

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALJAŽ PISNIK

MAGISTRSKO DELO

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



ALJAŽ PISNIK

**SPREMLJANJE INDUSTRIJSKEGA MEŠANJA PRAŠKOV V
REALNEM ČASU Z UPORABO BLIŽNJE INFRARDEČE
SPEKTROSKOPIJE**

**IN-LINE MONITORING OF INDUSTRIAL POWDER BLENDING
PROCESS BY USING NEAR-INFRARED SPECTROSCOPY**

MAGISTRSKO DELO

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko delo sem opravljal v farmacevtskem podjetju pod mentorstvom izr. prof. dr. Roka Dreua, mag. farm. in somentorstvom dr. Maje Sušec, univ. dipl. ing. kem. teh.

Zahvala

Zahvaljujem se izr. prof. dr. Roku Dreu in dr. Maji Sušec za strokovno pomoč pri izdelavi magistrskega dela. Prav tako se zahvaljujem farmacevtskemu podjetju, ki mi je omogočilo izvedbo magistrske naloge in zaposlenim za pomoč in ustvarjanje prijetnega delovnega okolja.

Posebna zahvala gre mojim staršem in sestri, ki so mi omogočili študij in mi vseskozi stali ob strani. Iskreno se zahvaljujem puncu Mateji za neomajno podporo in vzpodbudo. Hvala tudi prijateljem za popestritev študijskih dni.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelal pod mentorstvom izr. prof. dr. Roka Dreua, mag. farm. in somentorstvom dr. Maje Sušec, univ. dipl. ing. kem. teh.

Ljubljana, 12.10.2018

Aljaž Pisnik

Predsednik komisije: prof. dr. Danijel Kikelj

Mentor: izr. prof. dr. Rok Dreu

Somentorica: dr. Maja Sušec

Članica komisije: asist. dr. Janja Zupan

Vsebina

Povzetek	VII
Abstract	VIII
Seznam okrajšav	IX
1. UVOD.....	1
1.1. PROCESNO ANALIZNE TEHNOLOGIJE	1
1.1.1. PODROČJA UPORABE PAT IN VRSTE INSTRUMENTALNIH TEHNIK.....	2
1.1.2. PAT IN VGRAJENA KAKOVOST	4
1.2. PROCES MEŠANJA PRAŠKOV IN MERILA HOMOGENOSTI ZMESI.....	5
1.2.1. MEHANIZMI MEŠANJA IN SEGREGACIJE	6
1.2.2. POMEN LASTNOSTI DELCEV V PROCESU MEŠANJA	7
1.2.3. VRSTE MEŠALNIKOV	8
1.2.4. OCENJEVANJE HOMOGENOSTI ZMESI	10
1.3. BLIŽNJA INFRARDEČA SPEKTROSKOPIJA V PROCESU MEŠANJA	10
1.3.1. PRINCIP DELOVANJA NIR SPEKTROMETRA	11
1.3.2. POSTAVITEV KALIBRACIJSKEGA MODELA IN OBDELAVA SPEKTROV.....	13
1.3.3. NIR SPEKTROSKOPIJA PRI INDUSTRIJSKEM MEŠANJU	15
2. NAMEN DELA.....	16
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1. SEZNAM UPORABLJENIH MATERIALOV IN OPREME	17
3.2. KALIBRACIJSKI VZORCI.....	18
3.2.1. ZDRAVILNA UČINKOVINA IN POMOŽNI SNOVI	18
3.2.2. IZBOR, PRIPRAVA IN HPLC ANALIZA KALIBRACIJSKIH VZORCEV	19
3.3. INDUSTRIJSKO MEŠANJE SUROVIN	20
3.3.1. MEŠALNIK S PRIPOMOČKI	20
3.3.2. IZBIRA VZORCA ZA ANALIZO.....	21
3.4. NIR SPEKTROMETER IN PROGRAMSKA OPREMA.....	21

3.5.	NIR SPEKTROSKOPSKE MERITVE	24
3.5.1.	SNEMANJE NIR SPEKTROV KALIBRACIJSKIH VZORCEV	24
3.5.2.	»IN-LINE« SNEMANJE SPEKTROV	25
3.6.	RAZVOJ KVANTITATIVNE METODE	26
3.6.1.	IZGRADNJA IN VREDNOTENJE KALIBRACIJSKEGA MODELA	26
3.6.2.	NABOR MATEMATIČNIH OBDELAV SPEKTROV	27
3.7.	RAZVOJ KVALITATIVNE METODE	30
3.8.	DOLOČANJE VELIKOSTI DELCEV ZU	31
4.	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	32
4.1.	KVANTITATIVNI KALIBRACIJSKI MODEL.....	32
4.1.1.	POSTAVITEV IN VREDNOTENJE KALIBRACIJSKEGA MODELA.....	32
4.1.2.	VPLIV FIZIKALNIH LASTNOSTI DELCEV ZU NA ODZIV KALIBRACIJSKEGA MODELA... 34	
4.2.	UPORABA KVANTITATIVNEGA MODELA ZA OPAZOVANJE INDUSTRIJSKEGA MEŠANJA.. 38	
4.2.1.	NAPOVEDNA SPOSOBNOST MODELA IN DOLOČITEV HOMOGENOSTI ZMESI..... 38	
4.2.2.	VIZUALIZACIJA SEKVENC MEŠANJ	42
4.3.	RAZVOJ IN VREDNOTENJE KVALITATIVNEGA MODELA.....	46
4.3.1.	DOLOČANJE ZA ZDRAVILNO UČINKOVINO ZNAČILNIH PODROČIJ SPEKTROV S PCA 46	
4.3.2.	VARIANČNA METODA.....	47
4.3.3.	DISTANČNA METODA	48
5.	SKLEP	53
	LITERATURA.....	55
	Priloga 1.....	59
	Priloga 2.....	60
	Priloga 3.....	61

Kazalo slik

Slika 1 Vrste procesno analiznih tehnik glede na način odvzema vzorca. (povzeto po (2)).	1
Slika 2 Dvodimenzionalni prikaz razporeditve delcev zmesi. a) popolna segregacija b) idealna zmes c) naključna zmes (povzeto po (12)).....	5
Slika 3 Shematski prikaz mehanizmov mešanja. (povzeto po (13)).....	6
Slika 4 Shematski prikaz delca z označenimi premeri. (povzeto po (19)).....	8
Slika 5 Različne vrste konvekcijskih mešalnikov. (povzeto po (13)).....	9
Slika 6 Diagram potencialne energije harmoničnega (a) in neharmoničnega (b) oscilatorja glede na razdaljo (r) med dvema atomoma. (povzeto po (30))	11
Slika 7 Tehnike merjenja absorbance. (povzeto po (29))	12
Slika 8 Poenostavljena shema spektroskopskih naprav. (povzeto po (29))	12
Slika 9 Primeri NIR spektrov. a) čisti spektri, b) SNV, c) SG, d) odvajanje po Norrisu (povzeto po (40))	14
Slika 10 Primer mešalnika z zalogovnikom. (povzeto po (45)).....	21
Slika 11 Antaris™ Target Blend Analyzer.	22
Slika 12 Shema notranjih komponent instrumenta Antaris™ Target. (povzeto po (47)) ...	23
Slika 13 Postopek merjenja standardnih vzorcev. (povzeto po (48)).....	25
Slika 14 Položaj A predstavlja začetni položaj mešalnika in NIR instrumenta. V položaju B začne NIR instrument izvajati meritev in jo prekine ob prihodu v točko C. Ob zaključku obrata mešalnika se instrument ponovno vrne v točko A.....	26
Slika 15 Vsebnosti ZU pri različnih obdelavah spektrov v zadnjih treh obratih za neodvisno sekvenco mešanja zmesi A in njihovo povprečje. Rdeča vodoravna črta predstavlja vsebnost ZU določeno z referenčno HPLC analizo.....	28
Slika 16 Vsebnosti ZU pri različnih obdelavah spektrov v zadnjih treh obratih za neodvisno sekvenco mešanja zmesi B in njihovo povprečje. Rdeča vodoravna črta predstavlja vsebnost ZU določeno z referenčno HPLC analizo	29
Slika 17 Kalibracijski model za zmesi A. »Actual« - vrednosti kalibracijskih standardov določene s HPLC analizo, »Calculated« - vrednosti kalibracijskih standardov kot odziv kalibracijskega modela	33
Slika 18 Kalibracijski model za zmesi B. »Actual« - vrednosti kalibracijskih standardov določene s HPLC analizo, »Calculated« - vrednosti kalibracijskih standardov kot odziv kalibracijskega modela	34

Slika 19 Krivulji 10A – izvorna in 6A - izvorna predstavljata vsebnosti ZU določene z NIR spektrometrom od 300. obrata mešalnika do zaključka mešanja.	35
Slika 20 Modra krivulja (10A - izvorna) prikazuje vsebnosti ZU izračunane s kalibracijskim modelom tekom celotne sekvence mešanja. Oranžna krivulja (10A - MA) prikazuje drseče povprečje vsebnosti ZU.	37
Slika 21 Siva krivulja (6A - izvorna) prikazuje vsebnosti ZU izračunane s kalibracijskim modelom tekom celotne sekvence mešanja. Rdeča krivulja (6A – MA) prikazuje drseče povprečje vsebnosti ZU.	38
Slika 22 Prikaz vsebnosti mešanj (VS 1 - 3) in RSD (1 - 3) od začetka mešanja do 200. obrata mešalnika.	40
Slika 23 Vsebnosti ZU zmesi 10B določene z NIR spektroskopijo v posameznih obratih mešanja.	43
Slika 24 Krivulje prikazujejo z NIR spektroskopijo določene vsebnosti ZU v posameznih obratih za vse opazovane zmesi A.	44
Slika 25 Krivulje prikazujejo z NIR spektroskopijo določene vsebnosti ZU v posameznih obratih za vse opazovane zmesi B.	45
Slika 26 Prikaz statistični spektrov (vijolična krivulja), ki izražajo korelacijo med intenziteto spektra pri določenem valovnem številu in vsebnostjo ZU. Rdeča krivulja predstavlja povprečen spekter z oznakami valovnih števil, ki smo jih uporabili pri razvoju kvalitativnih modelov.	46
Slika 27 Modra krivulja predstavlja SD računano po metodi MSD. Oranžna krivulja predstavlja drseče povprečje vsebnosti ZU določenih z NIR. Z rdečo črto je označena točka, kjer je zmes homogena.	47
Slika 28 Modra krivulja predstavlja RMSE/sqrt(10) računano po metodi DMBA - TS. Oranžna krivulja predstavlja drseče povprečje vsebnosti ZU določenih z NIR. Z rdečo črto je označena točka, kjer je zmes 7A homogena.	49
Slika 29 Krivulje napak izračunanih po metodi DMBA – TS za sekvence mešanj zmesi A.	50
Slika 30 Krivulje napak izračunanih po metodi DMBA – TS za sekvence mešanj zmesi B.	50

Kazalo preglednic

Preglednica I Primeri uporabe PAT pri nekaterih postopkih izdelave trdnih farmacevtskih oblik.....	3
Preglednica II Fizikalno-kemijske lastnosti mikrokrystalne celuloze. * Lastnosti se glede na razred pomožne snovi razlikujejo, zato sta navedeni vrednosti za vsak razred.....	19
Preglednica III Standardni vzorci za kalibracijski model vrednotenja zmesi s tarčno vsebnostjo 50 % ZU.	19
Preglednica IV Standardni vzorci za kalibracijski model vrednotenja zmesi s tarčno vsebnostjo 70% ZU.	20
Preglednica V Specifikacije instrumenta Antaris Target™.	23
Preglednica VI Zbrani rezultati vrednotenja kalibracijskega modela po uporabi različnih matematičnih obdelav spektrov za zmesi A.	28
Preglednica VII Zbrani rezultati vrednotenja kalibracijskega modela po uporabi različnih matematičnih obdelav spektrov za zmesi B.	29
Preglednica VIII Rezultati HPLC analiz kalibracijskih standardov in »in-line« vzorcev zmesi A in B.	32
Preglednica IX Preglednica sekvenc mešanj s pripadajočimi vrednostmi RSD in uporabljenimi serijami ZU. RSD – relativni standardni odklon, MA – drseče povprečje z obsegom 10 podatkov.....	35
Preglednica X Fizikalne lastnosti uporabljenih serij ZU. $D_{0,5}$ – premer delca, od katerega je manjše 50 % mase delcev, $D_{0,9}$ – premer delca, od katerega je manjše 90 % mase delcev, 10 μm – odstotek mase delcev s premerom manjšim od 10 μm , 150 μm odstotek mase delcev s premerom manjšim od 150 μm , 75 μm – odstotek mase delcev s premerom manjšim od 75 μm	36
Preglednica XI Vsebnosti ZU ob koncu mešanja za zmesi A določene z NIR spektroskopijo in referenčno HPLC analizo. Vsebnost NIR – vsebnost ZU določena z NIR spektroskopijo, Vsebnost HPLC – vsebnost ZU določena s HPLC.....	39
Preglednica XII Vsebnosti ZU ob koncu mešanja za zmesi B določene z NIR spektroskopijo in referenčno HPLC analizo. Vsebnost NIR – vsebnost ZU določena z NIR spektroskopijo, Vsebnost HPLC – vsebnost ZU določena s HPLC.....	39
Preglednica XIII Obrati, kjer je bil mešalnik zaustavljen s pripadajočimi vrednostmi RSD in vsebnosti ZU v zmesih A.....	40

Preglednica XIV Končne točke mešanj določene s kalibracijskim modelom za zmesi A in B ter serije ZU uporabljene za posamezne zmesi. Obrat – končna točka – obrat pri katerem s pomočjo definiranega kriterija ocenimo zadovoljivo homogenost zmesi	42
Preglednica XV Intenzitete spektrov pri valovnih številih določenih s PCA in njihove povprečne vrednosti.....	48
Preglednica XVI Rezultati določitve končnih točk mešanj s pomočjo kvalitativne metode DMBA - TS in zbrane razlike med št. obratov končne točke mešanja s pomočjo DMBA - TS in kvantitativnim modelom. Predznak + označuje presežek št. obratov, znak – pa primanjkljaj v primerjavi s kvantitativno metodo.	51

Povzetek

Bližnja infrardeča (NIR) spektroskopija je kemometrična procesno analizna tehnologija, ki omogoča spremljanje tehnološkega procesa mešanja v realnem času. Metode NIR smo razvijali za postopek industrijskega mešanja dvokomponentnih zmesi z razmerjem zdravilne učinkovine in pomožne snovi 1 : 1 (zmesi A) in 7 : 3 (zmesi B).

Za izgradnjo kvantitativnega kalibracijskega modela smo uporabili 7 predpripravljenih kalibracijskih standardov zmesi. Z namenom povečevanja robustnosti metode, smo vključili še spektre zmesi zadnjih dveh obratov industrijskega mešalnika, potem ko smo potrdili homogenost končne mešanice. Kot referenčno metodo za določanje vsebnosti smo tekom celotnega eksperimentalnega dela uporabljali tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti. Za predobdelavo čistih spektrov smo uporabljali kombinacije metod normalizacije s standardnim odklonom (SNV), prvega in drugega odvoda spektra, Savitzky-Golay glajenja in odvajanja po Norrisu. V primeru zmesi A se je kot najprimernejša kombinacija izkazala SNV in prvi odvod, za zmesi B pa SNV in odvajanje po Norrisu. S preučevanjem velikosti delcev uporabljenih tipov učinkovin se je izkazalo, da populacija z večjim deležem manjših delcev ni primerna za učinkovito uporabo NIR spektroskopije za določanje homogenosti mešanice. Napovedno sposobnost kvantitativnega modela smo ovrednotili s primerjavo izračunanih vsebnosti in vsebnosti referenčne analize. Za določitev končne točke mešanja z NIR spektroskopijo smo upoštevali, da je ocenjena vsebnost učinkovine znotraj specifikacijskega intervala ter da je relativna standardna deviacija zadnjih 27 rezultatov vsebnosti manjša od 0,150 %. Napoved smo potrdili z medfaznim vzorčenjem zmesi, ko je razvita metoda v skladu s kriterijem zmes označila za homogeno in nato določili vsebnost zdravilne učinkovine. Ovrednotili smo časovni prihranek ob uporabi razvite metode, ki bi za zmesi A v povprečju znašal 18,5 min in 14 min za zmesi B. Za razvoj kvalitativnega modela ocene homogenosti zmesi smo uporabili variančno in distančno tehniko. Prva je temeljila na primerjavi zaporednih blokov z 10 spektri in je imela prenizko občutljivost, saj je bila opazovana zmes označena za homogeno cca 130 obratov mešalnika prej kot s kvantitativnim modelom. Primerljiva s kvantitativnim modelom je bila distančna tehnika, kjer smo spektre primerjali z referenčnimi spektri homogene zmesi s tarčno vsebnostjo učinkovine. V povprečju se je distančna metoda pri spremljanju zmesi A od kvantitativne razlikovala za dodatnih 28 obratov in od zmesi B za dodatnih 9 obratov mešalnika.

