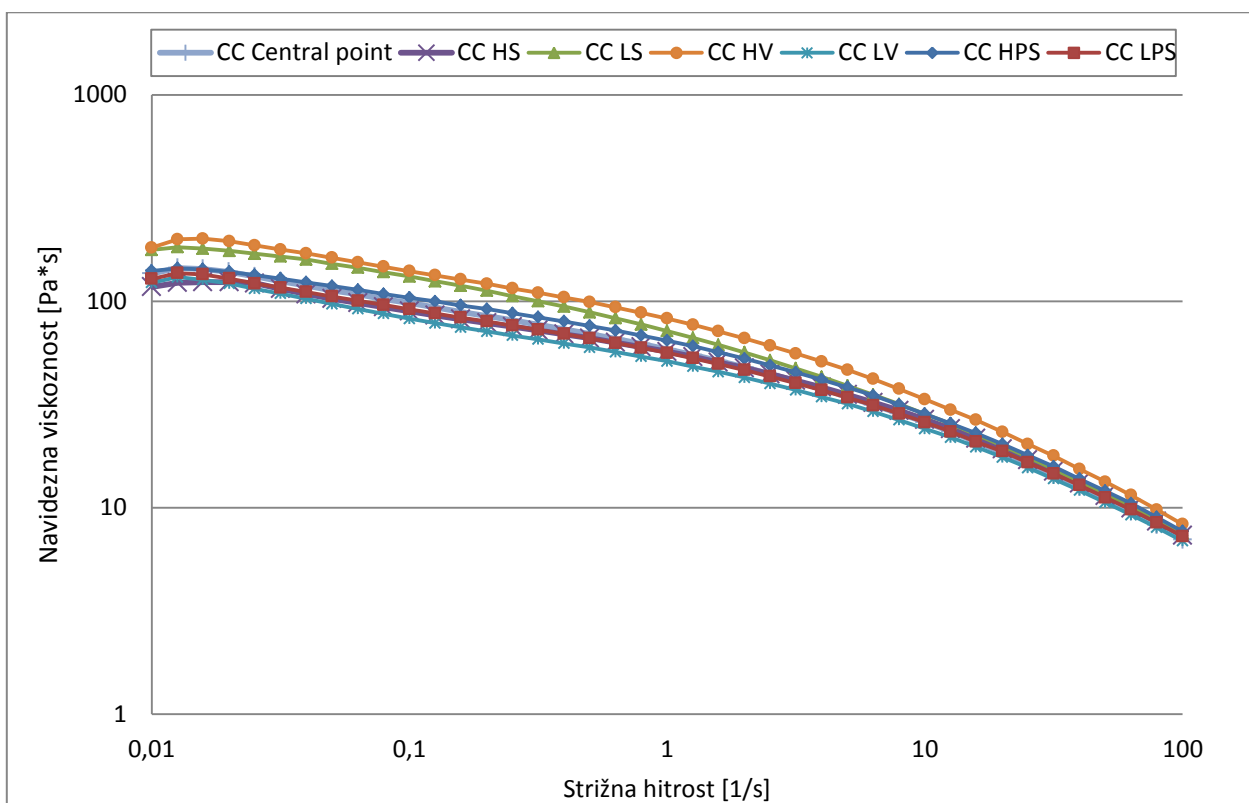


**Slika 8:** Razlike v srednjih vrednostih navidezne viskoznosti različnih parov QbD HPMC vzorcev proizvajalca Dow, ugotovljene s Tukey testom ob 95 % intervalu zaupanja, ter pri strižni hitrosti 0,1 [1/s].

**Preglednica XV:** Srednje vrednosti navidezne viskoznosti, označene z različnimi črkami, se med seboj statistično značilno razlikujejo pri 95 % intervalu zaupanja (proizvajalec Dow).

| Vzorec           | N | Srednja vrednost | Skupine      |
|------------------|---|------------------|--------------|
| CC HV            | 2 | 140              | <b>A</b>     |
| CC LS            | 2 | 132              | <b>A</b>     |
| CC HPS           | 2 | 104              | <b>B</b>     |
| CC Central point | 2 | 98,1             | <b>B C</b>   |
| CC LPS           | 2 | 91,55            | <b>B C D</b> |
| CC HS            | 2 | 89,5             | <b>C D</b>   |
| CC LV            | 2 | 82,35            | <b>D</b>     |

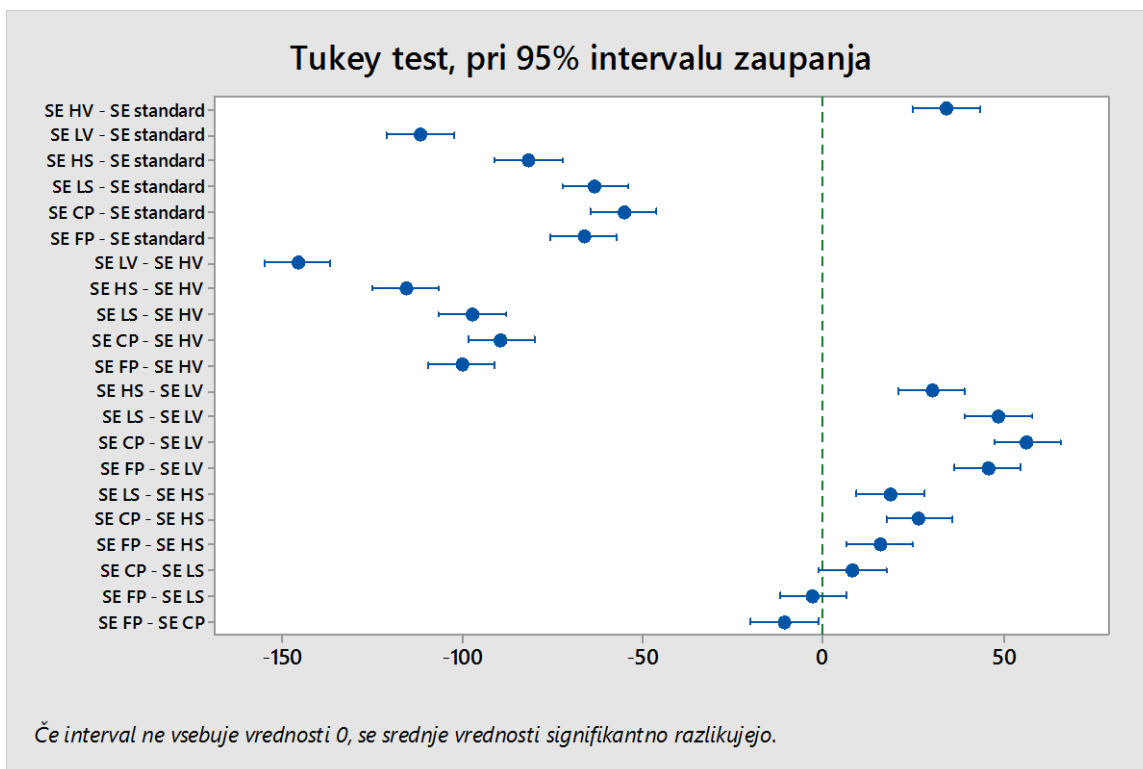
Slabšo ponovljivost med paralelkami opazimo v primeru vzorcev CC Central point in CC HV, kar se odraža v višjih standardnih deviacijah. Slednji ima tudi najvišjo povprečno navidezno viskoznost (Graf 15). Odvisnost navidezne viskoznosti od strižne hitrosti za QbD HPMC vzorce proizvajalca Dow, prikazuje Graf 13. Iz poteka tokovnih krivulj lahko opazimo, da z višanjem strižne hitrosti viskoznosti polimernih raztopin padajo, torej ima HPMC polimer lastnosti psevdoplastičnega sistema. Vzorci imajo dokaj primerljive navidezne viskoznosti, nekoliko odstopata le raztopini vzorcev CC HV in CC LS, ki izkazujeta nekoliko višje navidezne viskoznosti.