Abstract

Near-infrared (NIR) spectroscopy is a chemometric process analytical technology that enables in-line control of the technological process. The NIR methods were developed for control of industrial mixing procedure of mixtures with active substance to excipient ratio of 1 : 1 (mixtures A) and 7 : 3 (mixtures B).

In order to build a quantitative calibration model, we used 7 manually prepared calibration standards. To increase the robustness of the method, we included the spectra of mixtures from the last two rotations of the mixer during industrial mixing, after we conformed homogeneity of final mixture. As a reference method for active substance content determination, high-performance liquid chromatography was used throughout the entire experimental part. The spectra were pretreated with various mathematical methods. We used combinations of Standard Normal Variate (SNV), first and second derivatives of spectrum, Savitzky-Golay smoothing and Norris derivative. In case of mixtures A the most suitable combination was SNV with first derivative and SNV with Norris derivative for mixtures B. By studying the particle size distribution of different active substance types, it turned out that population with higher portion of smaller particles is not appropriate for effective use of NIR spectroscopy for mixture homogeneity determination. The predictive ability of quantitative model was evaluated by comparing calculated to reference content values. To determine mixing endpoint with NIR spectroscopy, we considered that the active substance content is within specification interval and relative standard deviation of the last 27 results is lower than 0,150 %. Prediction was confirmed by in-process mixture sampling after quantitative method determined homogeneity of mixture. Sample was then evaluated with reference method on active substance content. The time savings using the developed method were evaluated resulting 18,5 min for mixture A and 14 min for mixture B. We used a variance and distance technique to develop a qualitative model for evaluation of mixture homogeneity. The first one was based on a comparison of consecutive blocks of 10 spectra and had a poor sensitivity, since the observed mixture was labelled as homogeneous about 130 turns of mixer earlier as a quantitative model. Comparable to the quantitative model was the distance technique where the spectra were compared to reference spectra of the homogeneous mixture with target content of the active substance. On average, the distance method differed from quantitative method for additional 28 rotations for mixtures A and additional 9 rotations for mixtures B.

Seznam okrajšav

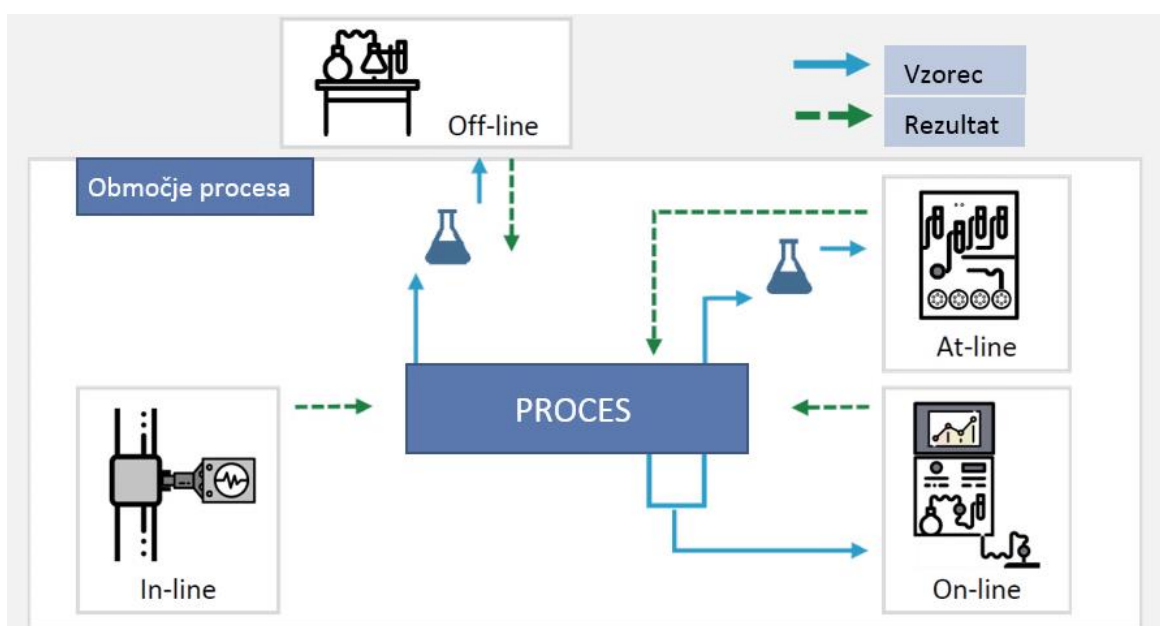
Okrajšava	Slovenski izraz	Angleški izraz
ARS	akustična resonančna spektroskopija	acoustic resonance spectroscopy
DMBA - TS	primerjava razlike drsečega povprečja s tarčnim/referenčnim spektrom	difference between the moving block average as compared to target spectrum
BU	enakomernost vsebnosti zmesi	blend uniformity
CMA	kritična lastnost materiala	critical material attributes
CPP	kritični procesni parameter	critical process parameters
CQA	kritična lastnost izdelka	critical quality attributes
FBRM	metoda merjenja odboja fokusirane laserske svetlobe	focused beam reflectance measurement
FDA	uprava ZDA za hrano in zdravila	Food and Drug Administration
GMP	dobra proizvodna praksa	good manufacturing practice
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti	high performance liquid chromatography
IBC	zalogovnik za polizdelek	Intermediate Bulk Container
MA	drseče povprečje	moving average
MEMS	mikroelektromehanski sistem/element	Micro Electro Mechanical System
MVA	multivariantna analiza	multivariate analysis
MSD	standardni odlon drsečega okvirja	moving block standard deviation
NIR	bližnje infrardeče področje	near-infrared

PAT	procesno analizne tehnologije	process analytical technologies
PC	glavna komponenta	principal component
PCA	metoda glavnih komponent	principal component analysis
PLS	metoda delnih najmanjših kvadratov	partial least squares
PS	pomožna snov	excipient
QbD	Razvoj z vgrajeno kakovostjo	Quality by Design
QTPP	ciljni kakovostni profil izdelka	quality target product profile
RMSE	koren povprečenega kvadrata napake	root mean square error
RMSEC	koren povprečenega kvadrata napake kalibracije	root mean square error of calibration
RMSECV	koren povprečenega kvadrata napake navzkrižne validacije	root mean square error of cross validation
RSD	relativna standardni odklon	relative standard deviation
SFT	tehnika s postopkom prostorskega filtra	spatial filtering technique
SG	Savitzky – Golay	Savitzky - Golay
SNV	normalizacija s standardnim odklonom	Standard Normal Variate
SPC	statistični nadzor procesa	statistical process control
SQC	statistični nadzor kakovosti	statistical quality control
TPS	teraherčna pulzna spektroskopija	terahertz pulsed spectroscopy
USP	ameriška farmakopeja	United States Pharmacopoeia
UV-VIS	ultravijolično-vidno področje	ultraviolet-visible region
ZU	zdravilna učinkovina	active pharmaceutical ingredient
1D, 2D	prvi, drugi odvod	first, second derivative

1. UVOD

1.1. PROCESNO ANALIZNE TEHNOLOGIJE

Zagotavljanje kakovostnih farmacevtskih izdelkov že več desetletij temelji na njihovi končni kontroli, serijsko osnovani proizvodnji in kontroli vstopnih materialov. Na področju farmacevtske industrije prelomnico predstavlja izdaja smernic procesno analizne tehnologije (ang. process analytical technology, PAT) ter pristopa razvoja z vgrajeno kakovostjo (ang. quality by design, QbD). Priporočili v ospredje postavljata podrobno poznavanje uporabljenih snovi, torej definiranje, merjenje in napovedovanje njihovih lastnosti. Skoraj vsi končni farmacevtski izdelki so sestavljeni iz dveh ali več komponent, zato je potrebno raziskati tudi njihove medsebojne vplive. Poleg kritičnih lastnosti vstopnih surovin je pomembno poznavanje spremenljivk procesa, ki vplivajo na končno kakovost izdelka (1). Za potrebe spremljanja procesa je potrebna uporaba ustreznih metod, s katerimi lahko zajamemo reprezentativen vzorec. Slika 1 prikazuje različne vrste analize glede na prostor izvedbe analize in način poseganja v vzorec (2).



Slika 1 Vrste procesno analiznih tehnik glede na način odvzema vzorca. (povzeto po (2))

PAT je po definiciji Uprave ZDA za hrano in zdravila (ang. Food and Drug Administration, FDA) sistem načrtovanja, analiziranja in kontroliranja kritičnih lastnosti vstopnih surovin ter sposobnosti procesa z namenom zagotavljanja končne kakovosti produkta. Gre za širok pojem, ki ne predstavlja le pridobivanja podatkov o procesu s pomočjo spektroskopskih in

drugih analiznih metod. Za učinkovito uporabo PAT je potrebno poznati odnos kritičnih procesnih parametrov in kakovosti končnega izdelka. V nasprotju s klasičnimi laboratorijskimi metodami se uporabljajo enostavnejši senzorji za zbiranje informacij in kompleksnejši algoritmi za obdelavo podatkov. Te morajo imeti sposobnost obdelave velike količine podatkov, ki nastajajo tekom procesa in jih z ustreznimi statističnimi metodami pretvoriti v uporabne kazalnike. Vzpostavitev in vzdrževanje takšnega sistema tehnologij je zapletena, a ima številne prednosti. Omogoča spremljanje procesa v realnem času in ponuja takojšnje rešitve v primeru odstopanj. Olajša tudi avtomatizacijo procesov in posledično zmanjšuje število človeških napak. Omenjene izboljšave predstavljajo na eni strani finančni prihranek, na drugi pa vzpostavljajo način za znanstveno podprto kontrolo procesa, ki hkrati zmanjšuje tudi vpliv človeškega faktorja (3,4).

Vpeljava PAT v vsakdanjo proizvodnjo predstavlja velik izziv na področju regulative, tehnoloških zahtev in finančnega vložka. Prva ovira je izvedba validacij PAT metod, saj ni jasno zastavljenih validacijskih zahtev. Pojavlja se še vprašanje skladnosti z »21 CFR Part 11«, tj. dokument izdan s strani FDA, ki vsebuje navodila za upravljanje elektronskih zapisov in podpisov v farmacevtski industriji (5). FDA je situacijo olajšal z izdajo smernic PAT leta 2004. Drugi dejavnik, ki upočasnjuje razvoj PAT, je stroškovni vidik projekta. Poleg instrumentov PAT in njim pripadajoče opreme dodatno dviga ceno nadgradnja informacijske tehnologije. Za razliko od klasičnega nadzorovanja proizvodnje gre pri PAT za kopičenje večje količine podatkov. Več podatkov predstavlja tudi več možnosti za identifikacijo odstopanj procesa, čeprav bi bil produkt v okviru konvencionalnega nadzora ustrezen. Posledično se lahko poveča število odstopov od standardnega postopka, kar predstavlja stroškovni problem in potencialni padec ugleda proizvajalca ob neizpolnjevanju naročil. Pomanjkanje znanja in tveganost investicije sta torej glavna razloga za počasen razvoj PAT (4).

1.1.1. PODROČJA UPORABE PAT IN VRSTE INSTRUMENTALNIH TEHNIK

PAT se uporablja na področjih pridobivanja aktivnih učinkovin in tehnoloških postopkih izdelave farmacevtskih oblik. V okviru naloge smo raziskovali PAT pri procesu mešanja dvokomponentnih zmesi, zato se v tem poglavju osredotočamo na trdne peroralne farmacevtske oblike. Te se v farmacevtski industriji izdelujejo v največjem obsegu, saj so stabilne in jih pacienti večinoma sprejemajo bolje kot druge. Veliko število spremenljivih parametrov opravičuje metode PAT kot pristop kontrole in nadzora tekom izdelave (4). PAT

se uporablja v postopkih sušenja, mešanja, mletja, aglomeracije, tabletiranja in oblaganja. Pri teh se konvencionalno nadzoruje proces s pomočjo temperature, tlaka, sil, pH in drugih fizikalnih parametrov. PAT v ozkem pomenu pomeni spremljanje materiala tekom procesa v realnem času s pomočjo kompleksnejših fizikalno-kemijskih tehnologij (6). Od opazovanega procesa je odvisna uporaba vrste analizne metode. Med njimi prevladuje uporaba bližnje infrardeče (ang. near-infrared, NIR) spektroskopije. Sledijo še ramanska spektroskopija, teraherčna pulzna spektroskopija (ang. terahertz pulsed spectroscopy, TPS), metoda s postopkom prostorskega filtra (ang. spatial filtering technique, SFT), metoda merjenja odboja fokusirane laserske svetlobe (ang. focused beam reflectance measurement, FBRM) itd. (7,8).

Preglednica I Primeri uporabe PAT pri nekaterih postopkih izdelave trdnih farmacevtskih oblik.

Vrsta procesa	Opazovana lastnost z analizno tehniko
Mešanje	<ul style="list-style-type: none"> • homogenost zmesi z NIR spektroskopijo, ramansko spektroskopijo in lasersko inducirano fluorescenco • enakomernost porazdelitve drsila z NIR spektroskopijo
Vrtinčnoslojni procesi	<ul style="list-style-type: none"> • vsebnost vlage v delcih z NIR spektroskopijo • velikost delcev s SFT, FBRM, metodami slikovne analize
Kompaktiranje	<ul style="list-style-type: none"> • gostota in poroznost granulata z NIR spektroskopijo • velikost delcev z FBRM, metodami slikovne analize
Tabletiranje	<ul style="list-style-type: none"> • spremljanje segregacije v polnilnem škornju tabletirke z NIR spektroskopijo • identifikacija tablet z akustično resonančno spektroskopijo (ang. acoustic resonance spectroscopy, ARS) • mehanske lastnosti tablete z lasersko interferometrijo, NIR
Oblaganje z učinkovino	<ul style="list-style-type: none"> • koncentracija in enakomernost zdravilne učinkovine v filmski oblogi z NIR spektroskopijo, ramansko spektroskopijo • analiza filmske obloge s prirejenim sproščanjem s TPS

1.1.2. PAT IN VGRAJENA KAKOVOST

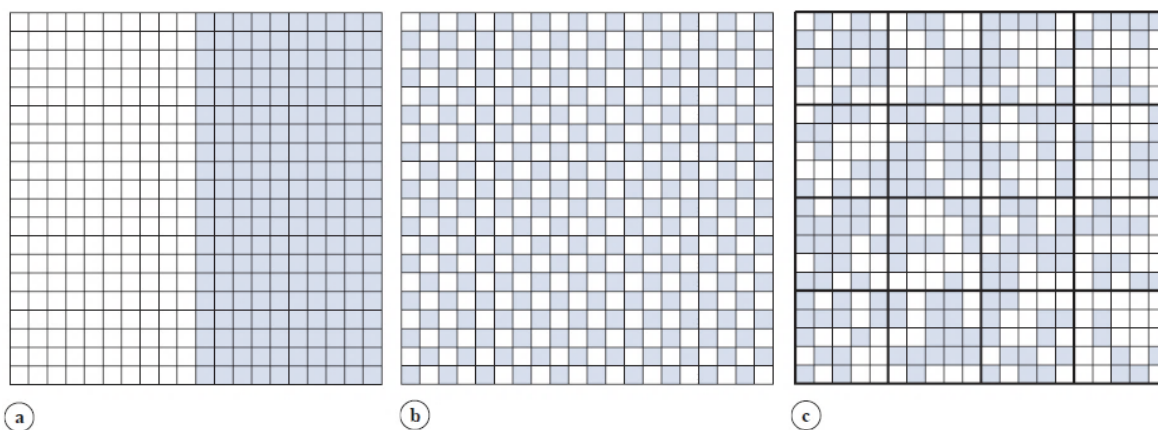
Razvoj z vgrajeno kakovostjo je definiran kot sistematični razvoj s predpostavljenimi cilji kakovosti produkta in poudarkom na razumevanju procesa z njegovo kontrolo na podlagi znanstvenih dokazov in obvladovanja tveganj (Pharmaceutical Development Annex to ICH, Q8, 2007) (9). Osnova vgrajene kakovosti je ciljni kakovostni profil izdelka QTPP (ang. quality target product profile, QTPP). Predstavlja idealne karakteristike končnega izdelka vključno z varnostjo in učinkovitostjo z namenom minimizacije tveganja za pacienta. Postavitev QTPP usmerja način izdelave k predpisanim ciljem. Kritične lastnosti produkta (ang. critical quality attributes, CQA) so fizikalne, kemijske in (mikro)biološke lastnosti proizvedenega izdelka, znotraj katerih je izdelek kakovosten. Za ustrezno načrtovanje procesa je potrebno upoštevanje kritičnih lastnosti materiala (ang. critical material attributes, CMA), ki predstavljajo neposredno povezavo med procesom in kakovostjo končnega produkta. Tekom procesa se spremljajo in nadzirajo kritični procesni parametri (ang. critical process parameters, CPP). Vrednosti znotraj postavljenih mej zagotavljajo kakovost končnega izdelka. Procesni parameter se opredeli za kritičnega s pomočjo občutljivosti CQA in CMA ob njegovi spremembi. Kadar z majhno spremembo v procesnem parametru zagotovimo ustrezne kakovosti produkta, sta CQA in CMA občutljiva na spremembo in parameter se označi kot CPP (10).