**Graf 13:** Odvisnost navidezne viskoznosti od strižne hitrosti za 4 % raztopine HPMC polimera (proizvajalec Dow).

- **Proizvajalec Shin Etsu**

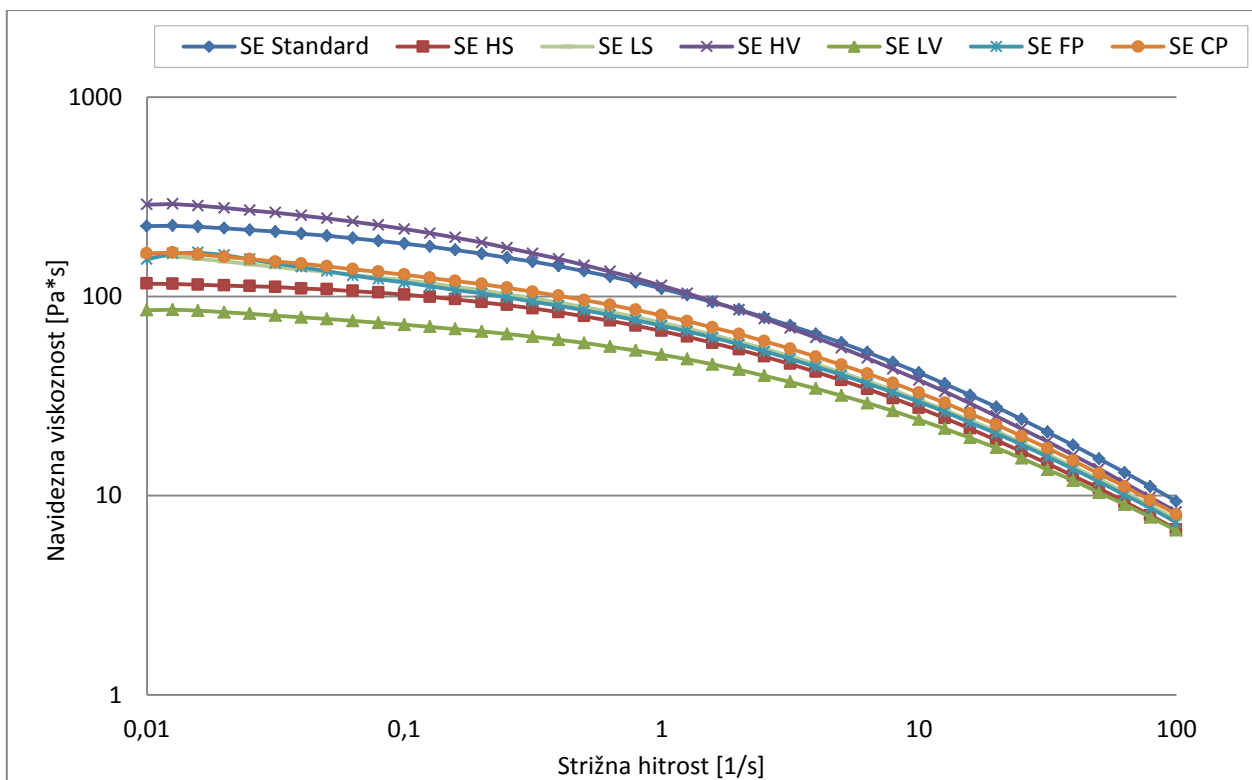
Med vzorci proizvajalca Shin Etsu obstajajo razlike v povprečnih vrednostih navidezne viskoznosti 4 % HPMC vodnih raztopin ( $p=0,000$ ). Variabilnost med vzorci je večja, kot znotraj samih vzorcev, aritmetične sredine vzorcev pa so si statistično značilno različne. Glede na srednje vrednosti, lahko vzorce razporedimo v 5 skupin od A do F (Preglednica XVI). V primerjavi z vzorci proizvajalca Dow, pri vzorcih proizvajalca Shin Etsu opazimo večjo variabilnost v srednjih vrednostih navidezne viskoznosti, saj le en vzorec, to je SE LS, pripada več kot eni skupini, kar prikazuje Slika 9. Najvišjo standardno deviacijo opazimo pri vzorcu SE Standard, vendar je v primerjavi z HPMC raztopinami proizvajalca Dow ponovljivost med paralelkami boljša, saj v povprečju izkazujejo nižje standardne deviacije (Graf 15). Če primerjamo odvisnost navidezne viskoznosti od strižne hitrosti QbD HPMC vzorcev proizvajalca Dow (Graf 13), s QbD HPMC vzorci proizvajalca Shin Etsu (Graf 14), opazimo, da so pri slednjem, tokovne krivulje razporejene v širšem območju viskoznosti, torej so razlike v navideznih viskoznostih večje.



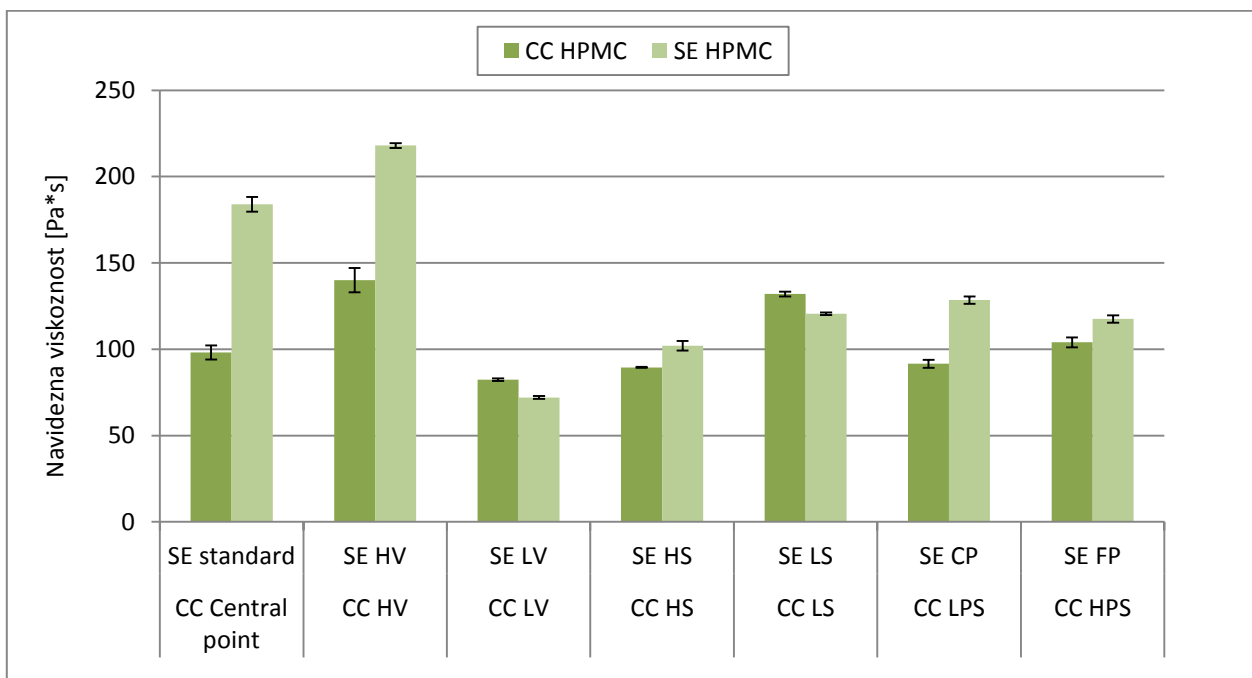
**Slika 9:** Razlike v srednjih vrednosti navidezne viskoznosti različnih parov QbD HPMC vzorcev proizvajalca Shin Etsu, ugotovljene s Tukey testom ob 95 % intervalu zaupanja.

**Preglednica XVI:** Srednje vrednosti navidezne viskoznosti označene z različnimi črkami se med seboj statistično značilno razlikujejo, pri 95 % intervalu zaupanja (proizvajalec Shin Etsu).

| Vzorec      | N | Srednja vrednost | Skupine    |
|-------------|---|------------------|------------|
| SE HV       | 2 | 218              | <b>A</b>   |
| SE Standard | 2 | 184              | <b>B</b>   |
| SE CP       | 2 | 128,5            | <b>C</b>   |
| SE LS       | 2 | 120,5            | <b>C D</b> |
| SE FP       | 2 | 117,5            | <b>D</b>   |
| SE HS       | 2 | 102              | <b>E</b>   |
| SE LV       | 2 | 72,05            | <b>F</b>   |



**Graf 14:** Odvisnost navidezne viskoznosti od strižne hitrosti za 4 % raztopine HPMC polimera (proizvajalec Shin Etsu).



**Graf 15:** Povprečne navidezne viskoznosti s standardnim odklonom pri strižni hitrosti 0,1 [1/s]. Vrednosti so povprečje dveh meritev (proizvajalec Shin Etsu in Dow).



Vse preučevane polimerne raztopine izkazujejo psevdoplastično obnašanje, saj z naraščanjem strižne hitrosti opazimo upadanje viskoznosti (*shear thinning*). V območju nizkih strižnih hitrosti ohranjajo konstantno vrednost viskoznosti (*zero shear viscosity*), medtem ko z naraščanjem strižne hitrosti njena vrednost postopoma upada. Razlog je urejanje notranje strukture polimernih raztopin, pod vplivom delovanja strižne hitrosti. V fazi mirovanja molekule polimera zasedajo energetsko najugodnejšo konformacijo. Z vnosom nizkih strižnih hitrosti, sistem teži k ohranjanju notranje strukture, pri tem pa je viskoznost raztopin neodvisna od vnesenih strižnih pogojev. Polimeri višjih molekulskih mas izkazujejo večjo prepletenost polimernih verig, kar posledično pomeni višjo navidezno viskoznost polimernih raztopin (23) (11).

Naraščanje viskoznosti glede na podatke proizvajalca (Shin-Etsu) :

SE LV < SE FP < SE LS < SE CP < SE HS < SE Standard < SE HV

Naraščanje viskoznosti glede na meritve navidezne viskoznosti (Shin-Etsu):

SE LV < SE HS < SE FP ~ SE LS < SE CP < SE Standard < SE HV

Naraščanje viskoznosti glede na podatke proizvajalca (Dow) :

CC LV < CC HPS < CC Central point < CC HS < CC LPS < CC LS < CC HV

Naraščanje viskoznosti glede na meritve navidezne viskoznosti (Dow):

CC HS < CC LV < CC LPS < CC Central point < CC HPS < CC LS < CC HV

Razvidno je, da se vrstni red določen s strani proizvajalcev razlikuje od vrstnega reda narejenega na podlagi meritev navidezne viskoznosti. Razloga za to sta lahko uporaba različne merilne tehnike in razlike v pripravi polimernih raztopin vzorcev. Kot smo tekom naloge že opazili, ima proizvajalec Shin Etsu v primerjavi s proizvajalcem Dow, širše postavljene specifikacijske meje, tako za viskoznost, kot tudi za stopnjo substitucije. Iz teh podatkov bi lahko sklepali, da bodo ogrodne tablete, narejene iz QbD HPMC vzorcev proizvajalca Shin Etsu izkazovale večjo variabilnost v sproščanju dobro topne učinkovine, vendar, se je tekom testov sproščanja izkazalo ravno nasprotno.

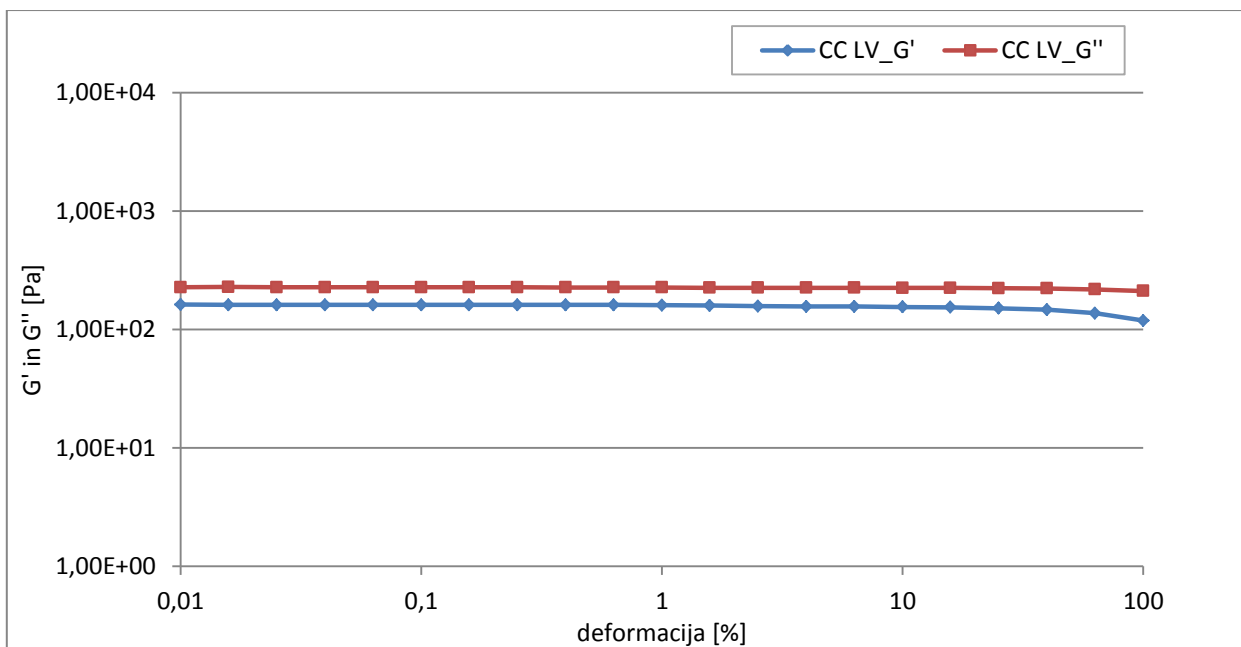
### **4.3.2. Viskoelastične lastnosti**

Za določitev viskoelastičnih lastnosti pogosto uporabljamo oscilacijske teste, katerih meritve izvajamo pri ne-destruktivnih pogojih. Viskozni in elastični doprinos k viskoelastičnim lastnostim opredelimo z amplitudnimi in frekvenčnimi testi. Najprej smo izvedli amplitudne teste, na podlagi katerih smo določili območje viskoelastičnega odziva (LVO). To je območje, v katerem so viskoelastične lastnosti snovi neodvisne od vnesene amplitudne strižne deformacije, kar pomeni, da elastični ( $G'$ ) in viskozni modul ( $G''$ ) v tem območju ostajata nespremenjena. V LVO območju smo nato izvedli še frekvenčne teste, katerih namen je bil pridobiti informacije o notranji strukturi preučevanega sistema. Te bi lahko pripomogle pri razumevanju poteka sproščanja dobro topne učinkovine iz hidrofilnih ogrodnih tablet.

Z amplitudnimi in frekvenčnimi testi smo preučevali viskoelastične lastnosti pripravljenih 4 % raztopin, vseh 14 QbD HPMC vzorcev.

#### **4.3.2.1. Amplitudni testi**

Z amplitudnimi testi smo pripravljenim raztopinam določili območje linearnosti (Graf 16). V tem območju sta vrednosti dinamičnih modulov  $G'$  in  $G''$ , neodvisni od vnesene amplitudne strižne deformacije. Iz rezultatov amplitudnih testov lahko sklepamo, da gre v vseh primerih za polimerne raztopine, saj viskozni dinamični modul prevladuje nad elastičnim modulom,  $G'' > G'$ . V širokem območju amplitude strižne deformacije, se preučevane raztopine odzivajo linearno viskoelastično, vrednosti dinamičnih modulov  $G'$  in  $G''$ , pa so pri vseh vzorcih, v primerljivem velikostnem razredu. Pri višjih amplitudnih strižnih deformacijah, lahko opazimo upadanje krivulje elastičnega modula  $G'$ , kar nakazuje na to, da smo presegli kritično vrednost amplitudne strižne deformacije in tako prešli iz območja, ki daje linearni viskoelastični odziv, v območje nelinearnega viskoelastičnega odziva. Amplitudo deformacije, pri kateri bomo izvajali frekvenčne teste, smo zato izbrali pri nižji vrednosti, ki je dovolj oddaljena od kritične amplitudne vrednosti, in zagotavlja testiranje v območju linearnega viskoelastičnega odziva, to je pri 1%.



**Graf 16:** Primer grafa za določitev linearne viskoelastične območja (LVO) 4 % HPMC polimernih raztopin.

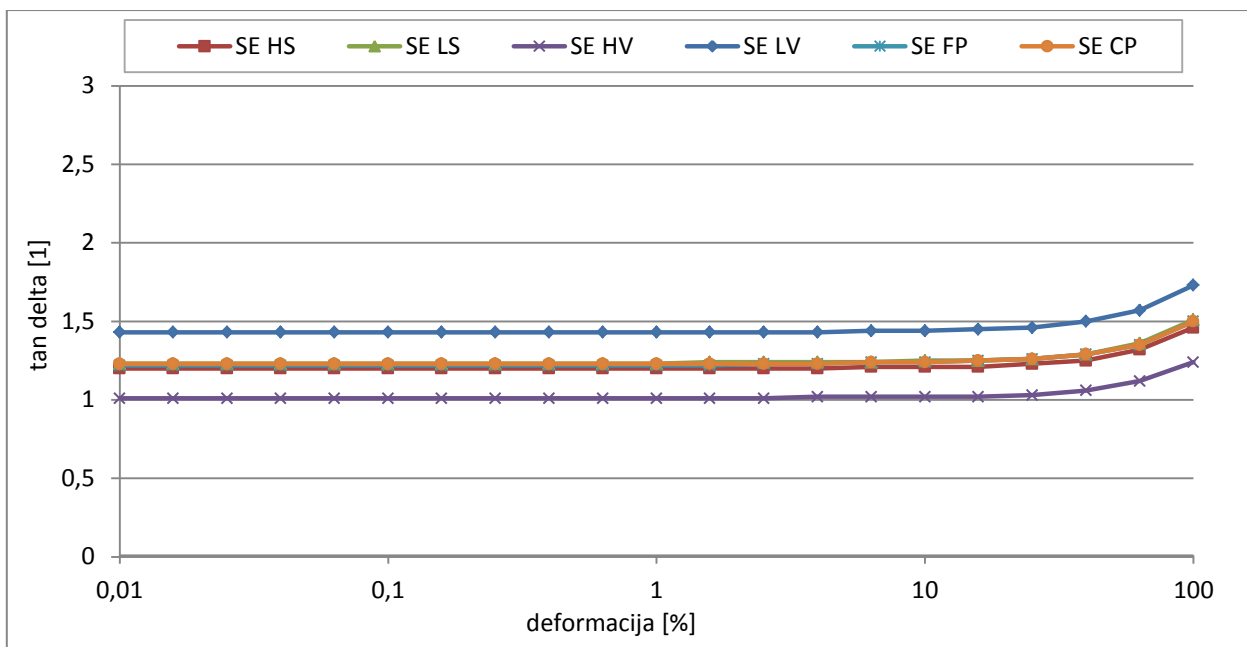
Iz spektra odvisnosti  $\tan\delta$  od strižne deformacije (Graf 17 in Graf 18) vidimo, da vse raztopine, razen SE HV, izkazujejo  $\tan\delta > 1$ , kar pomeni, da v tem strižnem območju prevladujejo plastične lastnosti raztopine nad elastičnimi, raztopina se nahaja v sol stanju. V primeru SE HV je vrednost  $\tan\delta=1$ , kar kaže na tvorbo strukturirane viskoelastične tekočine, raztopina pa se nahaja na točki prehoda iz sol v gel stanje (11). S statističnim testom ANOVA smo ugotovili, da ne glede na proizvajalca, med  $\tan\delta$  vrednostmi polimernih raztopin ( $p$ -vrednost  $\leq 0,05$ ) obstajajo statistično značilne razlike (Preglednica XVII, Preglednica XVIII). Iz rezultatov, pridobljenih s Tukey testom, pri 95 % intervalu zaupanja (Preglednica XVII), opazimo da vzorec SE HS pripada dvema skupinama B in C, medtem ko se je v primeru navidezne viskoznosti izkazalo (Preglednica 16), da se vzorec SE HS značilno razlikuje od ostalih vzorcev proizvajalca Shin Etsu, saj pripada le eni skupini (E). Iz tega sledi, da vzorci, ki se značilno razlikujejo v navidezni viskoznosti, se nujno ne razlikujejo tudi v viskoelastičnih lastnostih.