PAT omogoča nadzor in spremljanje procesa s posredovanjem kvalitativnih in kvantitativnih podatkov o CPP in CMA. Posledično se zagotovi ustreznost CQA in približanje pred izdelavo definiranemu QTPP. Brez uporabe procesno analiznih tehnologij trajanje tehnološkega procesa temelji na časovno definiranih končnih točkah. Uporaba PAT omogoča določitev končne točke procesa glede na njegovo razumevanje skupaj s CMA. Leuenberger in sod. so raziskali določanje končne točke vlažnega granuliranja. Ugotovili so, da sta parametra poraba moči pri mešanju in navor mešala uporabna le kot preliminarni pokazatelj končne točke. Točno zaustavitev procesa se lahko definira s CMA, npr. velikost granul, ki jo pridobimo s pomočjo PAT. Prvi korak k implementaciji QbD je statistični nadzor parametrov kakovosti (ang. statistical quality control, SQC), kjer spremljamo pomembne lastnosti kakovosti produktov v časovnem obdobju s pomočjo statističnih metod. Naprednejši način je statistični nadzor procesa (ang. statistical process control, SPC), ki pomeni uporabo statističnih metod za dokazovanje stabilnosti procesa skozi čas in za razliko od SQC daje informacijo o vzroku za spremenljivost procesa. S PAT hkrati pridobimo

podatke za več spremenljivk procesa. Gre za multivariantno analizo (ang. multivariate analysis, MVA). Mnoge spremenljivke med seboj korelirajo v znanem odnosu, zato njihovo število zmanjšamo s pomočjo matematičnih algoritmov MVA (10).

1.2. PROCES MEŠANJA PRAŠKOV IN MERILA HOMOGENOSTI ZMESI

Mešanje je definirano kot proces, pri katerem dve ali več komponent, katerih delci so popolnoma ali delno ločeni, preidejo v stanje, kjer se delci določene komponente nahajajo čim bližje delcem vseh drugih komponent. Z izrazom razmešanje oz. segregacija je opredeljen mešanju nasproten proces. Uporaba mešanja nudi podporo naravni difuziji in pospešuje potek kemijskih in fizikalnih sprememb. Na področju izdelave farmacevtskih oblik je za zagotavljanje enakomerne sestave zmesi pomembno, da imajo posamezne manjše enote enako sestavo kot zmes, iz katere so bile izdelane. Razporeditev delcev v procesu mešanja najlažje prikažemo z dvokomponentno zmesjo enake količinske sestave (Slika 2). Stanje popolne segregacije pomeni popolno ločenost delcev obeh sestavin. V idealni zmesi najdemo delce ene komponente obdane samo z delci druge. V praksi želimo izdelati naključne zmesi, kjer je verjetnost nahajanja delca določene komponente enaka na vseh lokacijah, njeno vrednost pa predstavlja delež teh delcev (11,12).



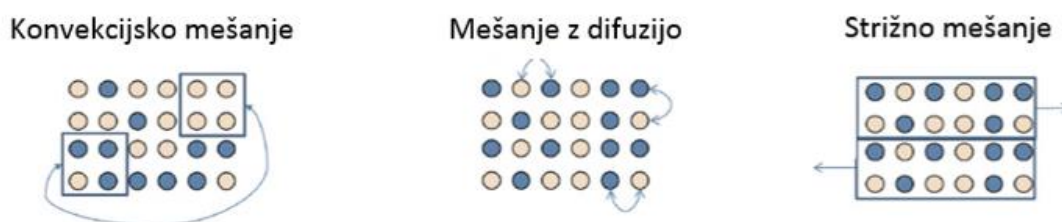
Slika 2 Dvodimenzionalni prikaz razporeditve delcev zmesi. a) popolna segregacija b) idealna zmes c) naključna zmes (povzeto po (12))

Mešanje praškastih zmesi dveh ali več komponent po Danckwertsovi kategorizaciji (Dankwerts, 1953) označimo kot nevtrarno:

- *Pozitivno mešanje* – S časom pride do spontanega nastanka popolne zmesi. Primera pozitivnega mešanja sta mešanje plinov ali mešajočih tekočin.
- *Negativno mešanje* – Po končanem mešanju se komponente zmesi ločijo pri vseh dvofaznih sistemih z različnimi gostotami. Primer negativnega mešanja je suspenzija trdnih delcev v tekočini.
- *Nevtrarno mešanje* – V kolikor na sistem ne delujejo zunanje sile, ne pride niti do mešanja, niti do segregacije (11).

1.2.1. MEHANIZMI MEŠANJA IN SEGREGACIJE

Mešanje je dinamičen proces, ki porablja energijo za premikanje delcev znotraj zmesi. Vnos energije je mogoč s premikanjem mešala ali rezil in s pomočjo gravitacije/plazenja. Nekatere vrste mešalnikov omogočajo kombinacijo večih načinov mešanja. Delci se med mešanjem premikajo relativno drug na drugega. Ločimo mehanizme potovanja delcev s pomočjo konvekcije, striga in difuzije (Slika 3). Vedno sodelujejo vsi trije, vendar je prispevek posameznega odvisen od vrste mešalnika, procesnih parametrov, lastnosti delcev in pretočnosti snovi. Konvekcija, imenovana tudi makroskopsko mešanje, je proces premikanja večjih skupkov delcev med različnimi področji plasti. Strižno mešanje pomeni drsenje ene plasti zmesi prek druge z mešanjem na ravnini zdrsa. Pri mešanju z difuzijo posamezni delci preko prekloacije zapolnijo prostor ustvarjen s pomočjo plazenja ali ustvarjanja vrtincev pomočjo vrtenja mešal in rezil. S konvekcijo in strigom hitro dosežemo visoko stopnjo mešanja, vendar je za stanje naključne zmesi potrebna še difuzija, kjer se delci premikajo znotraj posameznih skupkov (12).



Slika 3 Shematski prikaz mehanizmov mešanja. (povzeto po (13))

Mešanju nasprotujejo mehanizmi segregacije, ki izhajajo iz razlik v velikosti, gostoti in obliki delcev. Najpogosteje gre za sledeče pojave:

- *Trajektorna segregacija* nastane pri kataraktnem premikanju delcev v konvekcijskih mešalnikih in mešalnikih z rezili zaradi razlike v velikosti in gostoti. Težji delci potujejo dlje od začetne točke.
- *Segregacijo zaradi razlik v aerodinamičnem premeru (elutracijo)* se opazi pri drobnih delcih, ko potujejo v toku zraka. Primer takšne segregacije je sipanje praškov iz mešalnika, ker zračni tokovi dvigajo drobne delce, ki se nato posedajo na površino grobih.
- *Perkolacija* je posledica različne velikosti ali gostote delcev, ki se ob tresljajih pomikajo proti dnu mešalnika prek odprtin med večjimi delci.
- *Segregacija na prostih površinah (»shifting«)* se pojavi pri toku praška v obliki curka in oblikuje stožčasto nasutje. Ker bolj grobi delci potujejo dlje, pride do razslojevanja (12–14).

Pri določanju učinkovitosti mešanja ločimo intenziteto in razširjenost segregacije. Intenziteta predstavlja stopnjo segregacije na nekem območju vzorca, razširjenost pa velikost območij segregacije. Pojava se med seboj izničita v primeru, da je ob visoki intenziteti dovolj nizka razširjenost segregacije in obratno. Nastanku naključne zmesi se približamo s številnimi tehnološkimi ukrepi, ki ravnovesje med mehanizmi mešanja in segregacije premaknejo v smer prvih. Med njimi so pogosti poenotenje velikosti delcev (kontrolirana kristalizacija, sejanje, mletje), izbira pomožnih snovi s podobnimi gostotami, aglomeracija delcev, zmanjševanje izpostavljenosti vibracijam idr. (12,13).

1.2.2. POMEN LASTNOSTI DELCEV V PROCESU MEŠANJA

Mešanje povzroča premeščanje delcev na novo ustvarjen prostor, kar je odvisno od geometrije in velikosti delca. Največji vpliv na učinkovitost mešanja ima porazdelitev velikosti delcev. Najpogosteje velikost delca opišemo s premerom. Ker delci običajno niso sferični uporabimo Martinov, Feretov pristop ali pristop ekvivalenta premera (Slika 4) (15). Metode določanja velikosti in porazdelitve velikosti delcev se delijo na klasične in instrumentalne. Med prve se uvrščajo merjenje velikosti delcev s pomočjo sedimentacije in sejalne analize. Instrumentalne metode vključujejo uporabo optičnega in elektronskega mikroskopa, laserske difrakcije, Coulterjevega števca, dinamične slikovne analize idr. Z

izjemo mikroskopije, kjer se ocenjuje posamezne delce, so hitre in ponovljive, zato so danes prva izbira (16). V prejšnjem poglavju je omenjen pojav perkolacije in elutracije kot posledice razlik v velikosti in gostoti delcev. Johanson (Johanson, 2000) je ugotovil, da je pomembna tudi številčnost majhnih delcev. Če je teh dovolj, da zapolnijo vse prazne prostore ali so dovolj kohezivni, ne prihaja do segregacije. Oblika delca ima na učinkovitost mešanja manjši vpliv. Delci nepravilnih oblik imajo v splošnem slabše pretočne lastnosti in lažje tvorijo aglomerate. Direktno, ročno določanje oblike z optičnim mikroskopom je težavno, zato so ga nadomestile metode mikroskopskega slikanja s pomočjo video kamer visoke resolucije. Uporabljajo se lahko tudi kombinacije klasičnih metod (npr. sejalna analiza in sedimentacija) (17,18).



Slika 4 Shematski prikaz delca z označenimi premeri. (povzeto po (19))

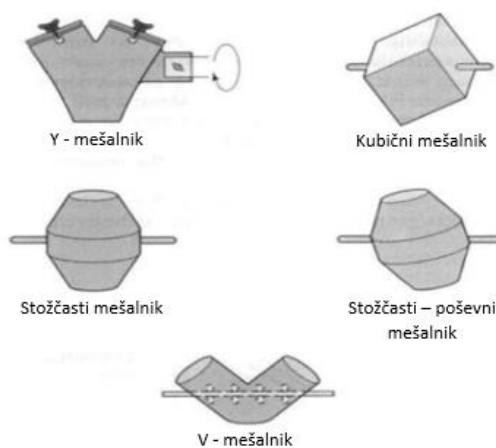
Na učinkovitost mešanja vplivajo tudi interakcije med delci. Od razmerja med privlačnimi in odbojnimi silami je odvisna učinkovitost mešanja. Van der Walsove privlačne sile so posledica molekulskih interakcij na površini delcev in so v suhem okolju signifikantne pri delcih do velikosti 30 μm ter padajo s kvadratom razdalje med delcema. Ojača jih adsorbirana plast tekočine. Vzrok za nastanek elektrostatskih odbojnih in privlačnih sil je trenje delcev drug ob drugega in prenos elektronov. V okolju z visoko temperaturo in nizko vlago so delci bolj elektronegativni. Kondenzacija vode na površini delca lahko nad mejno vrednostjo relativne vlažnosti okolja vodi v povezavo delcev s kapilarnimi silami prek tekočinskih mostov. V splošnem velja, da do tega pride pri relativni vlažnosti nad 60 %, vendar so Price in sod. dokazali nastanek tekočinskih mostov že pri nižjih vrednostih. Pojav je v neposredni povezavi z naravo snovi (18,20,21).

1.2.3. VRSTE MEŠALNIKOV

Izbira mešalnika temelji na želeni homogenosti končne mešanice, hitrosti mešanja, kapaciteti mešalnika, energetskih zahtev in občutljivost delcev na sile med mešanjem. Potrebno je ločevati mešalnike za serijsko in kontinuirano proizvodnjo (22). Pri serijski proizvodnji se mešalnik napolni s surovino in po določenem času odvzame produkt,

kontinuirana pa omogoča hkratno polnitev surovine in odvzem produkta (23). Mešalnike se deli na štiri skupine: *konvekcijski, hitrovrtiči, vrtinčnoslojni in strižni mešalniki*.

- *Konvekcijski mešalniki* so v farmacevtski industriji najbolj zastopani. Gre za vsebnike različnih oblik pritrjene na rotirajoče ogrodje. Prednost teh mešalnikov je enostavno čiščenje, nizke strižne sile in visoke kapacitete (24). Poznanih je več različic glede na oblike, ki jih prikazuje Slika 5. Poseben tip je mešalnik z zalogovnikom (ang. Intermediate Bulk Container, IBC), ki je snemljiv in hkrati služi še kot zalogovnik za nadaljnje procese (npr. tabletiranje, kapsuliranje) (12).



Slika 5 Različne vrste konvekcijskih mešalnikov. (povzeto po (13))

- *Hitrovrtiči mešalniki – granulatorji* so sestavljeni iz posode, kjer je centralno nameščeno mešalo, katerega namen je mešanje, pri granuliranju tudi močenje. Delci po stiku z mešalom zaradi centrifugalne sile potujejo proti steni posode. V posodi je nameščen še propeler namenjen razbijanju skupkov delcev. Tovrstni mešalniki omogočajo hkratno izvajanje drugih procesov, kot je granuliranje. Ker se več procesov izvaja v eni napravi, se te metode imenujejo »single pot« metode. Zavedati se je potrebno visokih strižnih sil, ki lahko uničijo integriteto delcev (12,17,25).
- *Strižni mešalniki z vrtečim mešalom* delujejo po principu premikanja mešala iz rezil oziroma lopatic. Prednost naprave je v manjši pojavnosti segregacije v primerjavi s konvekcijskimi mešalniki in dobra učinkovitost pri mešanju slabo pretočnih materialov. Problem so »mrtve cone«, območja, ki jih mešalo ne doseže in ostanejo nehomogene. Primera sta planetarni in »shear plough« mešalnik (12).
- *Vrtinčnoslojni mešalniki* se skoraj izključno uporabljata v povezavi z granuliranjem, pri čemer je mešanje le prva faza granuliranja (12, 26, 27).

1.2.4. OCENJEVANJE HOMOGENOSTI ZMESI

Postopek mešanja se izvaja z namenom zagotavljanja homogenosti večkomponentnih praškov. V praksi ni mogoče doseči stanja idealne zmesi, zato se kot homogeno označi naključno zmes. Razporejanje delcev posameznih sestavin je opisano s statističnimi parametri. Sledeče enačbe veljajo za binarne zmesi.

Točna sestava (μ) običajno ni znana, lahko pa se oceni s pomočjo *povprečne sestave* (\bar{y}) iz N vzorcev od y_1 do y_N .

$$\bar{y} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N y_i \quad \text{Enačba 1}$$

Varianca je merilo za razpršenost podatkov. Gre za povprečje kvadratov razlik posameznih vrednosti od povprečne. Standardna deviacija je kvadratni koren variance.

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}{N-1} \quad \text{Enačba 2}$$

Glede na delež posamezne komponente (p) in število delcev (n) se v vzorcu določi *zgornjo* (σ_0^2) in *spodnjo mejo variance* (σ_R^2). Zgornja meja predstavlja popolno segregacijo, spodnja pa naključno zmes. V praksi so vrednosti med zgornjo in spodnjo mejo.

$$\sigma_0^2 = p(1-p) \quad \text{in} \quad \sigma_R^2 = \frac{p(1-p)}{n} \quad \text{Enačba 3}$$

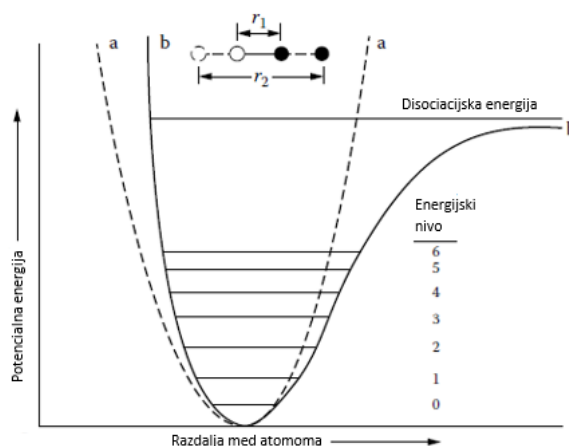
Merilo za stopnjo mešanja je indeks mešanja. Pogosto se uporablja *Laceyev indeks*, ki predstavlja razmerje med doseženo stopnjo mešanja in največjo stopnjo mešanja. Ob koncu mešanja se vrednosti nahajajo med 0.75 in 1, pri čemer 0 pomeni popolno segregacijo in 1 popolno mešanje. Uporablja se še *Poolov indeks*, katerega vrednost bolj nazorno kaže razlike med zmesmi kot Laceyev indeks.

$$\text{Laceyev indeks} = \frac{\sigma_0^2 - \sigma^2}{\sigma_0^2 - \sigma_R^2} \quad \text{in} \quad \text{Poolov indeks} = \frac{\sigma}{\sigma_R} \quad \text{Enačba 4}$$

1.3. BLIŽNJA INFRARDEČA SPEKTROSKOPIJA V PROCESU MEŠANJA

Infrardeča spektroskopija je analizna metoda, ki daje informacije o vzorcu na podlagi molekulskih vibracij (28). Infrardeče elektromagnetno valovanje obsega območje valovnih dolžin od 0,7 – 500 μm . V farmacevtski industriji se je za spremljanje procesov uveljavila NIR spektroskopija, ki pokriva valovne dolžine od 700 – 2500 nm (14000 – 4000 cm^{-1} izraženo z valovnimi števili) (29).