**Preglednica XVII:** Srednje vrednosti tan delta, ki so označene z različnimi črkami se med seboj značilno razlikujejo, pri 95 % intervalu zaupanja (proizvajalec Shin Etsu).

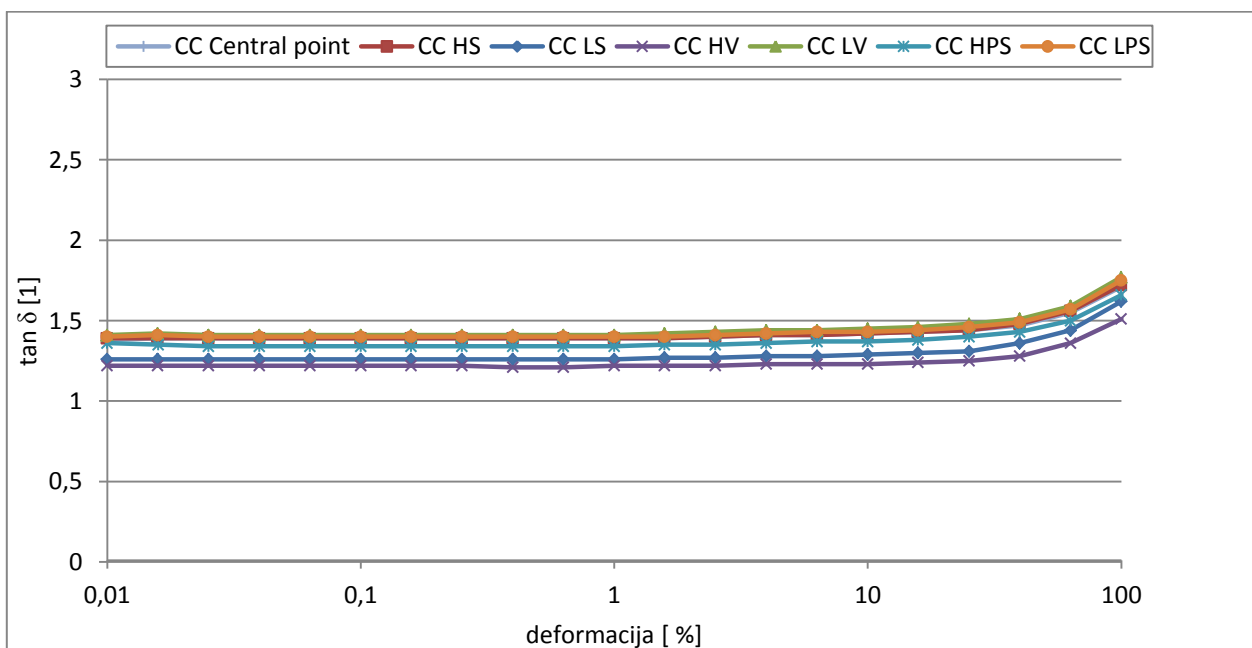
| <b>Vzorec</b> | <b>N</b> | <b>Srednja vrednost</b> | <b>Skupine</b> |
|---------------|----------|-------------------------|----------------|
| SE LV         | 21       | 1,4576                  | <b>A</b>       |
| SE LS         | 21       | 1,2576                  | <b>B</b>       |
| SE CP         | 21       | 1,2548                  | <b>B</b>       |
| SE FP         | 21       | 1,2490                  | <b>B</b>       |
| SE HS         | 21       | 1,2233                  | <b>B C</b>     |
| SE Standard   | 21       | 1,1714                  | <b>C</b>       |
| SE HV         | 21       | 1,0314                  | <b>D</b>       |

**Preglednica XVIII:** Srednje vrednosti tan delta, ki so označene z različnimi črkami se med seboj značilno razlikujejo, pri 95 % intervalu zaupanja (proizvajalec Dow).

| <b>Vzorec</b>    | <b>N</b> | <b>Srednja vrednost</b> | <b>Skupine</b> |
|------------------|----------|-------------------------|----------------|
| CC LV            | 21       | 1,4529                  | <b>A</b>       |
| CC LPS           | 21       | 1,4386                  | <b>A B</b>     |
| CC HS            | 21       | 1,4262                  | <b>A B</b>     |
| CC Central point | 21       | 1,4243                  | <b>A B</b>     |
| CC HPS           | 21       | 1,3781                  | <b>B</b>       |
| CC LS            | 21       | 1,2990                  | <b>C</b>       |
| CC HV            | 21       | 1,2462                  | <b>C</b>       |



**Graf 17:**  $\tan \delta$  v odvisnosti od amplitude strižne deformacije za 4 % HPMC polimerne raztopine, proizvajalca Shin Etsu.



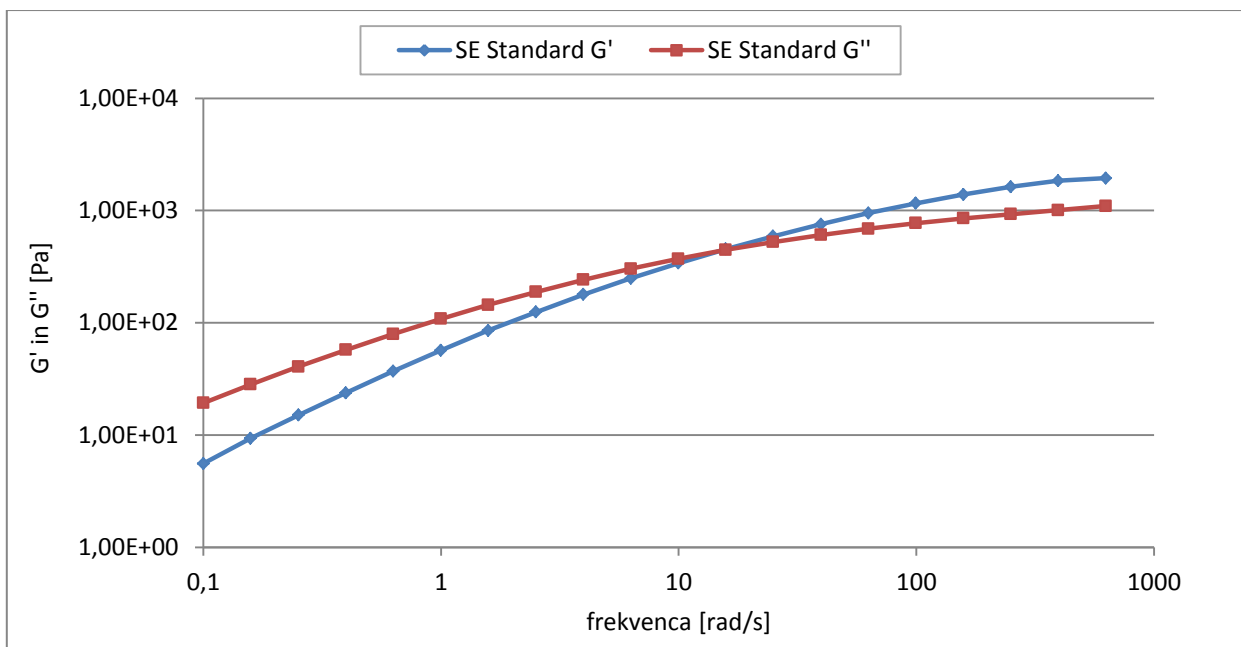
**Graf 18:**  $\tan \delta$  v odvisnosti od amplitude deformacije za 4% HPMC polimerne raztopine, proizvajalca Dow.

#### 4.3.2.2. Frekvenčni testi

Frekvenčne teste izvajamo v LVO območju, pri različnih frekvencah oscilacije, ter pri vrednostih amplitudne strižne deformacije, ki zagotavljajo linearen viskoelastičen odziv. Tako lahko spremljamo frekvenčno odvisnost dinamičnih modulov  $G'$ ,  $G''$ ,  $\tan \delta$  in  $\eta^*$  pri nedestruktivnih strižnih pogojih, pri katerih se še ohranja notranja struktura sistema. Iz mehanskih spektrov snovi, lahko tako sklepamo na notranjo strukturo polimernih raztopin. Primer mehanskega spektra viskoelastičnih lastnosti 4% (m/m) vodne raztopine HPMC prikazuje Graf 19 .

Mehanski spektri prikazujejo viskozni  $G''$  in elastični  $G'$  odziv 4 % vodnih raztopin polimera, v odvisnosti od spreminjajoče se frekvence oscilacije. Opazimo, da polimerne raztopine izkazujejo izrazito odvisnost viskoznega in elastičnega modula od vnesene frekvence. Pri nižjih frekvencah, prevladuje viskozni modul  $G''$  nad elastičnim modulom  $G'$ . Polimerne verige so pri nižjih frekvencah bolj prožne in gibljive. Pri gibanju molekul polimera prihaja do toplotnih energetske izgub zaradi trenja med molekulami, kar ima za posledico, da v področju nižjih frekvenc prevladujejo viskozne lastnosti polimernih raztopin ( $G'' > G'$ ). Z nadaljnjim naraščanjem frekvence, pridemo iz viskoznega področja v prehodno področje (točka prekrivanja -  $G' = G''$ ). Pri frekvencah, nad točko prekrivanja ( $G' = G''$ ), opazimo, da prevladuje elastični modul  $G'$  nad viskoznim modulom  $G''$  ( $G' > G''$ ).

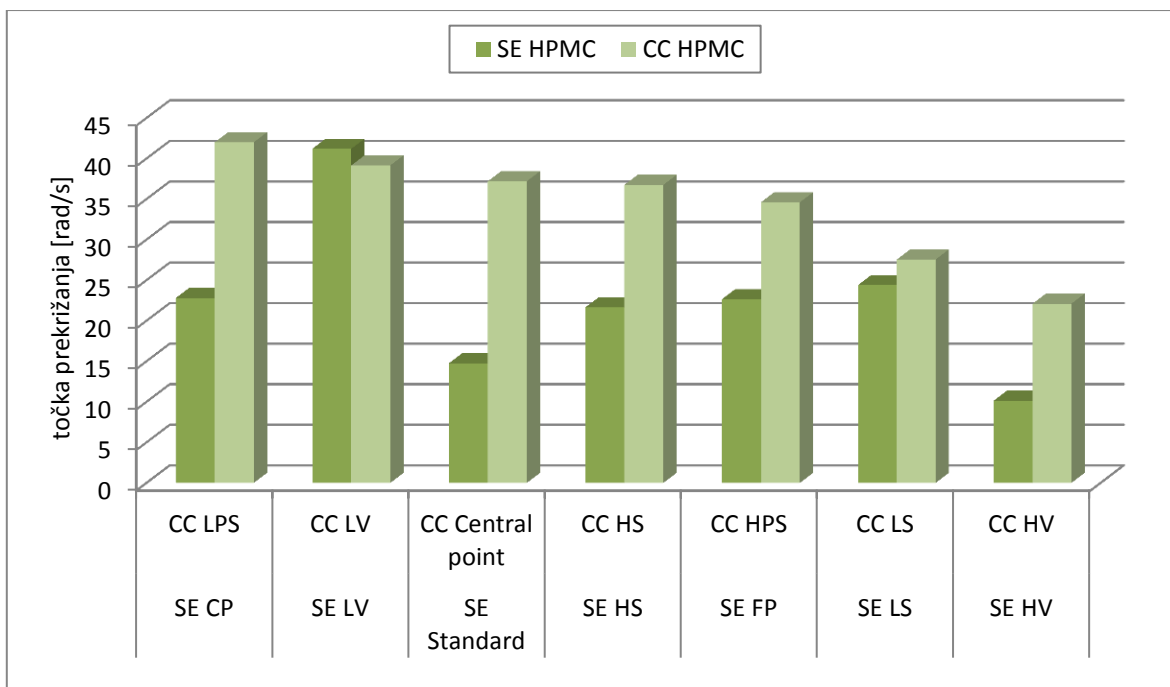
Razlog za to je tem, pri višjih frekvencah oscilacije, polimerne molekule niso sposobne slediti vsiljenim spremembam, molekule polimera postanejo bolj toge, zato je izražen elastični značaj polimernih raztopin.



**Graf 19:** Primer mehanskega spektra viskoelastičnih lastnosti 4% (m/m) vodne raztopine HPMC.

#### 4.3.4.1 Točke prekrížanja

Točka prekrížanja je točka, kjer se sekata krivulji  $G'$  in  $G''$  dinamičnega modula. Pri nižji frekvenci, kot se krivulji sekata, višja je molekulska masa polimera, kar posledično pomeni tudi višjo viskoznost (11). Vzorci proizvajalca Dow imajo točke prekrížanja pri višjih vrednostih, kot vzorci proizvajalca Shin Etsu, kar prikazuje Graf 20. Na podlagi teh ugotovitev sklepamo, da imajo QbD HPMC vzorci proizvajalca Shin Etsu v primerjavi s QbD HPMC vzorci proizvajalca Dow, višjo molekulsko maso in da ob stiku z vodnim medijem tvorijo čvrstejšje gele. Razlike so signifikantno različne ( $p=0,027$ ), vendar pa zgolj na podlagi teh razlik, ne moremo pojasniti razlik v sproščanju ZU. Opazimo tudi, da imajo vzorci z višjo navidezno viskoznostjo (CC HV, CC LS, CC HPS in SE Standard, SE HV) točko prekrížanja pri nižji frekvenci oscilacije.



**Graf 20:** Vrednosti točk prekrížanja QbD HPMC vzorcev (Shin Etsu, Dow).

#### 4.4. Povezava materialnih lastnosti s sproščanjem zdravilne učinkovine

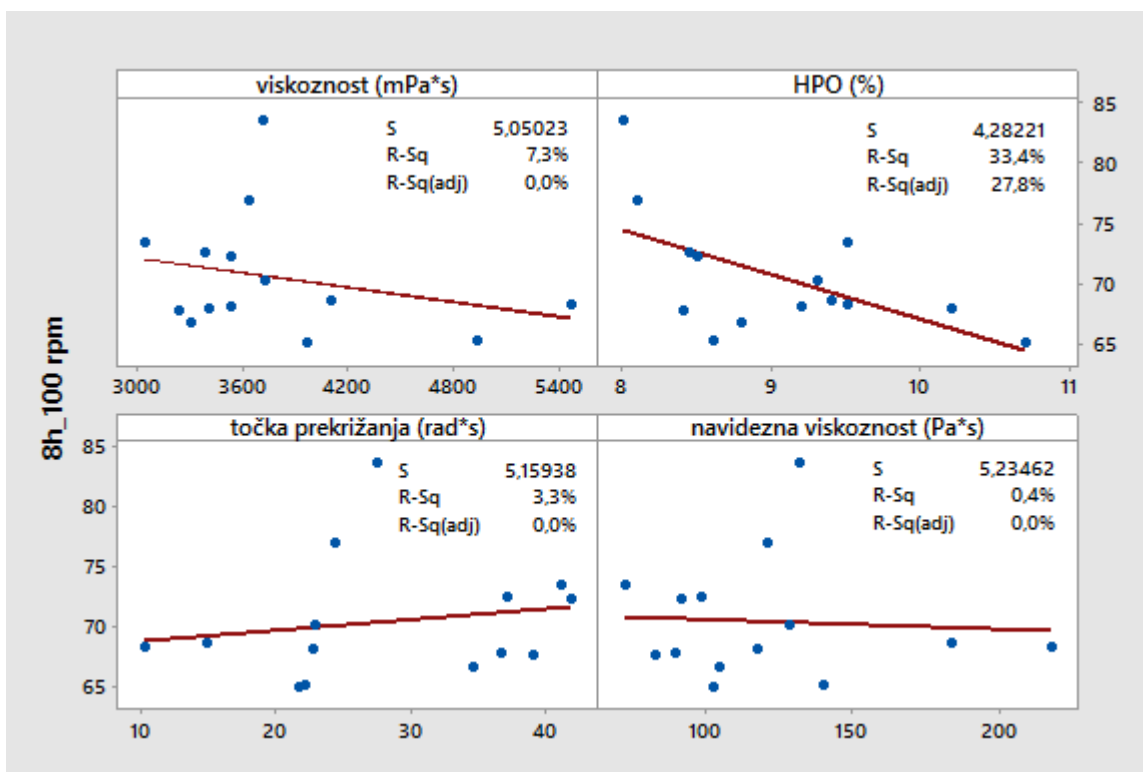
Naš namen je bil ugotoviti, ali katere izmed preučevanih materialnih lastnosti hipromeloze korelirajo s sproščanjem dobro topne ZU iz pripravljenih ogrodnih tablet. Na podlagi fizikalno- kemijskih lastnosti 14 različnih QbD HPMC vzorcev in rezultatov reoloških meritev smo želeli preveriti, ali lahko posamezni linearni model dobro napove sproščanja učinkovine ali potrebujemo kombinacijo različnih prametrov (multipli linearni model). Analizirali smo odnos med odvisno spremenljivko (y), ki je predstavljala delež sproščene učinkovine v časovni točki 8h, in med neodvisnimi spremenljivkami (x), ki so predstavljale različne karakteristike preučevanih QbD HPMC vzorcev. Vrednosti teh so se nahajale znotraj naslednjih meja:

- stopnja hidroksipropoksi substitucije (% HPO) : 8,0-10,7
- viskoznost 2 % raztopine polimera (mPas): 5470 -3040
- navidezna viskoznost 4 % raztopine polimera (Pas): 72,05-21,08