Molekule pri sobni temperaturi v večini zavzemajo najnižje energijsko stanje in tudi vibrirajo z najnižjo frekvenco imenovano osnovna frekvenca. Za izračun energije osnovnih stanj se lahko predpostavi, da velja Hookov zakon o linearnem odnosu med raztezkom in silo, v primeru molekul med razdaljo med atomi molekule. Vibrirajoče molekule absorbirajo energijo infrardečega sevanja in preidejo v višje vibracijsko-energijsko stanje. Zasedejo lahko le določene diskretne energijske nivoje, torej ne morejo imeti poljubne energije, zato se energijska stanja prikažejo v obliki energijskih trakov. Gibanje molekul pri večjih odmikih od osnovnega gibanja vedno manj sledi Hookovemu zakonu, saj se energijski nivoji pri bližanju višajo hitreje kot pri oddaljevanju atomov molekule. Takšen sistem je neharmoničen. Pri absorpciji elektromagnetnega valovanja lahko preide molekula iz osnovnega v stanje večkratnika osnovne frekvence oz. nadton (ang. overtone). Višji kot je nadton, manjša je njegova intenziteta na spektru. Možni so še kombinirani prehodi, kjer se seštevajo ali odštevajo različna osnovna vibracijska stanja in nadtoni. Kadar za vzbujanje molekul uporabljamo NIR območje, so spektri sestavljeni le iz nadtonov in kombinacij (28,30,31).

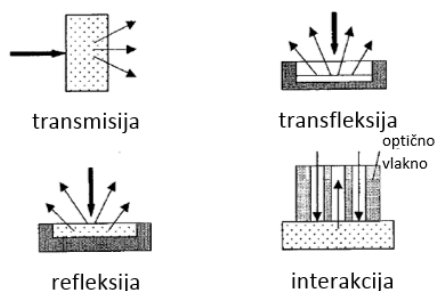


Slika 6 Diagram potencialne energije harmoničnega (a) in neharmoničnega (b) oscilatorja glede na razdaljo (r) med dvema atomoma. (povzeto po (30))

1.3.1. PRINCIP DELOVANJA NIR SPEKTROMETRA

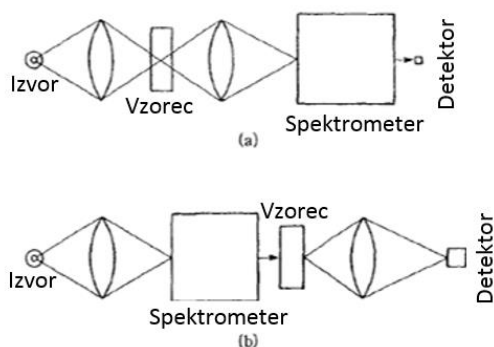
Spekter z unikatno informacijo o vzorcu pridobimo z merjenjem absorpcije NIR svetlobe na podlagi prepustnosti (transmisije), difuznega odboja (reflektance), transflektance ali interakcije. Merjenje prepustnosti poteka na transparentnih vzorcih. Metoda je primerna tudi za nehomogene vzorce. Svetloba potuje od izvora preko vzorca na detektor, ki izmeri prepuščeno svetlobo (28,32). Pri tehniki difuznega odboja se del svetlobe odbije že na

površini vzorca in je detektor ne zaznava, ker ne nosi pomembnih informacij. Del svetlobe penetrira v trdne delce in se razprši na njihovi površini ali lomi pri prehodu skozi njih. Difuzno odbita svetloba nato potuje na detektor (33,34). Pri transfleksiji pride do transmisije preko vzorca in nato odboja od odbijajoče površine. Interakcijska tehnika temelji na detekciji svetlobe, ki penetrira v vzorec in se vrača na detektor vzporedno z izvornim žarkom (33).



Slika 7 Tehnike merjenja absorbance. (povzeto po (29))

V osnovi so absorpcijski NIR instrumenti zgrajeni kot kaže slika 8. Pri instrumentu tipa a) gre za sevanje širokega spektra svetlobe, ki interagira z vzorcem in je poslana na detektor. Pri tovrstnih UV-VIS spektrometrih pogosto pride do pregrevanja vzorca zaradi sevanja svetlobe nemerjenih valovnih dolžin. NIR svetloba ima nižjo energijo, zato vzorec ni izpostavljen morebitnim poškodbam. Skupina instrumentov b) je zgrajena tako, da svetloba najprej potuje skozi monokromator, ki prepušča določeno valovno dolžino, do detektorja, s čimer tudi pri UV-VIS spektrometrih ne prihaja do pregrevanja vzorca. Druga možnost je razdelitev žarka, pri čemer del potuje direktno na vzorec, drugi del žarka pa opravi daljšo pot preko premikajočih zrcal in se združi s prvim žarkom. Pride do oslabitve ali ojačanja osnovnega valovanja. Detektor izmeri absorbenco pri različnih odmikih zrcala. S pomočjo matematične metode Fourierjeve transformacije se rezultati pretvorijo v običajen spekter absorbanc v odvisnosti od valovnih dolžin (28,35).



Slika 8 Poenostavljena shema spektroskopskih naprav. (povzeto po (29))

1.3.2. POSTAVITEV KALIBRACIJSKEGA MODELA IN OBDELAVA SPEKTROV

Postavitev kvantitativnega modela temelji na obdelavi NIR spektrov, ki prikazujejo intenziteto (npr. reflektanco) v odvisnosti od valovne dolžine. Zaradi velikega števila spremenljivk in kalibracijskih vzorcev se poslužuje kompleksnih matematičnih metod, najpogosteje metode glavnih komponent (ang. principal component analysis, PCA) in metode delnih najmanjših kvadratov (ang. partial least squares, PLS). (36) PCA je matematična metoda, ki veliko število spremenljivk poenostavi v čim nižje število novih spremenljivk, imenovanih osnovne komponente (ang. principal components, PC). Princip delovanja temelji na variabilnosti podatkov, ki korelira s spremembami procesa oz. materiala. Drugih virov variabilnosti, ki niso povezani s procesom (npr. šum) pri postavitvi matematičnega modela, algoritem ne upošteva. Prva PC zajame največ relevantne variabilnosti podatkov, medtem ko vsaka naslednja komponenta manj. Pri načrtovanju modela je zaželeno zajeti čim več za proces relevantne variabilnosti, vendar večje število PC predstavlja tudi večji prispevek nepomembne variabilnosti. Model postane preveč občutljiv na spektralni šum. PLS tako kot PCA zmanjša dimenzije variabilnosti, vendar je matematični postopek drugačen. Za razliko od PCA, ki z dodajanjem osnovnih komponent pokrije čim več podatkovne variabilnosti, PLS vzpostavlja korelacijo med neodvisnim setom podatkov A in odvisnim B. Algoritem postavi osnovne komponente v smeri, kjer v prostoru podatkov A popiše največjo variabilnost z neposredno korelacijo s podatki iz B. Prednost PLS pred PCA je predvsem večja robustnost (37).

Spreminjajoči dejavniki okolja, materialov in procesa kot so temperatura, velikost, gostota in morfologija delcev, sipanje svetlobe, vlaga itd. vplivajo na kakovost spektrov. To se kaže v obliki premikov bazne linije ali pomnožitve spektralne linije za določen faktor. Matematična obdelava čistih spektrov omogoča izničenje variabilnosti, ki ni povezana z iskanimi lastnostmi snovi in predstavlja boljše izhodišče postavitvi kalibracijskega modela (38,39).

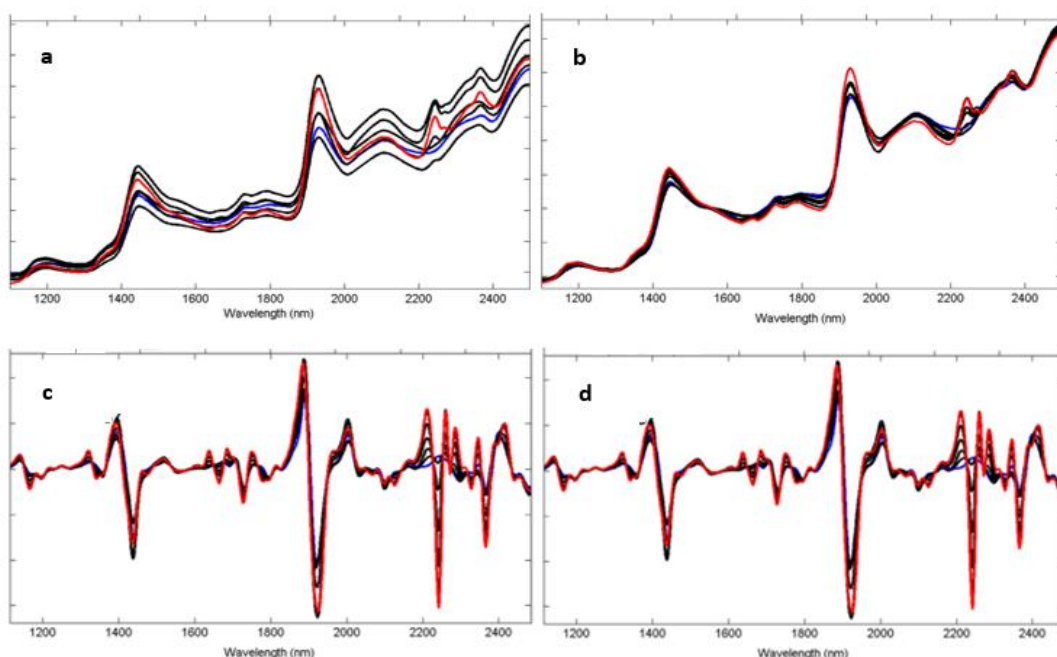
Pri uporabi spektrometričnih metod na praškastih vzorcih se za poenotenje žarkovne poti od vzorčevalnega okna do delcev zaradi variacij v njihovi obliki pogosto uporablja metoda normalizacije s standardnim odklonom (SNV) (Enačba 5). Pri metodi SNV se od vsake valovne dolžine spektra (s_i) odšteje povprečna vrednost spektra (\bar{s}), nato pa deli z njegovo standardno deviacijo.

$$s_i^{SNV} = \frac{s_i - \bar{s}}{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (s_i - \bar{s})^2}{n-1}}} \quad \text{Enačba 5}$$

Odvajanje (Enačba 6) se uporablja za poenotenje bazne linije znotraj seta spektrov. Konstanta C predstavlja odmik spektrov, ki se ga odpravi z odvajanjem. Z drugim in višjimi odvodi se izniči različne naklone med spektri, česar ne dosežemo s prvim odvodom. Slabost višjih odvodov je ojačenje regij s prevladujočim šumom.

$$\frac{d}{dw} [f(w) + C] = f'(w) \quad \text{Enačba 6}$$

Glajenje spektrov je računsko kompleksnejša metoda, ki zmanjša naključni šum spektra in napako kalibracijskega modela. Pogosto uporabljena je metoda Savitzky-Golay (SG) glajenja, ki deluje po principu numeričnega odvajanja z glajenjem. Najprej se definiranemu številu točk okoli centralne točke čistega spektra prilaga polinom. Postopek se ponovi za vse točke spektra. Dobljeno glajeno funkcijo se na koncu še odvaja. Poleg SG glajenja se predvsem pri NIR spektroskopiji uporablja odvajanje po Norrisu. Pri koraku glajenja gre za povprečenje definiranega obsega točk spektra. Sledi odvajanje glajenih vrednosti z računanjem naklonov definiranih odsekov (40,41).



Slika 9 Primeri NIR spektrov. a) čisti spektri, b) SNV, c) SG, d) odvajanje po Norrisu (povzeto po (40))

1.3.3. NIR SPEKTROSKOPIJA PRI INDUSTRIJSKEM MEŠANJU

Predvidevanje časovne točke mešanja, ki zagotavlja homogenost praškastih zmesi, je zapleteno, ker je odvisno od velikosti, gostote, oblike delcev, vlage, elektrostatskega naboja delcev in procesnih nastavitvev. Klasična analiza enakomernosti vsebnosti zmesi po mešanju (ang. blend uniformity, BU) se izvaja s pomočjo vzorčevalne sonde. Delovna skupina za enakomernost vsebnosti po mešanju je izdala smernice testiranja v skladu z dobro proizvodno prakso (ang. good manufacturing practice, GMP) in ameriško farmakopejo (ang. United States Pharmacopoeia, USP). Za validacijo BU se mora vzorčiti na vsaj 10 mestih mešalnika, kjer so potencialna mesta slabega mešanja. Pristop je časovno potraten in je odvisen od nadaljnje laboratorijske analize vzorcev. Slabost vzorčenja s sondo je tudi slaba reprezentativnost vzorca zaradi neenakomernega vstopanja posameznih vrst delcev v kalup sonde kot posledica različnih fizikalnih lastnosti delcev. Razvoj NIR spektrometrov, ki z računalniškim sistemom komunicirajo brezžično, je omogočil njihovo uporabo za določanje homogenosti zmesi (18,42).

Določitev homogenosti z NIR spektroskopijo lahko temelji na kvalitativni analizi spektrov. Ugotovili so, da so spektri med seboj enaki, ko je zmes homogeno zmešana. En način za določitev homogenosti je primerjava posnetih spektrov z referenčnimi iz zbirke, ki so značilni za homogeno zmes. Princip omogoča natančno določanje stanja mešanja in identifikacijo napačne natehte komponent, a je nujen pogoj ustrezen referenčni spekter. Drug postopek je primerjava spektrov zaporednih časovnih točk. Njegov razvoj je zaželen, ker je postavitve matematičnega modela enostavna in ne potrebuje določanja referenčnih spektrov. Kadar želimo pridobiti podrobnejše informacije in natančno določiti končno točko mešanja na podlagi koncentracij komponent, uporabimo kvantitativni model. Postavljen je s pomočjo »off-line« kalibracijskih standardov, katerih vsebnosti komponent so določene z referenčno analizo metodo (npr. tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. high-performance liquid chromatography, HPLC)) (18).

2. NAMEN DELA

Namen magistrskega dela je razviti metodo za realnočasovno spremljanje poteka mešanja dvokomponentnih praškastih zmesi, ki bo temeljila na uporabi NIR spektroskopije. V osnovi se bomo osredotočali na dva tipa praškastih zmesi, in sicer tiste s tarčno vsebnostjo modelne ZU 50 % (zmesi A) in 70 % (zmesi B).

Osnova razvoja spektroskopske metode bo kvantitativni kalibracijski model, ki bo kot rezultat podajal vsebnosti ZU med mešanjem. Izgradnja kemometrične metode bo temeljila na zbiru spektrov predhodno pripravljenih standardnih zmesi in končnih spektrov s potrjeno homogenostjo zmesi, ki jih bomo posneli tekom industrijske proizvodnje. Vrednotili bomo vpliv različnih matematičnih obdelav čistih spektrov na zanesljivost kvantitativnega modela. Točnost našega modela bomo vrednotili s primerjavo z rezultati referenčne HPLC analize. Nadalje nas bo zanimalo, kako na ustreznost medprocesne NIR metode vplivajo fizikalne lastnosti delcev zdravilne učinkovine. Glede na razvito kvantitativno NIR metodo bomo določili in z medfaznim vzorčenjem zmesi in HPLC analizo preverili kriterij za določitev zadovoljive homogenosti zmesi. Po potrditvi kriterija bomo neodvisnim industrijsko mešanim zmesem določili končne točke mešanja in med seboj primerjali poteka mešanja zmesi A in zmesi B.