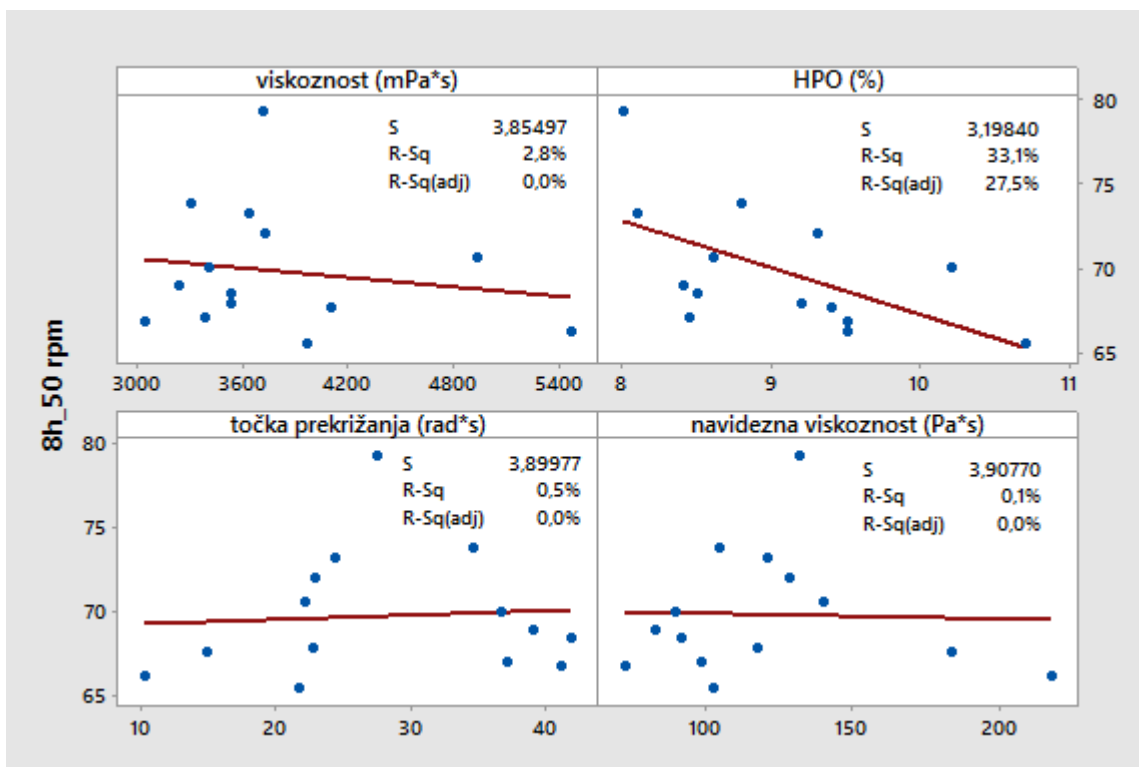


- točka prekrivanja 4 % raztopine polimera (rad\*s): 65,46-79,29

Rezultati, predstavljeni v obliki razsevnega diagrama z linearno regresijsko črto (Slika 10 in Slika 11), kažejo na slab regresijski model, saj so vrednosti koeficienta determinacije ( $R^2$ ) zelo nizke. To velja predvsem v primeru viskoznosti (mPa\*s), navidezne viskoznosti (Pa\*s) in točke prekrivanja (rads), kjer koeficient determinacije kaže na ničelni vpliv naštetih karakteristik na delež sproščene učinkovine v 8h testa. V primeru % HPO je linearni odnos negativen. Zaradi nizkega koeficienta determinacije ( $R^2 = 33,1\%$  in  $R^2 = 33,4\%$ ) je povezanost z deležem sproščene učinkovine nizka, kljub temu pa lahko opazimo trend, ki nakazuje, da večji kot je % HPO, počasnejše je sproščanje dobro topne učinkovine iz ogrodja tablete.



**Slika 10:** Korelacija med deležem sproščene ZU v 8h testa sproščanja (100 rpm) in fizikalno-kemijskimi lastnostmi HPMC vzorcev.



**Slika 11:** Korelacija med deležem sproščene ZU v 8h testa sproščanja (50 rpm) in fizikalno-kemijskimi lastnostmi HPMC vzorcev.

Za statistično vrednotenje smo uporabili tudi funkcijo »best subset regression«. To je modelska regresijska analiza, ki primerja vse možne regresijske modele, ki jih je mogoče ustvariti na podlagi določenega nabora spremenljivk. Rezultati kažejo, da na osnovi uporabljenih fizikalno-kemijskih karakteristik QbD HPMC vzorcev, ne moremo postaviti modela, ki bi uspešno napovedal hitrost sproščanja učinkovine iz testiranih ogrodnih tablet, saj nobena izmed preučevanih karakteristik ni izkazovala statistično značilnega vpliva na sproščanje ZU (Preglednica XIX, Preglednica XX). S simbolom X so označene spremenljivke, ki so bile upoštevane pri postavitvi posameznega modela.

**Preglednica XIX:** Rezultat modelske regresijske analize (best subset regression ) pri 100 rpm.

| Sprem. | $R^2$ | $R^2$<br>(adj) | $R^2$<br>(pred) | Mallows<br>Cp | S      | Viskoznost<br>(mPas) | HPO<br>(%) | Točka<br>prekrižanja<br>(rad*s) | Navidezna<br>viskoznost<br>(Pas) |
|--------|-------|----------------|-----------------|---------------|--------|----------------------|------------|---------------------------------|----------------------------------|
| 1      | 33,1  | 27,8           | 7,1             | 0,5           | 4,2822 |                      | X          |                                 |                                  |
| 1      | 7,3   | 0,0            | 0,0             | 4,6           | 5,0502 | X                    |            |                                 |                                  |
| 2      | 37,2  | 25,7           | 0,0             | 1,9           | 4,3435 | X                    | X          |                                 |                                  |
| 2      | 33,6  | 21,5           | 0,0             | 2,4           | 4,4662 |                      | X          | X                               |                                  |
| 3      | 42,7  | 25,5           | 0,0             | 3,0           | 4,3513 | X                    | X          |                                 | X                                |
| 3      | 40,3  | 22,4           | 0,0             | 3,4           | 4,4413 | X                    | X          | X                               |                                  |
| 4      | 42,7  | 17,2           | 0,0             | 5,0           | 4,5861 | X                    | X          | X                               | X                                |

**Preglednica XX:** Rezultat modelske regresijske analize (best subset regression ) pri 50 rpm.

| Sprem. | $R^2$ | $R^2$<br>(adj) | $R^2$<br>(pred) | Mallows<br>Cp | S      | Viskoznost<br>(mPa*s) | HPO<br>(%) | Točka<br>prekrižanja | Navidezna<br>viskoznost<br>(Pa*s) |
|--------|-------|----------------|-----------------|---------------|--------|-----------------------|------------|----------------------|-----------------------------------|
| 1      | 33,1  | 27,5           | 5,6             | -0,1          | 3,1984 |                       | X          |                      |                                   |
| 1      | 2,8   | 0,0            | 0,0             | 4,4           | 3,8550 | X                     |            |                      |                                   |
| 2      | 33,9  | 21,9           | 0,0             | 1,8           | 3,3202 | X                     | X          |                      |                                   |
| 2      | 33,5  | 24,5           | 0,0             | 1,8           | 3,3290 |                       | X          | X                    |                                   |
| 3      | 39,0  | 20,6           | 0,0             | 3,0           | 3,3463 | X                     | X          | X                    | X                                 |
| 3      | 36,2  | 17,0           | 0,0             | 3,4           | 3,4217 |                       | X          | X                    | X                                 |
| 4      | 39,2  | 21,1           | 0,0             | 5,0           | 3,5212 | X                     | X          | X                    | X                                 |

Za izboljšanje modela sproščanja bi bilo smiselno evaluirati še nekatere druge fizikalne parametre in ovrednotiti njihov vpliv na sproščanje dobro topne učinkovine. Z dodatnimi meritvami, s katerimi bi ovrednotili velikost in porazdelitev velikosti delcev, poroznost delcev, morfološke lastnosti in specifično površino delcev ter porazdelitev molekulske mase polimera, bi pridobili dodatne spremenljivke, ki bi pripomogle k postavitvi ustreznega modela, na podlagi katerega bi lahko napovedali, katere so tiste kritične lastnosti HPMC materiala, ki pomembno vplivajo na hitrost sproščanja dobro topne učinkovine iz ogrodnih tablet.

## 5. SKLEP

V sklopu magistrske naloge smo raziskovali vpliv fizikalno-kemijskih lastnosti HPMC polimera na sproščanje dobro topne ZU propranololijevega klorida iz hidrofilnih ogrodnih tablet. Želeli smo tudi ugotoviti, ali morda obstaja korelacija med reološkimi lastnostmi pripravljenih HPMC raztopin in hitrostjo sproščanja ZU iz HPMC ogrodnih tablet, narejenih z direktnim tabletiranjem.

Na podlagi eksperimentalnega dela smo prišli do naslednjih zaključkov:

- Na sproščanje propranololijevega klorida iz HPMC ogrodnih tablet ima pomemben vpliv količina HPMC polimera. V nasprotju s formulacijo, ki je vsebovala 25 % HPMC, smo pri tabletah s 20 % HPMC opazili veliko variabilnost med paralelkami. Predvidevamo, da smo z 20 % HPMC polimera v koncentracijskem območju, kjer se že majhne razlike v trdnosti tablet izrazito odražajo v različnih hitrostih sproščanja ZU. Torej, delež polimera pomembno vpliva tudi na robustnost FO.
- Pri višji hitrosti vrtenja mešal je variabilnost med posameznimi paralelkami nekoliko višja, opazimo pa tudi širšo razporeditev povprečnih profilov sproščanja učinkovine.
- Korelacije med viskoznostjo polimerne raztopine in hitrostjo sproščanja ZU nismo našli.
- Rahel trend opazimo med stopnjo substitucije (% HPO) in deležem sproščene ZU. Ta nakazuje, da nižji kot je % HPO skupin, hitreje je sproščanje ZU.
- Predvidevamo, da vpliv deleža polimera v tableti prevladuje nad vplivom velikosti delcev polimera, saj so si profili sproščanja v primeru velikih in majhnih delcev polimera, med seboj podobni.
- Z reološkimi meritvami smo želeli preveriti, ali obstaja korelacija med reološkimi lastnostmi HPMC raztopin in hitrostjo sproščanja ZU iz ogrodnih tablet. Izkazalo se je, da na podlagi rezultatov pridobljenih z rotacijskimi in oscilacijskimi testi ne moremo sklepati na hitrost sproščanja ZU, saj navidezna viskoznost in točka prekrivanja polimernih raztopin ne korelirata s hitrostjo sproščanja ZU.