Kvantitativni model bomo poskušali nadomestiti s kvalitativnim, kjer za razvoj metode ne potrebujemo standardnih vzorcev oziroma jih uporabljamo v mnogo manjšem obsegu. S pomočjo PCA analize bomo iskali področja zajetih spektrov, ki vsebujejo predvsem kemijsko informacijo o vsebnosti ZU v zmesi. Nato bomo razvili kvalitativni model na podlagi variančne in distančne tehnike. Pri prvem pristopu bomo primerjali razlike med zaporednimi spektri, pri drugem pa razlike med spektri vzorcev in definiranimi referenčnimi spektri homogene mešanice. Za ustrežnejšo kvalitativno metodo bomo postavili kriterij za določanje homogenosti zmesi. Poteke neodvisnih mešanj zmesi in končne točke po kvalitativnem modelu bomo primerjali z rezultati kvantitativne metode.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. SEZNAM UPORABLJENIH MATERIALOV IN OPREME

Materiali

- modelna zdravilna učinkovina
- Avicel® PH102 (mikrokristalna celuloza)
- Avicel® PH112 (mikrokristalna celuloza)
- 100 % etanol
- prečiščena voda

Oprema

- prahovke
- stekleničke
- polietilenske vreče
- žličke za enkratno uporabo
- sonda za vzorčenje praškov iz zalogovnika
- mešalnik z zalogovnikom (IBC mešalnik)
- spektrometer Antaris™ Target Blend Analyzer (Thermo Fischer Scientific, ZDA)
- 2 kg utež
- modificiran pokrov zalogovnika s safirnim steklom
- tehnica
- HPLC sistem
- laserski difraktor

3.2. KALIBRACIJSKI VZORCI

3.2.1. ZDRAVILNA UČINKOVINA IN POMOŽNI SNOVI

Zdravilna učinkovina

Za modelno zdravilno učinkovino (ZU) smo uporabljali slabo pretočno praškasto snov bledorumene barve. Ker ZU pridobivajo s pomočjo mikroorganizmov v fermentacijskih bioreaktorjih, tovrstna proizvodnja ZU zahteva konstantno zagotavljanje ustreznih pogojev za mikroorganizme, da sintetizirajo substance, ki bodo ustrezale specifikacijam za uporabo v farmacevtski industriji. Najstarejši pristop je serijska proizvodnja, kjer se v bioreaktor po polnitvi ne posega vse do zaključka procesa. Trenutno je najbolj razširjen princip modificirane serijske pridelave. V tem primeru s stalnim dodajanjem hranil v reaktor (ang. fed-batch process) vzdržujejo ustrezne pogoje okolja za mikroorganizme. Novejši pristop je kontinuirana proizvodnja s sprotnim dodajanjem vstopnih surovin in hkratnim izločanjem produkta. Težavo predstavlja nestabilnost mikroorganizmov (npr. genske spremembe mikroorganizmov), zato je potrebno bogatenje tistih sevov mikroorganizmov, ki imajo največjo sposobnost biosinteze ZU. Posledično se z uporabo različnih sevov spreminjajo fizikalno-kemijske lastnosti ZU. Kljub temu, da morajo posamezne serije ZU pred uporabo v industriji ustrezati specifikacijam, lahko variabilnost posameznih lastnosti znotraj specifikacijskega intervala vpliva na potek tehnološkega postopka (43).

Pomožna snov

Kot pomožno snov smo uporabljali mikrokristalno celulozo. Gre za bel prašek kristalinične narave, brez vonja in okusa. Pridobiva se s pomočjo delne depolimerizacije naravne celuloze. Pomožni snovi imata enako kemijsko sestavo, le da ločimo različne razrede glede na velikost delcev in vsebnost vlage. Za vsako vrsto zmesi smo uporabili svoj razred mikrokristalne celuloze. V zmesih A je bil uporabljena mikrokristalna celuloza s tržnim imenom Avicel® PH112 (PS A), v zmesih B pa Avicel® PH102 (PS B). Gre za obstojni, vendar higroskopni surovini, ki se zato shranjujeta zaprti na hladnih, suhih pogojih okolja. Pri formulaciji peroralnih trdnih farmacevtskih oblik se uporabljata kot vezivi in polnili. Deloma se obnašata tudi kot drsili in razgrajevali. V Preglednici II so povzete najpomembnejše fizikalne lastnosti obeh razredov mikrokristalne celuloze.

Preglednica II Fizikalno-kemijske lastnosti mikrokristalne celuloze.

* Lastnosti se glede na razred pomožne snovi razlikujejo, zato sta navedeni vrednosti za vsak razred.

Lastnost	Vrednosti
Gostota – nasipna*	0,28 – 0,33 g/cm ³ Avicel® PH102; 0,28 – 0,34 g/cm ³ Avicel® PH112
Nominalna velikost delcev	100 µm
Topnost v vodi	netopna
Vsebnost vlage*	3,0 – 5,0 % Avicel® PH102; < 1,5 % Avicel® PH112

3.2.2. IZBOR, PRIPRAVA IN HPLC ANALIZA KALIBRACIJSKIH VZORCEV

Za postavitev kalibracijskega modela smo uporabili zmesi z različnimi masnimi razmerji ZU in pomožnih snovi PS A in PS B. Za spremljanje zmesi s tarčno vsebnostjo učinkovine 50 % (zmes A) oziroma 70 % (zmes B) smo z ročnim mešanjem pripravili dva seta standardnih vzorcev, ki imata razpon vsebnosti ZU 35 % – 65 % oziroma 55 % – 85 % z maso vzorca 500 g. Zaradi variabilnosti fizikalno-kemijskih lastnosti vstopne ZU smo za vsak set vzorcev uporabili po 3 različice (označene od A - F) proizvedene v različnih časovnih točkah.

Preglednica III Standardni vzorci za kalibracijski model vrednotenja zmesi s tarčno vsebnostjo 50 % ZU.

Masno razmerje (ZU : PS A)	Masa (g) (ZU : PS A)	Oznaka vzorca	Serijski ZU
35 : 65	175 : 325	A1	ZU _A
40 : 60	200 : 300	A2	ZU _B
45 : 55	225 : 275	A3	ZU _C
50 : 50	250 : 250	A4	ZU _A
55 : 45	275 : 225	A5	ZU _B
60 : 40	300 : 200	A6	ZU _C
65 : 35	325 : 175	A7	ZU _C

Preglednica IV Standardni vzorci za kalibracijski model vrednotenja zmesi s tarčno vsebnostjo 70% ZU.

Masno razmerje (ZU : PS B)	Masa (g) (ZU : PS B)	Oznaka vzorca	Serijska ZU
55 : 45	225 : 275	B1	ZU _D
60 : 60	250 : 250	B2	ZU _E
65 : 35	275 : 225	B3	ZU _F
70 : 30	300 : 200	B4	ZU _D
75 : 25	325 : 175	B5	ZU _E
80 : 20	350 : 150	B6	ZU _F
85 : 15	375 : 125	B7	ZU _E

Vzorci so pripravili s tehtanjem posameznih surovin na precizni tehtnici neposredno v polietilensko vrečo. Vrečo smo zatesnili tako, da je bila napolnjena z zrakom in ročno stresali v vseh smereh vsaj 2 minuti.

Za namen določanja vsebnosti ZU s HPLC referenčno metodo smo stekleničko napolnili s homogeno zmesjo do vrha in zatesnili s parafilmom. Do analize smo vzorce hranili v hladilniku s temperaturnim območjem od 2 – 8 °C zaradi nestabilnosti ZU. Usposobljeni analitiki so po predpisanem in validiranem analiznem postopku izvedli izokratsko HPLC analizo vsebnosti ZU, katere rezultati so bili uporabljeni v izgradnji kalibracijskega modela.

3.3. INDUSTRIJSKO MEŠANJE SUROVIN

3.3.1. MEŠALNIK S PRIPOMOČKI

Za mešanje na industrijskem nivoju smo uporabili mešalnik z zalogovnikom namenjen homogeniziranju praškov za oralne suspenzije, veterinarskih prahov, zmesi in granulatov. Vsebnik za zmes namenjen homogenizaciji je zalogovnik, kamor se pred mešanjem združijo posamezne komponente. Vpeti zalogovnik se vrti okoli ene osi. Težnostna omejitev bremena za mešalnik znaša 1000 kg. Nastavljena hitrost mešalnika je bila 9 ± 1 obratov / min. Pred začetkom mešanja smo vnesli predpisan čas za posamezno zmes (45 za zmesi A oziroma 25 minut za zmesi B).



Slika 10 Primer mešalnika z zalogovnikom. (povzeto po (45))

3.3.2. IZBIRA VZORCA ZA ANALIZO

Vzorec, namenjen HPLC analizi vsebnosti ZU, se je po koncu mešanja odvezel z namensko vzorčevalno sondo v prahovko, kjer je bil shranjen do analize vsebnosti. Za namen medfaznega vzorčenja smo mešalnik ustavili v točki, kjer je bil pokrov zalogovnika obrnjen navzgor. Pri jemanju vzorca smo si pomagali z žličko za enkratno uporabo, pri čemer smo vzorčili v stekleničko in jo zatesnili s parafilmom. Do HPLC analize smo vzorce hranili v hladilniku.

3.4. NIR SPEKTROMETER IN PROGRAMSKA OPREMA

In-line NIR spektroskopske meritve smo izvajali z instrumentom znamke Thermo Scientific™ tipa Antaris™ Target Blend Analyzer. Spektrometer sestavljajo zunanje in notranje komponente, programska oprema ter vmesnik za brezžično povezavo.

Zunanje komponente

Na prednji strani instrumenta se nahajajo stikalo za vklop (Slika 11 A) in statusni indikatorji (Slika 11 B), ki prikazujejo delovanje naprave, pripravljenost za analiziranje in stanje baterije. Na zadnji strani imamo anteno za brezžično povezavo in USB vhod za direkten prenos podatkov na podporni računalnik. Instrumentu pripadajo tudi baterije in polnilnik.



Slika 11 Antaris™ Target Blend Analyzer.

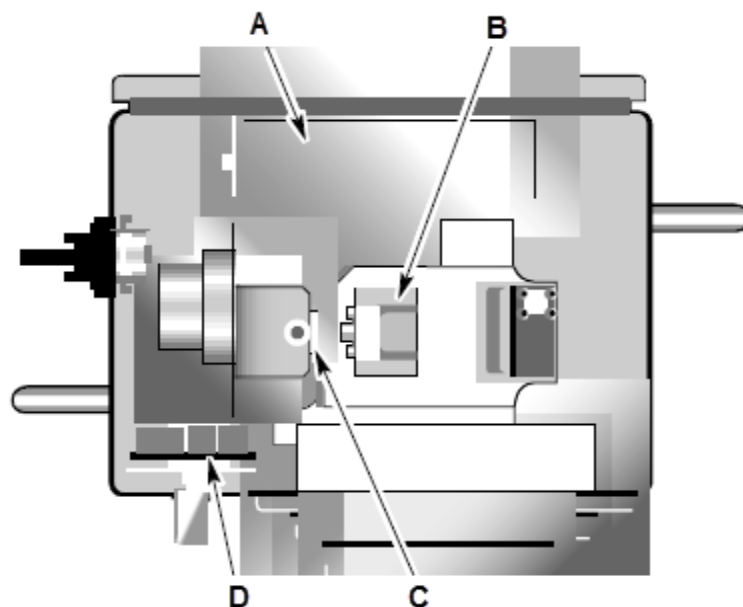
Notranje komponente

Osnovna komponenta instrumenta je spektrometer (Slika 12 A), ki deluje po tehnologiji Micro Electro Mechanical System (MEMS), sistemom mikroelektromehanskih komponent za zagotavljanje vira laserske NIR svetlobe. Del žarka se usmeri v Fabry-Perot interferometer za interno kalibracijo valovnih dolžin. Oddana NIR svetloba potuje skozi optično enoto (Slika 12 B), sistem leč in prizem, da enakomerno osvetli vzorec na merilnem oknu iz safirnega stekla. Od vzorca difuzno odbita svetloba potuje na fotodiodo indijevega galijevega arzenida, ki jo pretvori v električni signal. Ta potuje do glavne systemske enote, kjer se pretvori v digitalni signal. Več spektrov se povpreči v enega z namenom zmanjšanja spektralnega šuma. Spektrometer obdela zbrane signale in pošlje podatke brezžično do računalnika s programsko opremo. Notranja referenčna enota (Slika 12 C) je sestavljena iz zlatom prekrita diska, ki prekrije okno pri zajemanju ozadja pred analizo vzorca. Pomožna enota (Slika 12 D) vsebuje merilnik pospeška tehnologije MEMS, ki zaznava položaj instrumenta pri mešanju in omogoča avtomatizirano sprožitev analize vzorca v

določeni poziciji mešalnika. Enota posreduje tudi informaciji o stanju baterije in druge diagnostične signale.

Preglednica V Specifikacije instrumenta Antaris Target™.

Dimenzije	20,8 cm x 35,4 cm x 30,9 cm
Teža	9,9 kg
Življenjska doba baterije	3,5 h (snemljiva baterija)
Stabilnost svetlobnega vira	konstantna intenziteta svetlobe ob zadostni polnjenosti baterije
Spektralno območje	7400 cm ⁻¹ – 5550 cm ⁻¹ (1350 nm – 1800 nm)
Spektralna resolucija	3,5 cm ⁻¹ (1,6 cm ⁻¹ pri 1800 nm)
Velikost vzorčnega mesta	40 mm
Energijska porazdelitev na vzorčnem mestu	enakomeren svetlobni tok
Oddaljenost vzorca od merilnega okna	18 mm
Kompatibilnost z mešalniki	laboratorijski in industrijski mešalniki
Sistem za pritrditev na mešalnik	6" »Tri-Clamp« spojka



Slika 12 Shema notranjih komponent instrumenta Antaris™ Target. (povzeto po (47))

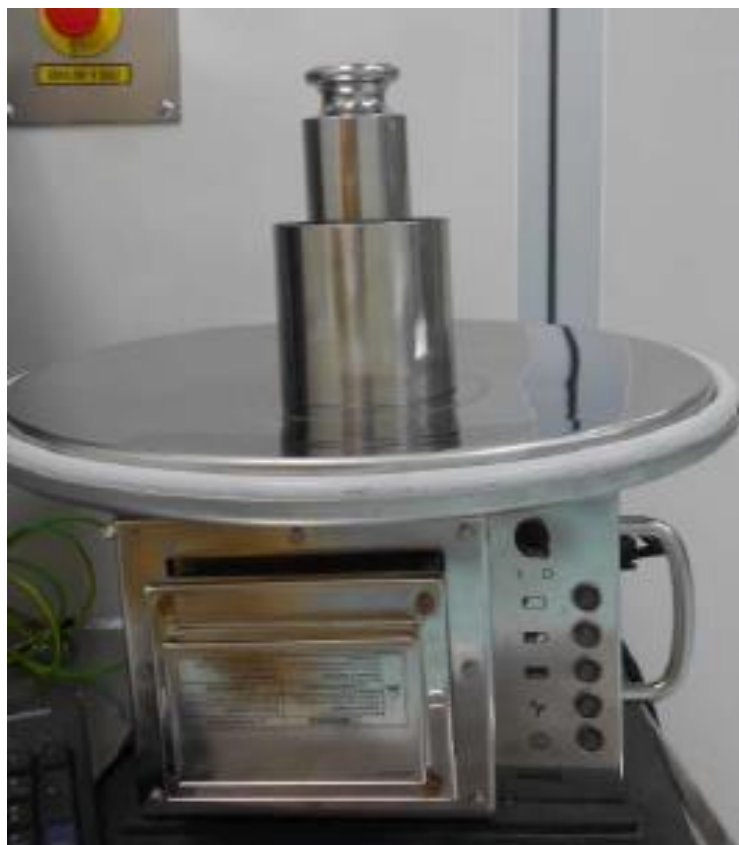
Programska oprema

Za razvoj kontroliranih pogojev merjenja s spektrometrom smo uporabljali RESULT Integration programsko opremo. Program omogoča definiranje ukazov po katerih deluje instrument in uporabo kvantitativnih in kvalitativnih metod za obdelavo spektrov. Dovoljuje tudi uporabo matematičnih operacij za računsko obdelavo rezultatov v realnem času in arhiviranje podatkov, ki jih lahko ponovno analiziramo. RESULT Data View je orodje za ogled sekvence posnetih spektrov in drugih izračunanih podatkov. Za razvoj kalibracijskega modela in drugih obdelav spektrov smo uporabili Thermo Scientific TQ Analyst™. TQ Analyst™ vsebuje algoritme, ki na podlagi standardnih vzorcev izračunavajo koncentracijo komponent ali klasificirajo spektre. Ustvarimo lahko tudi enostavne metode za meritev lastnosti spektrov (npr. površina, višina). Vključuje matematično obdelavo spektrov vključno z grafičnim prikazom. TQ Analyst™ je kompatibilen s platformo RESULT. Dobljene končne rezultate vsebnosti smo statistično vrednotili v programu Excel (47).

3.5. NIR SPEKTROSKOPSKE MERITVE

3.5.1. SNEMANJE NIR SPEKTROV KALIBRACIJSKIH VZORCEV

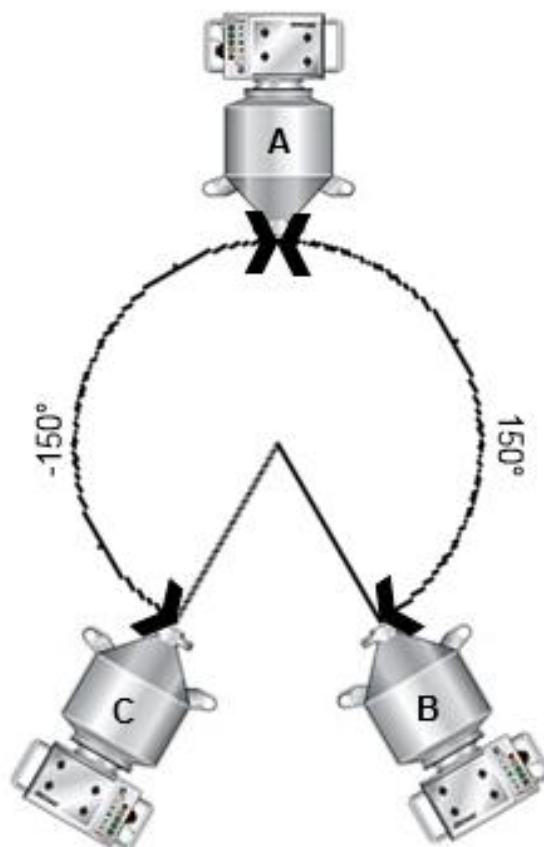
Na ravno površino smo postavili spektrometer tako, da je bilo merilno okno instrumenta obrnjeno navzgor. Pred meritvijo vsakega kalibracijskega vzorca smo posneli ozadje, tako da se je NIR žarek usmeril v referenčni zlati disk znotraj naprave. Za zagotavljanje pogojev okolja brez moteče zunanje svetlobe smo na merilno okno položili prilagojen pokrov zalogovnika s safirnim steklom, namenjen meritvi z NIR spektrometrom in ga skupaj s tesnilom pritrdili s »Tri-Clamp« spojko. Preko safirnega stekla smo postavili namensko posodo s črno obarvano notranjostjo. Za meritev spektra standardnega vzorca smo na prilagojen pokrov zalogovnika s safirnim steklom položili kovinski valj. Vanj smo nasuli ročno homogenizirano zmes določenega standardnega vzorca. Zmes v valju smo obtežili z 2 kg utežjo z namenom simulacije zbitosti delcev pri pogojih industrijskega mešanja. Kalibracijske vzorce smo posneli v celotnem valovnem območju od 7400 do 5550 cm^{-1} tako, da smo 16 spektrov povprečili v enega. Za vsak vzorec smo meritev ponovili še dvakrat. Med meritvami posameznih standardnih vzorcev smo merilno okno očistili zaostalega vzorca in prebrisali z etanolom ter preprečili kontaminacijo z zaostalim vzorcem.



Slika 13 Postopek merjenja standardnih vzorcev. (povzeto po (48))

3.5.2. »IN-LINE« SNEMANJE SPEKTROV

Meritve spektrov zmesi med industrijskim mešanjem smo začeli z namestitvijo spektrometra na zalogovnik. Za namestitev smo uporabili prilagojen pokrov zalogovnika z vgrajenim merilnim oknom, kot je prikazano na Sliki 13. Na modificiran pokrov smo položili gumijasto tesnilo in nanj postavili spektrometer, ki je bil pričvrščen s »Tri-Clamp« spojko. V začetni poziciji mešalnika se je instrument nahajal na vrhu zalogovnika. Spektrometer je začel izvajati meritev v vsakem obratu, ko je mešalnik popisal 150° od začetne lege. V tej legi je masa zmesi že prekrila merilno okno. V 1,12 sekunde je izvedel tri meritve od 7400 do 5550 cm^{-1} in jih povprečil v en spekter. Ob koncu meritve se je instrument nahajal v točki -150° . Med spremljanjem različnih sekvenc mešanj smo modificirali pokrov in spektrometer očistili po predpisanem čistilnem postopku.



Slika 14 Položaj A predstavlja začetni položaj mešalnika in NIR instrumenta. V položaju B začne NIR instrument izvajati meritev in jo prekine ob prihodu v točko C. Ob zaključku obrata mešalnika se instrument ponovno vrne v točko A.

3.6. RAZVOJ KVANTITATIVNE METODE

3.6.1. IZGRADNJA IN VREDNOTENJE KALIBRACIJSKEGA MODELA

Kot osnovno kalibracijsko tehniko smo izbrali metodo PLS. Za vsako opazovano zmes smo vključili 7 kalibracijskih standardov. Robustnost modela smo skušali povečati z vključitvijo »in-line« posnetih spektrov med industrijskim mešanjem tarčnih zmesi v zadnjih dveh obratih mešalnika, ko je bila naknadno dokazana homogenost vzorca. Kalibracijski model za zmesi A vsebuje 10 »in-line« posnetih spektrov na petih mešanih zmesih (za 5 zmesi smo uporabili zadnja dva spektra iz celotne sekvence mešanja). Kalibracijski model za zmesi B vsebuje 8 »in-line« posnetih spektrov na štirih mešanih zmesih (za 4 zmesi smo uporabili zadnja dva spektra iz celotne sekvence mešanja).

Dobljen kalibracijski model smo vrednotili glede na korelacijski koeficient, ki predstavlja merilo za odvisnost dveh spremenljivk. Vrednost 0 pove, da ni korelacije med spremenljivkama, vrednost 1 pa predstavlja najvišjo možno korelacijo. Signifikantna korelacija med spremenljivkami je pri vrednosti nad 0,8, medtem ko vrednosti nad 0,9 kažejo na močno korelacijo. Napako kalibracijskega modela smo ocenili kot koren povprečnega kvadrata napake kalibracije, ki je izračunana kot razlika med referenčno in z NIR spektroskopijo določeno vrednostjo (ang. root mean square error of calibration, RMSEC). Napovedno sposobnost modela smo izrazili s korenem povprečnega kvadrata napake navzkrižne validacije (ang. root mean square error of cross-validation, RMSECV). Metodo navzkrižne validacije smo izvedli z izvzemanjem enega kalibracijskega standarda iz modela in izračunali vsebnost ZU s kalibracijskim modelom preostanka vzorcev. Algoritem se je ponavljal dokler niso bili izvzeti vsi vzorci. Po kalibraciji s PLS metodo je program izračunal optimalno število osnovnih komponent oziroma faktorjev, ki popišejo medsebojno neodvisna področja variabilnosti spektrov. Za vsako število faktorjev je program izračunal RMSECV in za optimalno število faktorjev izbral tisto z minimalno RMSECV.

3.6.2. NABOR MATEMATIČNIH OBDELAV SPEKTROV

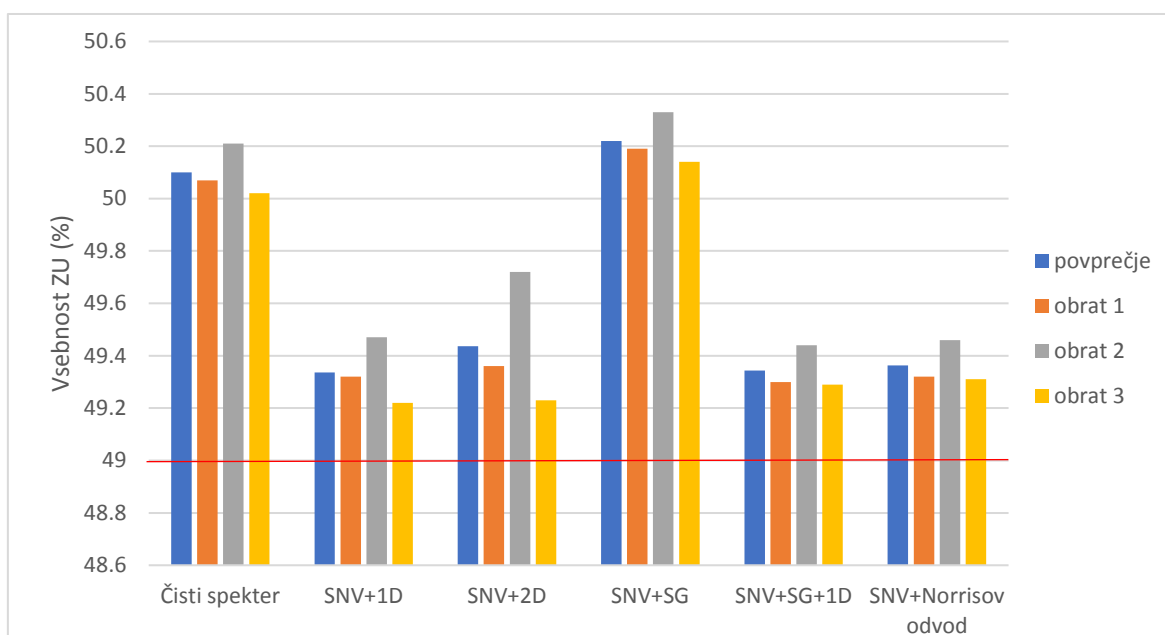
Zaradi načina predstavitve praškastih vzorcev je nemogoče natančno določiti žarkovno pot do vzorca na merilnem oknu. Med posameznimi vzorci lahko prihaja do razlik v velikosti, obliki in razporeditvi delcev na merilnem oknu. Zato smo vse spektre najprej obdelali z normalizacijo s standardnim odklonom, ki izniči omenjeno variabilnost vzorcev.

Za obe opazovani vrsti zmesi A in B smo preverili vpliv matematične obdelave spektrov na izgradnjo kalibracijskega modela, kar smo ocenili s korelacijskim koeficientom, RMSEC, RMSECV in številom faktorjev (Preglednici VI in VII). Poleg SNV obdelave smo v kombinaciji posamezno uporabili še prvi (1D) in drugi (2D) odvod, Savitzky – Golay glajenje (SG) in Norris odvajanje (Norris). Za vsako matematično metodo smo izračunali vsebnosti ZU iz zadnjih treh obratov industrijskega mešanja in še njihovo povprečje (Sliki 15 in 16). Kot primarni kriterij smo uporabljali RMSECV, saj poda oceno, kakšno sposobnost napovedovanja bo imel naš kalibracijski model. V primeru, ko so bile izračunane vrednosti primerljive, smo preverili še vsebnost ZU, ki jo je podal kalibracijski model v zadnjih treh obratih neodvisne sekvence mešanja zmesi A in B.

Zmesi A

Preglednica VI Zbrani rezultati vrednotenja kalibracijskega modela po uporabi različnih matematičnih obdelav spektrov za zmesi A.

Obdelava spektrov	Korelacijski koeficient	RMSEC (%)	RMSECV (%)	Št. faktorjev
Zmesi A				
SNV	0,9927	0,996	1,47	2
SNV+1D	0,9938	0,921	1,38	2
SNV+2D	0,9966	0,684	1,74	3
SNV+SG	0,9925	1,01	1,48	2
SNV+SG + 1D	0,9945	0,868	1,28	2
SNV+Norris	0,9944	0,872	1,28	2



Slika 15 Vsebnosti ZU pri različnih obdelavah spektrov v zadnjih treh obratih za neodvisno sekvenco mešanja zmesi A in njihovo povprečje. Rdeča vodoravna črta predstavlja vsebnost ZU določeno z referenčno HPLC analizo.

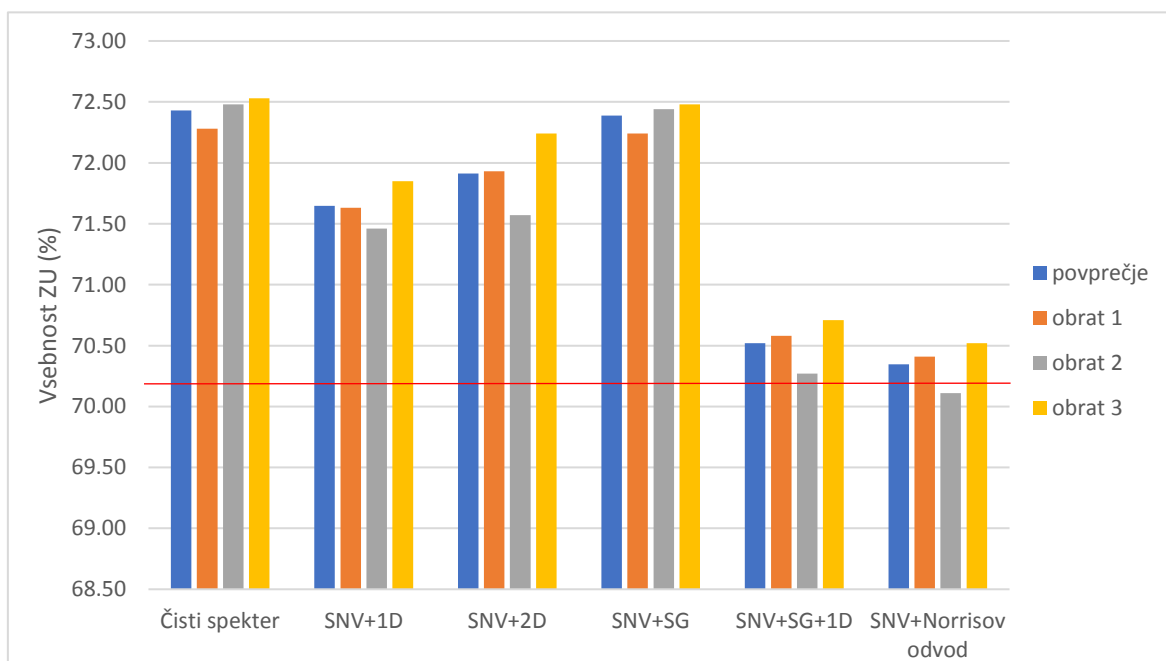
Vsebnost ZU po HPLC analizi od kalibracijskega modela neodvisne zmesi A ob koncu mešanja je bila 49,0 %. Najbližje temu rezultatu je bila povprečna vrednost SNV+1D. Glede na rezultate v Preglednici VI so bile vse metode, razen SNV+2D, primerljive. Sklepali smo,

da je za nadaljnje vrednotenje zmesi A najprimernejši kalibracijski model z metodo SNV+1D.

Zmesi B

Preglednica VII Zbrani rezultati vrednotenja kalibracijskega modela po uporabi različnih matematičnih obdelav spektrov za zmesi B.

Obdelava spektrov	Korelacijski koeficient	RMSEC (%)	RMSECV (%)	Št. faktorjev
Zmesi B				
SNV	0,9952	0,793	1,48	3
SNV+1D	0,9999	0,105	1,57	5
SNV+2D	0,9857	1,36	2,39	2
SNV+SG	0,9950	0,810	1,48	3
SNV+SG + 1D	0,9999	0,136	1,38	4
SNV+Norris	0,9996	0,224	1,23	4



Slika 16 Vsebnosti ZU pri različnih obdelavah spektrov v zadnjih treh obratih za neodvisno sekvenco mešanja zmesi B in njihovo povprečje. Rdeča vodoravna črta predstavlja vsebnost ZU določeno z referenčno HPLC analizo

Vsebnost ZU po HPLC analizi zmesi B ob koncu mešanja je bila 70,2 %. Najbližje temu rezultatu je bila povprečna vrednost metode SNV+Norrisov odvod. Korelacijski koeficienti vseh metod so bili primerljivi. S primerjavo napake modelov RMSEC in RMSECV, najnižji in primerljivi vrednosti dosežeta SNV+SG+1D in SNV+Norrisov odvod. Sklepali smo, da je za nadaljnje vrednotenje zmesi B najprimernejši kalibracijski model z metodo SNV+Norrisov odvod.

3.7. RAZVOJ KVALITATIVNE METODE

Za razvoj kvalitativne metode smo uporabili tehniko primerjave zaporednih blokov spektrov (variančna metoda) in tehniko primerjave spektrov z referenčnimi spektri (distančna metoda). Analizirali smo le valovna števila, katerih spektralni vrhovi vsebujejo predvsem kemijsko informacijo iskanega analita – ZU. PCA metoda omogoča prikaz statističnih spektrov, kjer razberemo korelacijo med določenim območjem spektra in vsebnostjo ZU. Vrednost 1 predstavlja izključno odvisnost intenzitete spektralnega vrha od vsebnosti ZU, vrednost 0 pa odsotnost njune korelacije.