- Lastnosti uporabljenih HPMC vzorcev se nahajajo znotraj specifikacijskih meja, kljub temu pa se nekateri disolucijski profili med seboj signifikantno razlikujejo ( $f_2 < 50$ ). Iz tega sledi, da HPMC polimer, ki ima sicer lastnosti znotraj specifikacije, lahko daje profile sproščanja, ki so signifikantno različni in tudi ne-bioekvivalentni. Zato je bistvenega pomena, poznavanje fizikalno-kemijskih lastnosti polimera, na podlagi katerih lahko pridobimo model, ki da statistično značilne parametre. Z merjenjem več spremenljivk namreč bolje spoznamo farmacevtsko formulacijo, kar je posebno pomembno pri tako kompleksnem sistemu, kot je hidrofilna ogrodna tableta.

## 6. LITERATURA

1. **Gibson M:** *Pharmaceutical preformulation and formulation: A practical guide from candidate drug*. New York : Informa Healthcare, 2009: 368-370.
2. **Aulton M. E:** *Pharmaceutics, The science of dosage form design, 2nd Edition*, Churchill Livingstone, 2002. 290.
3. **Wen H, Park K:** *Oral Controlled Release Formulation Design and Drug Delivery: Theory to Practice*. New Jersey, John Wiley & Sons, 2010: 1-2.
4. **Sinko J S:** *Martin's physical pharmacy and pharmaceutical sciences : physical chemical and biopharmaceutical principles in the pharmaceutical sciences, 6th Ed.*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2006: 498-515.
5. **Wilson C G, Crowley P J:** *Controlled Release in Oral Drug Delivery*, Springer, New York, 2011: 131-153.
6. **Coviello T, Matricardi P, Marianecchi C:** *Polysaccharide hydrogels for modified release formulations*. J Controlled Release 2007; 119 (1): 5-24.
7. **Maderuelo C, Zarzuelo A, Zarzuelo M. J:** *Critical factors in the release of drugs from sustained release hydrophilic matrices: a review*. J Controlled Release 2011; 154: 2-19.
8. **Timmins P, Pygall R. S, Melia D. C:** *Hydrophilic matrix tablets for oral controlled release*, Springer, New York, 2014.
9. **Colombo P, Bettini R, Santi P, Peppas A. N:** *Swellable matrices for controlled drug delivery: gel-layer behaviour, mechanisms and optimal performance: a review*. Pharmaceut Sci Tech Today 2000, 3(6) 198-204.
10. **Rowe R. C, Sheskey P J, Quinn M. E:** *Handbook of pharmaceutical excipients, 6th Edition*, Pharmaceutical Press, London, Chicago, 1986: 326-329, 376-378, 404-407.
11. **Mezger G. T:** *The rheology handbook, For users of rotational and oscillatory rheometers, 2nd Edition*, Vincentz, Hanove, 2006.
12. **Dave S. V, Saoji D. S, Raut A.N, Haware V. R:** *Excipient Variability and Its Impact on Dosage Form Functionality: a review*. J Pharm Sci 2014; 104(3): 906-15.
13. **Viridén A, Wittgren B, Larsson A:** *Investigation of critical polymer properties for polymer release and swelling of HPMC matrix tablets*. Eur J Pharm Sci 2009; 36: 297-309.
14. **Viridén A, Wittgren B, Andersson T, Larsson A:** *The effect of chemical heterogeneity of HPMC on polymer release from matrix tablets*. Eur J Pharm Sci 2009; 36: 392-400.

15. **Jain K. A, Söderlind E, Viridén A, Weitschies W:** *The influence of hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) molecular weight, concentration and effect of food on in vivo erosion behavior of HPMC matrix tablets.* *J Control Release* 2014; 187: 50-58.
16. **Novak D. S, Kuhelj V, Vrečer F, Baumgartner S:** *The influence of HPMC viscosity as FRC parameter on the release of low soluble drug from hydrophylic matrix tablets.* *Pharm Dev Technol* 2013; 18(2): 343–347.
17. **Viriden A, Wittgren B, Andersson T, Larsson A:** *Influence of substitution pattern on solution behavior of hydroxypropyl methylcellulose.* *Biomacromolecules* 2009; 10: 522–529.
18. **Viridén A, Larsson A, Schagerlöf H, Wittgren B:** *Model drug release from matrix tablets composed of HPMC with different substituent heterogeneity.* *Int J Pharm* 2010; 401: 60-67.
19. **Heng S. W. P, Chan W. L, Easterbrook G. M:** *Investigation of the influence of mean HPMC particle size and number of polymer particles on the release of aspirin from swellable hydrophilic matrix tablets.* *J Control Release* 2001; 76: 39-49.
20. **Caraballo I:** *Factors affecting drug release from hydroxypropyl methylcellulose matrix systems in the light of classical and percolation theories: a review.* *Expert Opin Drug Deliv* 2010; 7: 1291-1301.
21. **Fuertes I, Caraballo I, Miranda A, Millán M:** *Study of critical points of drugs with different solubilities in hydrophilic matrices.* *Int J Pharm* 2010; 383 (1-2): 138-146.
22. **Williams III O. R, Reynolds D. T, Cabelka D. T:** *Investigation of excipient type and level on drug release from controlled release tablets containing HPMC.* *Pharm Dev Technol* 2002; 7(2): 181-193.
23. **Zupančič Valant A:** *Uvod v reologijo, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 2007: 7-65.*
24. <http://www.viscopedia.com/basics/factors-affecting-viscometry/>. Dostopano 09.01.2018.
25. <https://download.e-bookshelf.de/download/0003/9374/91/L-X-0003937491-0002447313.XHTML/index.xhtml>. Dostopano 09.01.2018.
26. **Zhang L, Mao S:** *Application of quality by design in the current drug development.* *Asian J Pharm Sci* 2017; 12: 1-25 .
27. [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Propranolol\\_hydrochloride#section=LogP](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Propranolol_hydrochloride#section=LogP). Dostopano 09.01.2018.
28. **Vogelpoel H, Welink J, Amidon L. G, Junginger E. H:** *Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms based on biopharmaceutics classification system (BCS) literature data: Verapamil Hydrochloride, Propranolol Hydrochloride, and Atenolol.* *J Pharm Sci* 2004;. 93: 1945-1956.

29. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p0884?lang=en&region=SI>. Dostopano 15.01.2018.
30. <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070237.pdf> . Dostopano 26.04.2018
31. **Viridén A, Wittgren B, Larsson A:** *Release of theophylline and carbamazepine from matrix tablets – Consequences of HPMC chemical heterogeneity.* *Eur J Pharm Biopharm* 2011; 78: 470-479.
32. **Gray V, Kelly G, Xia M, Butler C:** *The Science of USP 1 and 2 Dissolution: Present Challenges and Future Relevance.* *Pharmaceutical Research* 2009; 26: 1289-1302.
33. [http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0\\_m39215.html](http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_m39215.html). Dostopano 16.01.2018.
34. **Zhou D, Law D, Reynolds J, Davis L:** *Understanding and managing the impact of HPMC variability on drug release from controlled release formulations,* *J Pharm Sci* 2014; 103: 1664-1672.



## 7. PRILOGA

**Priloga 1:** Izračunani faktorji podobnosti med referenčnim vzorcem in testnimi vzorci.

| Referenca SE Standard<br>50 rpm |           |      | SE LV         |           |      | SE HV         |           |      |
|---------------------------------|-----------|------|---------------|-----------|------|---------------|-----------|------|
| t (h)                           | povprečje | SD   | t (h)         | povprečje | SD   | t (h)         | povprečje | SD   |
| 2                               | 26,42     | 1,02 | 2             | 26,29     | 2,14 | 2             | 26,43     | 0,86 |
| 4                               | 43,29     | 2,23 | 4             | 43,07     | 4,61 | 4             | 43,52     | 1,37 |
| 6                               | 57,77     | 1,94 | 6             | 56,99     | 4,00 | 6             | 57,45     | 2,39 |
| 8                               | 67,58     | 2,40 | 8             | 66,85     | 4,21 | 8             | 66,16     | 2,07 |
| 10                              | 75,91     | 2,51 | 10            | 75,08     | 3,47 | 10            | 73,58     | 1,86 |
| 12                              | 81,85     | 2,70 | 12            | 81,50     | 2,92 | 12            | 79,62     | 1,69 |
|                                 |           |      | $f_2 = 96,85$ |           |      | $f_2 = 87,73$ |           |      |
| SE LS                           |           |      | SE HS         |           |      | SE FP         |           |      |
| t (h)                           | povprečje | SD   | t (h)         | povprečje | SD   | t (h)         | povprečje | SD   |
| 2                               | 26,51     | 1,60 | 2             | 25,01     | 1,72 | 2             | 25,94     | 1,93 |
| 4                               | 48,85     | 4,76 | 4             | 40,14     | 2,33 | 4             | 43,40     | 3,36 |
| 6                               | 63,38     | 4,28 | 6             | 54,89     | 3,36 | 6             | 58,36     | 3,91 |
| 8                               | 73,24     | 4,85 | 8             | 65,46     | 3,20 | 8             | 67,84     | 4,57 |
| 10                              | 80,23     | 4,25 | 10            | 74,88     | 3,65 | 10            | 75,85     | 4,87 |
| 12                              | 86,17     | 3,76 | 12            | 81,84     | 3,34 | 12            | 82,43     | 4,70 |
| $f_2 = 65,98$                   |           |      | $f_2 = 81,91$ |           |      | $f_2 = 98,33$ |           |      |
| SE CP                           |           |      |               |           |      |               |           |      |
| t (h)                           | povprečje | SD   |               |           |      |               |           |      |
| 2                               | 27,94     | 3,62 |               |           |      |               |           |      |
| 4                               | 46,65     | 5,80 |               |           |      |               |           |      |
| 6                               | 61,14     | 5,35 |               |           |      |               |           |      |
| 8                               | 72,04     | 5,07 |               |           |      |               |           |      |
| 10                              | 80,32     | 4,53 |               |           |      |               |           |      |
| 12                              | 86,42     | 4,52 |               |           |      |               |           |      |
| $f_2 = 70,46$                   |           |      |               |           |      |               |           |      |