- *Variančna metoda – standardni odklon drsečega okvirja povprečja (ang. moving standard deviation, MSD):* Za oba tipa zmesi smo analizirali prve odvode spektrov. Pri posameznih valovnih številih, ki smo jih določili na podlagi PCA metode s postopkom statističnih spektrov (poglavje 4.3.1.) smo izračunali standardno deviacijo višin vrhov v obsegu 10 zaporednih spektrov. Rezultat je bil povprečje standardnih deviacij pri izbranih valovnih številih. Med sekvenco mešanja se je okvir izračuna standardne deviacije pomikal naprej za en spekter.
- *Distančna metoda – primerjava razlike drsečega povprečja s tarčnim/referenčnim spektrom (ang. difference between the moving block average as compared to target spectrum, DMBA - TS):* Za oba tipa zmesi smo analizirali prve odvode spektrov. Za analizo smo uporabljali enaka valovna števila določene s PCA kot pri variančni metodi. 10 zaporednim spektrom smo za posamezno valovno število izračunali povprečje višin vrhov in jih primerjali z referenčnimi vrednostmi. Tekom sekvence mešanja se je okvir povprečja premikal po en zaporedni spekter. Za referenčne vrednosti smo uporabili spektre standardnega vzorca, katerega vsebnost ZU je enaka tarčni vsebnosti zmesi A oziroma B. Iz treh referenčnih spektrov smo izračunali povprečje višin pri vsakem valovnem številu. Nato smo izračunali povprečje višin

vzorčnih spektrov za posamezno izbrano valovno število. Z dobljenimi podatki iz vzorčnih spektrov in s povprečji referenčnih spektrov smo izračunali napako $RMSE/\sqrt{10}$ (Enačba 7; \bar{x} – povprečje višin izbranega valovnega števila bloka desetih spektrov, \bar{s}_i – povprečna višina treh referenčnih spektrov pri izbranem valovnem številu, N – število izbranih valovnih števil), ki je zajemala vsa valovna števila.

$$RMSE/\sqrt{10} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\bar{x}_i - \bar{s}_i)^2}{10N}} \quad \text{Enačba 7}$$

3.8. DOLOČANJE VELIKOSTI DELCEV ZU

Velikost delcev ZU je bila določena s strani proizvajalca z metodo laserske difrakcije. Metoda temelji na potovanju laserskega žarka skozi dispergirani vzorec. Ko laserski žarek zadane delec, pride do uklona svetlobe. Pri večjih delcih prihaja do večjega odboja in manjše intenzitete izhodne svetlobe. Nasproten pojav opazimo pri manjših delcih. Svetlobo pod različnimi izstopnimi koti zaznajo optični detektorji (46).

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. KVANTITATIVNI KALIBRACIJSKI MODEL

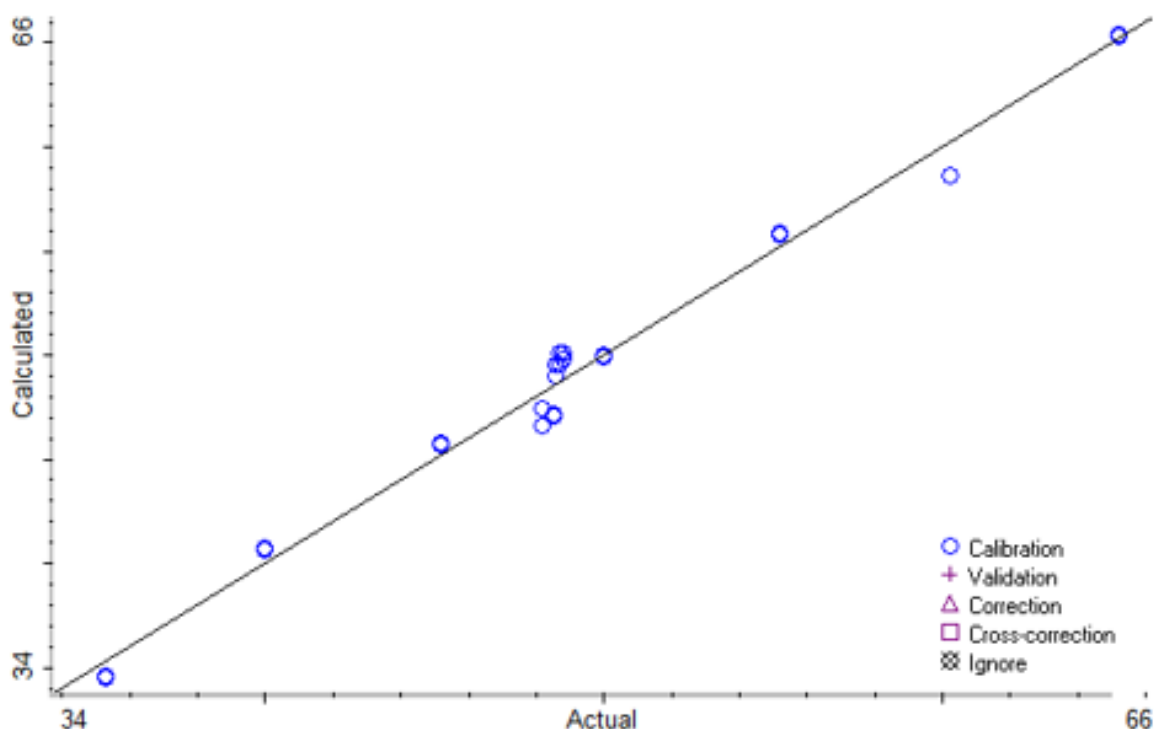
4.1.1. POSTAVITEV IN VREDNOTENJE KALIBRACIJSKEGA MODELA

Vsebnost ZU v ročno homogeniziranih kalibracijskih in »in-line« vzorcih so analitiki določili s HPLC metodo in so navedene v Preglednici VIII. Uporabili smo zadnja dva »in-line« spektra za vsako industrijsko mešano zmes, na kateri je bila ob koncu izvedena HPLC analiza vsebnosti ZU. Posledično imamo za eno zmes z dvema spektroma en HPLC rezultat.

Preglednica VIII Rezultati HPLC analiz kalibracijskih standardov in »in-line« vzorcev zmesi A in B.

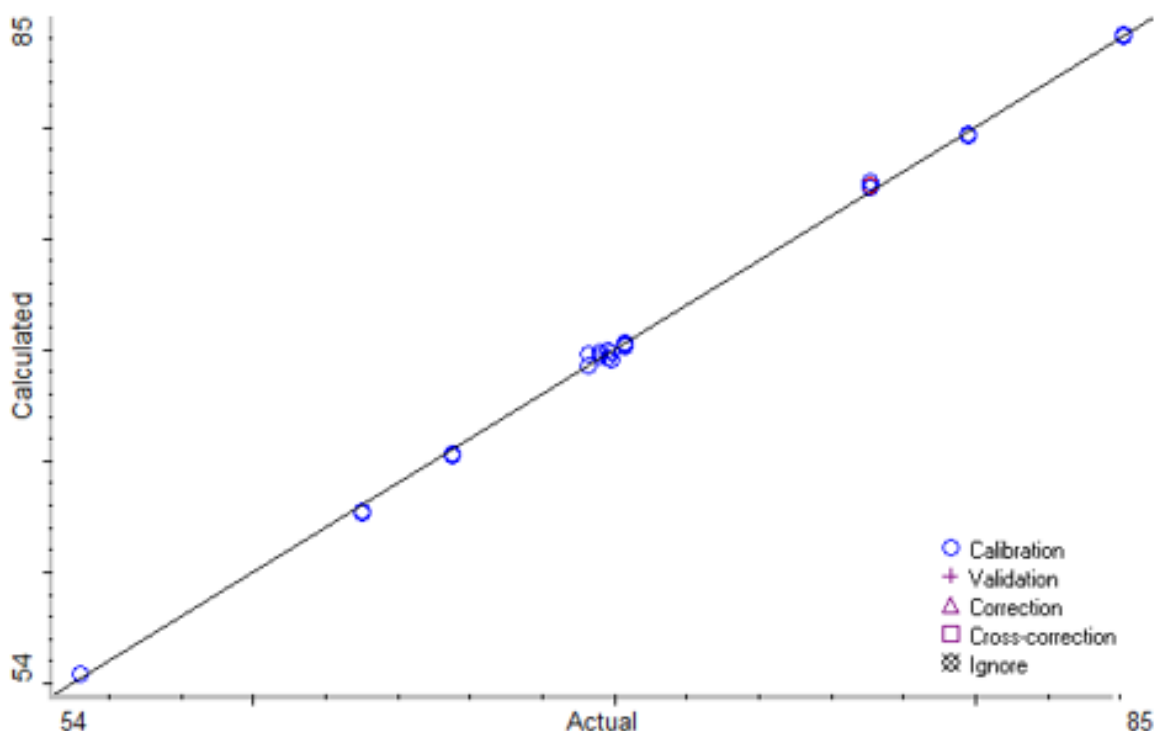
Oznaka vzorca – zmes A	HPLC (%)	Oznaka vzorca – zmes B	HPLC (%)
A ₁	35,3	B ₁	55,2
A ₂	40,0	B ₂	63,0
A ₃	45,2	B ₃	65,5
A ₄	50,0	B ₄	70,3
A ₅	55,2	B ₅	77,1
A ₆	60,2	B ₆	79,8
A ₇	65,2	B ₇	84,1
»in-line« 1A	48,7	»in-line« 1B	69,9
»in-line« 2A	48,8	»in-line« 2B	69,6
»in-line« 3A	48,6	»in-line« 3B	69,3
»in-line« 4A	48,5	»in-line« 4B	69,8
»in-line« 5A	48,2		

Kalibracijski model za spremljanje vsebnosti zmesi A izkazuje visoko stopnjo linearnosti, kar razberemo tudi iz vrednosti korelacijskega koeficienta 0,9863. Napaka kalibracijskega modela (RMSEC) znaša $\pm 0,921$ %. Za njegovo izgradnjo z metodo PLS je uporabljen 1 faktor. Z metodo navzkrižne validacije smo ocenili napovedno sposobnost modela, ki znaša $\pm 1,38$ %. Točke na premici so enakomerno razporejene s korakom 5 % vsebnosti ZU. Največja gostota točk je okoli tarčne vrednosti 50 % zaradi dodajanja vzorcev iz industrijsko mešanih zmesi z namenom povečevanja robustnosti modela.



Slika 17 Kalibracijski model za zmesi A. »Actual« - vrednosti kalibracijskih standardov določene s HPLC analizo, »Calculated« - vrednosti kalibracijskih standardov kot odziv kalibracijskega modela

Kalibracijski model za zmes B izkazuje še nekoliko višjo stopnjo linearnosti kot model za zmes A z vrednostjo korelacijskega koeficienta 0,9938. Napaka kalibracijskega modela (RMSEC) znaša $\pm 0,224$ %. Za njegovo izgradnjo z metodo PLS so uporabljeni 4 faktorji. Z metodo navzkrižne validacije smo ocenili napovedno sposobnost modela, ki znaša $\pm 1,23$ %. Točke na premici so enakomerno razporejene s korakom 5 % vsebnosti ZU. Največja gostota točk je okoli tarčne vrednosti 70 % zaradi dodajanja vzorcev iz industrijsko mešanih zmesi z namenom povečevanja robustnosti modela.

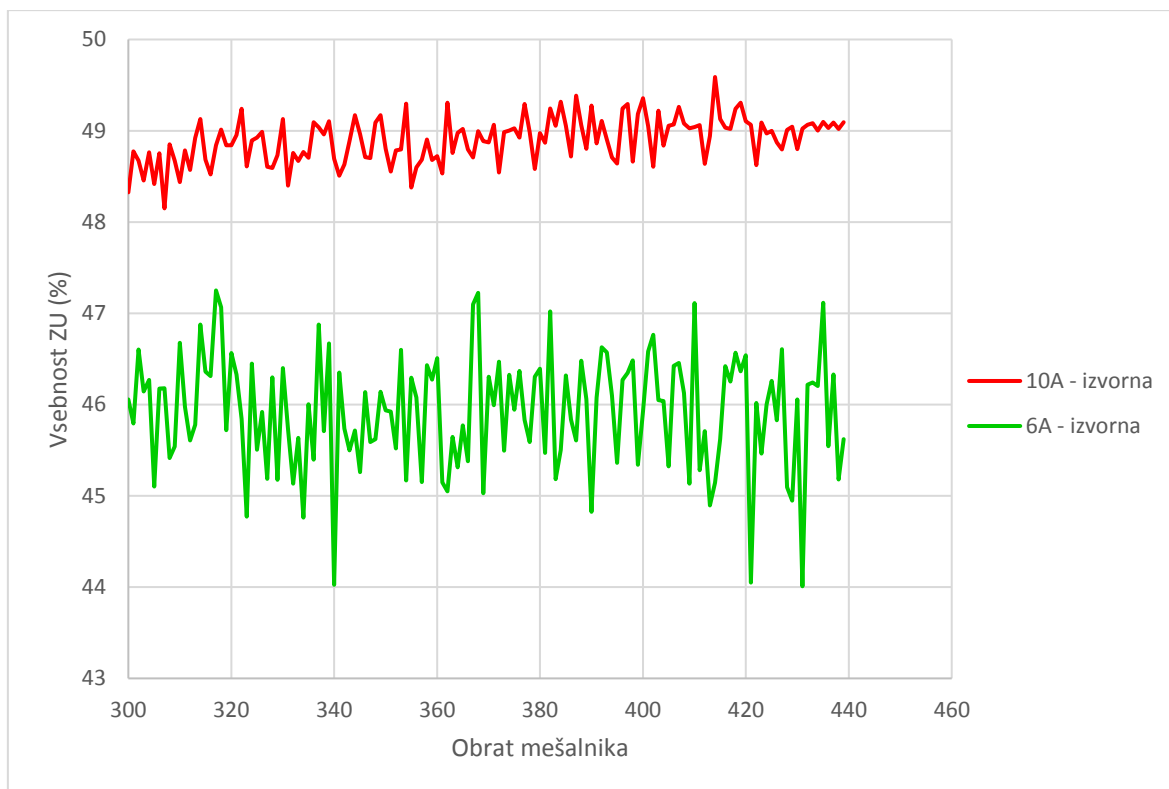


Slika 18 Kalibracijski model za zmesi B. »Actual« - vrednosti kalibracijskih standardov določene s HPLC analizo, »Calculated« - vrednosti kalibracijskih standardov kot odziv kalibracijskega modela

4.1.2. VPLIV FIZIKALNIH LASTNOSTI DELCEV ZU NA ODZIV KALIBRACIJSKEGA MODELA

Nadalje smo vrednotili razpršenost rezultatov kalibracijskega modela v sekvenci industrijskega mešanja kot posledico različnih fizikalnih lastnosti ZU. Slika 19 prikazuje podatke dveh neodvisnih sekvenc mešanj zmesi A iz različnih časovnih obdobj, v kateri vstopajo različne serije ZU. Krivulja ponazarja vsebnosti ZU od 300. obrata mešalnika naprej. Dobljenim rezultatom smo izračunali še drseče povprečje vsebnosti (ang. moving average, MA) z obsegom 10 zaporednih izvornih vrednosti. Za izračun raztrosa podatkov okoli povprečne vrednosti smo uporabili relativni standardni odklon (RSD) s pomočjo standardne deviacije podatkov vsebnosti ZU (SD) in povprečja (\bar{x}).

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} 100 \% \text{ *Enačba 8*}$$



Slika 19 Krivulji 10A – izvorna in 6A - izvorna predstavljata vsebnosti ZU določene z NIR spektrometrom od 300. obrata mešalnika do zaključka mešanja.

Preglednica IX Preglednica sekvenc mešanj s pripadajočimi vrednostmi RSD in uporabljenimi serijami ZU. RSD – relativni standardni odklon, MA – drseče povprečje z obsegom 10 podatkov

Sekvenca	RSD (%)	Serijska ZU
6A - izvorna	1,37	ZU ₀
10A - izvorna	0,51	ZU ₆
6A - MA	0,39	ZU ₀
10A - MA	0,31	ZU ₆

S primerjavo dveh sekvenc industrijskih mešanj vidimo razlike v raztrosu podatkov vsebnosti ZU okoli povprečne vrednosti. Sekvenca 10A - izvorna izkazuje manjše nihanje okoli povprečne vrednosti kot sekvenca 6A - izvorna. Glede na razlike vsebnosti ZU med posameznimi obrati lahko trdimo, da gre pri sekvenci 6A za manj homogeno zmes kot pri sekvenci 10A. Intenziteta reflektirane svetlobe od vzorca je odvisna od velikosti, gostote in oblike delcev. Prisotnost večjih aglomeratov ZU v homogeni zmesi pomeni manjšo

specifično površino in s tem manjšo površino stika ZU z merilnim oknom. NIR svetloba vstopa v snov le do določene globine in posledično dovolj velikih skupkov ne zajame v celoti. Vzorčni prostor je tako premajhen za reprezentativni vzorec in ne predstavlja razporejenosti delcev celotne zmesi. Zaradi prisotnosti ali odsotnosti ter različnih oblik skupkov delcev učinkovine vrednosti med posameznimi obrati mešalnika bolj sipajo. V primeru aglomeratov ZU na vzorčnem oknu NIR zazna relativno več pomožne snovi in je vsebnost nižja. Matematične metode kot je SNV do neke mere omogočajo poenotenje spektrov zaradi razlik v žarkovni poti do delcev, vendar le na reprezentativnem vzorcu. Za zajetje reprezentativnega vzorca bi bilo potrebno prodiranje NIR svetlobe globlje v vzorec (49).