| Referenca CC Central point<br>50 rpm |           |      | CC LV         |           |      | CC HV         |           |      |
|--------------------------------------|-----------|------|---------------|-----------|------|---------------|-----------|------|
| t (h)                                | povprečje | SD   | t (h)         | povprečje | SD   | t (h)         | povprečje | SD   |
| 2                                    | 25,24     | 0,79 | 2             | 26,01     | 0,85 | 2             | 27,14     | 1,32 |
| 4                                    | 42,08     | 2,09 | 4             | 44,48     | 2,24 | 4             | 47,81     | 1,58 |
| 6                                    | 57,24     | 1,87 | 6             | 59,00     | 1,37 | 6             | 60,55     | 1,28 |
| 8                                    | 67,04     | 2,49 | 8             | 68,91     | 1,35 | 8             | 70,63     | 1,48 |
| 10                                   | 74,46     | 1,90 | 10            | 76,44     | 1,27 | 10            | 78,43     | 1,00 |
| 12                                   | 80,45     | 2,14 | 12            | 82,54     | 1,36 | 12            | 84,31     | 0,79 |
|                                      |           |      | $f_2 = 83,58$ |           |      | $f_2 = 69,79$ |           |      |
| CC LS                                |           |      | CC HS         |           |      | CC HPS        |           |      |
| t (h)                                | povprečje | SD   | t (h)         | povprečje | SD   | t (h)         | povprečje | SD   |
| 2                                    | 29,85     | 3,06 | 2             | 29,30     | 1,43 | 2             | 29,00     | 1,26 |
| 4                                    | 55,62     | 4,38 | 4             | 47,55     | 1,46 | 4             | 49,40     | 0,78 |
| 6                                    | 69,81     | 3,50 | 6             | 59,84     | 1,69 | 6             | 63,20     | 1,12 |
| 8                                    | 79,29     | 2,97 | 8             | 70,03     | 1,43 | 8             | 73,83     | 1,01 |
| 10                                   | 85,57     | 2,37 | 10            | 78,25     | 1,99 | 10            | 80,86     | 0,83 |
| 12                                   | 89,69     | 1,60 | 12            | 84,14     | 1,44 | 12            | 85,89     | 0,42 |
| $f_2 = 47,91$                        |           |      | $f_2 = 69,89$ |           |      | $f_2 = 60,61$ |           |      |
| CC LPS                               |           |      |               |           |      |               |           |      |
| t (h)                                | povprečje | SD   |               |           |      |               |           |      |
| 2                                    | 27,44     | 1,79 |               |           |      |               |           |      |
| 4                                    | 45,23     | 4,53 |               |           |      |               |           |      |
| 6                                    | 58,43     | 3,49 |               |           |      |               |           |      |
| 8                                    | 68,51     | 3,86 |               |           |      |               |           |      |
| 10                                   | 75,51     | 3,80 |               |           |      |               |           |      |
| 12                                   | 80,58     | 3,43 |               |           |      |               |           |      |
| $f_2 = 84,31$                        |           |      |               |           |      |               |           |      |

| Referenca CC Central point<br>100 rpm |           |      | CC LV         |           |      | CC HV         |           |      |
|---------------------------------------|-----------|------|---------------|-----------|------|---------------|-----------|------|
| t (h)                                 | povprečje | SD   | t (h)         | povprečje | SD   | t (h)         | povprečje | SD   |
| 2                                     | 30,27     | 2,28 | 2             | 25,60     | 1,49 | 2             | 26,60     | 3,03 |
| 4                                     | 48,38     | 3,24 | 4             | 43,52     | 1,56 | 4             | 43,33     | 2,95 |
| 6                                     | 62,22     | 2,08 | 6             | 58,39     | 1,15 | 6             | 55,91     | 2,37 |
| 8                                     | 72,57     | 2,14 | 8             | 67,68     | 0,78 | 8             | 65,22     | 2,79 |
| 10                                    | 80,66     | 3,31 | 10            | 74,61     | 0,67 | 10            | 72,41     | 2,78 |
| 12                                    | 86,27     | 2,91 | 12            | 80,21     | 0,70 | 12            | 78,25     | 2,59 |
|                                       |           |      | $f_2 = 64,13$ |           |      | $f_2 = 58,62$ |           |      |
| CC LS                                 |           |      | CC HS         |           |      | CC HPS        |           |      |
| t (h)                                 | povprečje | SD   | t (h)         | povprečje | SD   | t (h)         | povprečje | SD   |
| 2                                     | 37,22     | 3,02 | 2             | 27,74     | 4,29 | 2             | 29,99     | 4,69 |
| 4                                     | 61,41     | 5,74 | 4             | 44,30     | 6,65 | 4             | 44,06     | 4,59 |
| 6                                     | 73,97     | 4,41 | 6             | 58,24     | 4,79 | 6             | 56,72     | 5,44 |
| 8                                     | 83,61     | 2,89 | 8             | 67,93     | 4,41 | 8             | 66,75     | 5,00 |
| 10                                    | 90,90     | 2,98 | 10            | 75,64     | 4,57 | 10            | 73,77     | 2,75 |
| 12                                    | 94,47     | 3,22 | 12            | 81,89     | 4,43 | 12            | 79,33     | 2,89 |
| $f_2 = 49,03$                         |           |      | $f_2 = 68,34$ |           |      | $f_2 = 62,80$ |           |      |
| CC LPS                                |           |      |               |           |      |               |           |      |
| t (h)                                 | povprečje | SD   |               |           |      |               |           |      |
| 2                                     | 31,21     | 2,78 |               |           |      |               |           |      |
| 4                                     | 50,12     | 5,79 |               |           |      |               |           |      |
| 6                                     | 63,02     | 6,27 |               |           |      |               |           |      |
| 8                                     | 72,29     | 6,11 |               |           |      |               |           |      |
| 10                                    | 78,90     | 5,20 |               |           |      |               |           |      |
| 12                                    | 84,53     | 4,33 |               |           |      |               |           |      |
| $f_2 = 88,85$                         |           |      |               |           |      |               |           |      |

| Referenca SE Standard<br>100 rpm |           |      | SE LV         |           |      | SE HV         |           |      |
|----------------------------------|-----------|------|---------------|-----------|------|---------------|-----------|------|
| t (h)                            | povprečje | SD   | t (h)         | povprečje | SD   | t (h)         | povprečje | SD   |
| 2                                | 28,38     | 4,19 | 2             | 28,84     | 1,04 | 2             | 28,61     | 2,58 |
| 4                                | 43,82     | 6,24 | 4             | 48,79     | 2,42 | 4             | 43,81     | 2,01 |
| 6                                | 58,67     | 6,33 | 6             | 63,86     | 2,92 | 6             | 60,19     | 3,50 |
| 8                                | 68,62     | 7,26 | 8             | 73,46     | 2,45 | 8             | 68,29     | 2,84 |
| 10                               | 75,46     | 7,17 | 10            | 80,95     | 2,74 | 10            | 76,22     | 3,34 |
| 12                               | 81,67     | 6,69 | 12            | 86,69     | 2,90 | 12            | 80,71     | 1,85 |
|                                  |           |      | $f_2 = 66,07$ |           |      | $f_2 = 94,48$ |           |      |
| SE LS                            |           |      | SE HS         |           |      | SE FP         |           |      |
| t (h)                            | povprečje | SD   | t (h)         | povprečje | SD   | t (h)         | povprečje | SD   |
| 2                                | 33,06     | 5,05 | 2             | 25,55     | 2,26 | 2             | 27,66     | 0,20 |
| 4                                | 54,27     | 8,85 | 4             | 39,02     | 3,72 | 4             | 42,94     | 0,49 |
| 6                                | 67,43     | 8,45 | 6             | 52,81     | 6,28 | 6             | 56,58     | 0,84 |
| 8                                | 76,92     | 7,86 | 8             | 65,01     | 4,74 | 8             | 68,10     | 1,66 |
| 10                               | 84,21     | 8,19 | 10            | 74,50     | 1,46 | 10            | 75,42     | 1,22 |
| 12                               | 89,56     | 7,38 | 12            | 83,24     | 2,13 | 12            | 81,41     | 1,38 |
| $f_2 = 53,83$                    |           |      | $f_2 = 70,87$ |           |      | $f_2 = 92,47$ |           |      |
| SE CP                            |           |      |               |           |      |               |           |      |
| t (h)                            | povprečje | SD   |               |           |      |               |           |      |
| 2                                | 28,59     | 2,56 |               |           |      |               |           |      |
| 4                                | 44,69     | 4,90 |               |           |      |               |           |      |
| 6                                | 60,42     | 4,68 |               |           |      |               |           |      |
| 8                                | 70,21     | 4,84 |               |           |      |               |           |      |
| 10                               | 77,93     | 5,33 |               |           |      |               |           |      |
| 12                               | 84,75     | 5,58 |               |           |      |               |           |      |
| $f_2 = 83,28$                    |           |      |               |           |      |               |           |      |