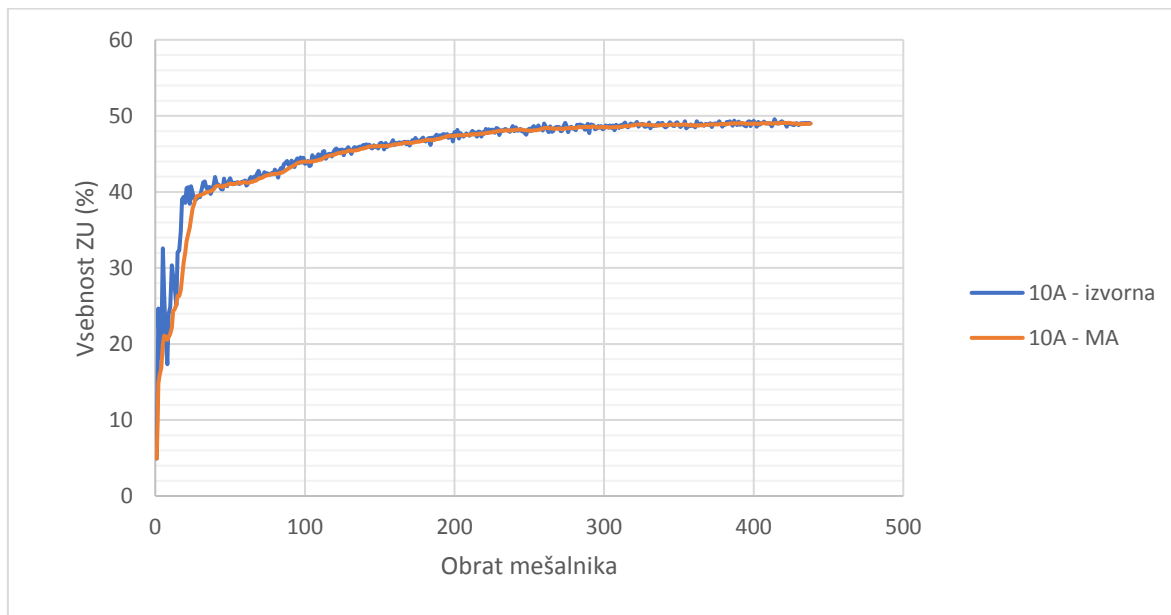
V Preglednici X so zbrani podatki o velikosti delcev ZU določeni s strani proizvajalca. Vidimo, da se seriji delcev ZU precej razlikujejo v velikosti delcev. Vsi označevalci razporeditve velikosti delcev kažejo na večji delež velikih delcev pri seriji ZU₆. Domnevamo, da so delci serije ZU₀ zaradi manjše velikosti in posledično večje specifične površine bolj kohezivni in težijo k medsebojnemu povezovanju in tvorbi aglomeratov. Vpliva pomožne snovi nismo vrednotili, saj je bila uporabljena zgolj ena serija.

***Preglednica X** Fizikalne lastnosti uporabljenih serij ZU. $D_{0,5}$ – premer delca, od katerega je manjše 50 % mase delcev, $D_{0,9}$ – premer delca, od katerega je manjše 90 % mase delcev, 10 μm – odstotek mase delcev s premerom manjšim od 10 μm , 150 μm odstotek mase delcev s premerom manjšim od 150 μm , 75 μm – odstotek mase delcev s premerom manjšim od 75 μm*

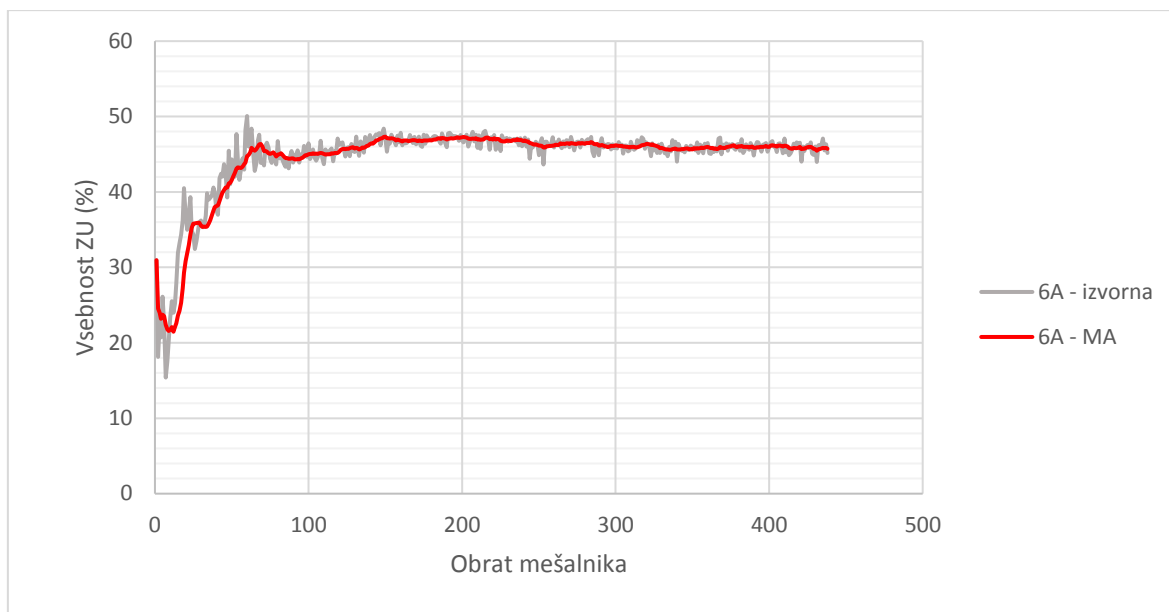
Serijska ZU	$D_{0,5}$ (μm)	$D_{0,9}$ (μm)	10 μm (%)	75 μm (%)	150 μm (%)
ZU ₀	21,62	86,83	25,95	86,79	98,00
ZU ₆	27,75	106,66	19,03	80,90	95,78

Raztros podatkov okoli povprečne vrednosti smo omejili z uporabo drsečega povprečja. Iz Preglednice X je razvidno, da se je RSD zmanjšal za faktor 1,6 (10A) oziroma 3,5 (6A). Program RESULT je ob vsakem vrtljaju ohranil zadnjih 10 rezultatov vsebnosti. Okno povprečenja rezultatov se je premikalo za eno vrednost. Izboljšanje je vidno tudi na Slikah 20 in 21, saj je krivulja drsečega povprečja stabilnejša in preglednejša. Razlika je očitnejša pri spremljanju zmesi sekvence 10A. Iz stabilne krivulje drsečega povprečja lažje razberemo točko zadovoljive homogenosti zmesi. Predvsem je to pomembno pri zmesih, ki se obnašajo

kot 6A s signifikantnimi odmiki od povprečja pri zaporednih obratih mešalnika. Tudi v nadaljnjih spremljanih zmesi smo uporabljali princip drsečega povprečja. Kljub temu v razvoj kalibracijskega modela nismo vključili serij, ki so imele vrednost $D_{0,5}$ manjše od 23'50 μm , saj bi poslabšali napovedno sposobnost modela. Upoštevane niso bile tudi pri vrednotenju kalibracijskega modela.



Slika 20 Modra krivulja (10A - izvorna) prikazuje vsebnosti ZU izračunane s kalibracijskim modelom tekom celotne sekvence mešanja. Oranžna krivulja (10A - MA) prikazuje drseče povprečje vsebnosti ZU.



Slika 21 Siva krivulja (6A - izvorna) prikazuje vsebnosti ZU izračunane s kalibracijskim modelom tekom celotne sekvencem mešanja. Rdeča krivulja (6A - MA) prikazuje drseče povprečje vsebnosti ZU.

4.2. UPORABA KVANTITATIVNEGA MODELA ZA OPAZOVANJE INDUSTRIJSKEGA MEŠANJA

4.2.1. NAPOVEDNA SPOSOBNOST MODELA IN DOLOČITEV HOMOGENOSTI ZMESI

Opazovali smo 12 zmesi A s tarčno vsebnostjo 50 % ZU in 10 zmesi B s tarčno vsebnostjo 70 % ZU. V Preglednici XI in XII so za vsako mešano zmes zbrani podatki določeni z NIR spektroskopijo in vrednosti referenčne HPLC analize. Za vsebnost ZU v zmesi A velja kriterij 46,5 – 51,2 %, v zmesi B pa 63,8 – 75 %. Zmesi z vsebnostjo določeno s HPLC znotraj tega intervala se označi kot ustrezne.

Napovedno sposobnost kalibracijskega modela smo ocenili še na neodvisnih vzorcih industrijskega mešanja. Kot kazalec smo uporabili koren povprečnega kvadrata napake (ang. root mean square error, RMSE). Za zmesi A znaša 0,71 %, za zmesi B pa 0,45 %. Oba rezultata sta sprejemljiva, če upoštevamo, da ima specifikacijski interval vsebnosti ZU razpon 4,7 % za zmesi A in 11,2 % za zmesi B.

Preglednica XI Vsebnosti ZU ob koncu mešanja za zmesi A določene z NIR spektroskopijo in referenčno HPLC analizo. Vsebnost NIR – vsebnost ZU določena z NIR spektroskopijo, Vsebnost HPLC – vsebnost ZU določena s HPLC

Oznaka zmesi A	Vsebnost NIR (%)	Vsebnost HPLC (%)	Oznaka zmesi A	Vsebnost NIR (%)	Vsebnost HPLC (%)
7A	47,3	48,4	13A	48,8	49,0
8A	47,8	48,6	14A	49,6	48,7
9A	49	48,5	15A	48,7	49,0
10A	49	48,7	16A	49,6	48,7
11A	49,3	48,7	17A	49,5	48,4
12A	49,5	48,8	18A	49,3	49,0

Preglednica XII Vsebnosti ZU ob koncu mešanja za zmesi B določene z NIR spektroskopijo in referenčno HPLC analizo. Vsebnost NIR – vsebnost ZU določena z NIR spektroskopijo, Vsebnost HPLC – vsebnost ZU določena s HPLC

Oznaka zmesi B	Vsebnost NIR (%)	Vsebnost HPLC (%)	Oznaka zmesi B	Vsebnost NIR (%)	Vsebnost HPLC (%)
5B	70,0	69,7	10B	69,7	69,6
6B	69,4	69,8	11B	69,0	69,9
7B	69,8	69,4	12B	69,0	69,6
8B	69,3	69,9	13B	70,1	69,9
9B	69,6	69,8	14B	70,4	70,2

Za realnočasovno določitev zadovoljivo homogene zmesi z NIR smo postavili sledeč kriterij:

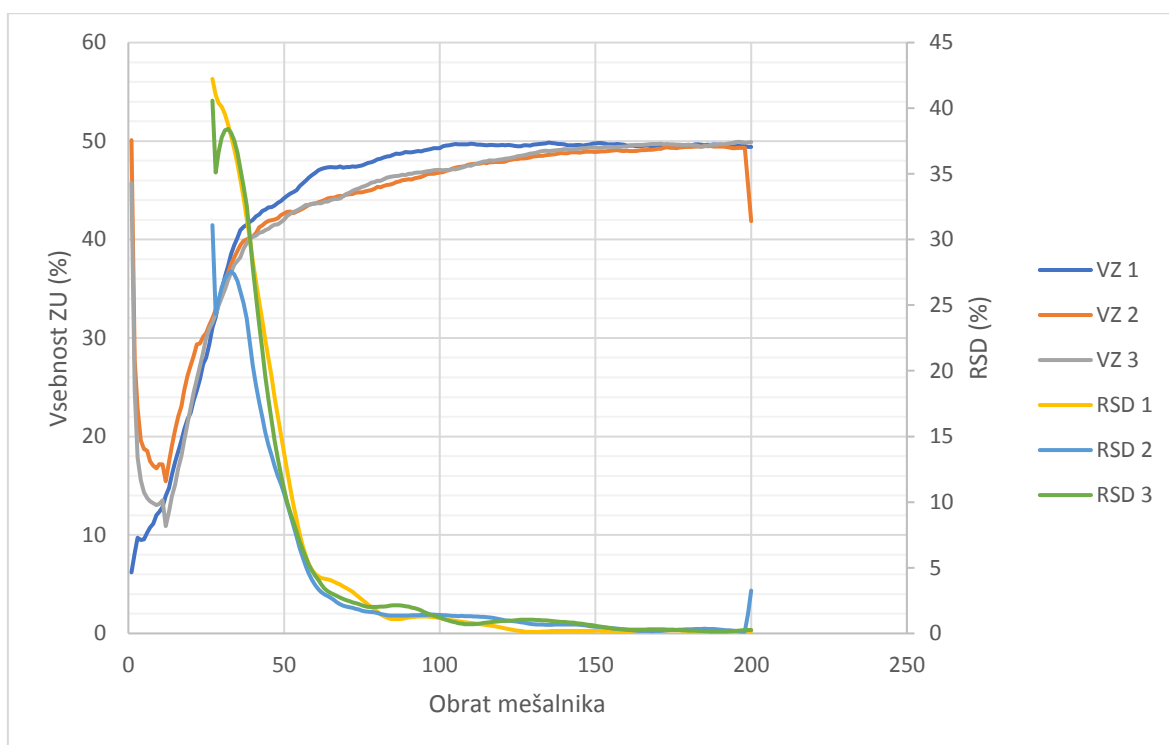
- vsebnost ZU doseže območje specifikacijskega intervala
in
- RSD prejšnjih 27. obratov oz. 3 min mešanja je manjša od 0,150 %

Zastavljen kriterij smo potrdili z dodatnim medfaznim vzorčenjem zmesi. V realnem času smo spremljali tri zaporedna mešanja zmesi A. V Preglednici XIII so zbrani podatki o vsebnosti ZU določeni z NIR spektroskopijo in s HPLC ter obrati mešalnika, kjer smo na podlagi ustrezne RSD ustavili mešanje. Razberemo, da so vse vsebnosti ZU določene z referenčno HPLC analizo znotraj specifikacijskega intervala. Na Sliki 22 se pri krivulji VZ

2 in posledično na njeni RSD vidi skok vrednosti takoj po zaustavitvi mešalnika, kar pripišemo začasni odstranitvi NIR spektrometra. NIR instrument je ob premiku posnel spektre brez stika vzorčnega okna z zmesjo. Vrednosti vsebnosti ZU se med NIR spektroskopijo in HPLC analizo sicer nekoliko razlikujejo (največja razlika je 0,9 %). Vsebnosti dobljene s HPLC kažejo, da bi tako določena končna točka mešanja zagotovila vsebnost zmesi znotraj specifikacijskih meja.

Preglednica XIII Obrati, kjer je bil mešalnik zaustavljen s pripadajočimi vrednostmi RSD in vsebnosti ZU v zmeseh A.

Oznaka zmesi	Obrat zaustavitve	RSD (%)	Vsebnost NIR (%)	Vsebnost HPLC (%)
VZ 1	127	0,139	49,6	48,7
VZ 2	198	0,140	49,3	49,0
VZ 3	188	0,146	49,6	48,8



Slika 22 Prikaz vsebnosti mešanj (VS 1 - 3) in RSD (1 - 3) od začetka mešanja do 200. obrata mešalnika.

V Preglednici XIV so prikazani podatki o določitvi končne točke mešanja z NIR spektroskopijo. Pri 12 serijah zmesi A bi se z NIR spektroskopsko določitvijo končne točke mešanje v povprečju skrajšalo za približno 180 obratov oziroma 41 % celotnega predvidenega mešalnega časa po standardnem postopku. Prihranek 10 serij zmesi B pa bi znašal približno 136 obratov oziroma 56 % celotnega mešalnega časa po standardnem postopku. Glede na časovni potek mešanja, ki je pri zmeseh A 45 min in pri zmeseh B 25 min, bi pri prvih privarčevali na vsako serijo 18,5 min in 14 min pri slednjih. Iz rezultatov NIR spektroskopije vidimo, da so zmesi B v povprečju homogene prej kot A, kar lahko utemeljimo s presežkom ZU v primeru B. V primeru A sta obe surovini v enakem razmerju, zato je zmes idealno homogena šele, ko je vsak delec obdan samo z delci druge surovine, za to pa je potrebno več časa. Enako velja za nastanek naključne zmesi. K temu prispeva tudi širši specifikacijski interval v primeru zmesi B.

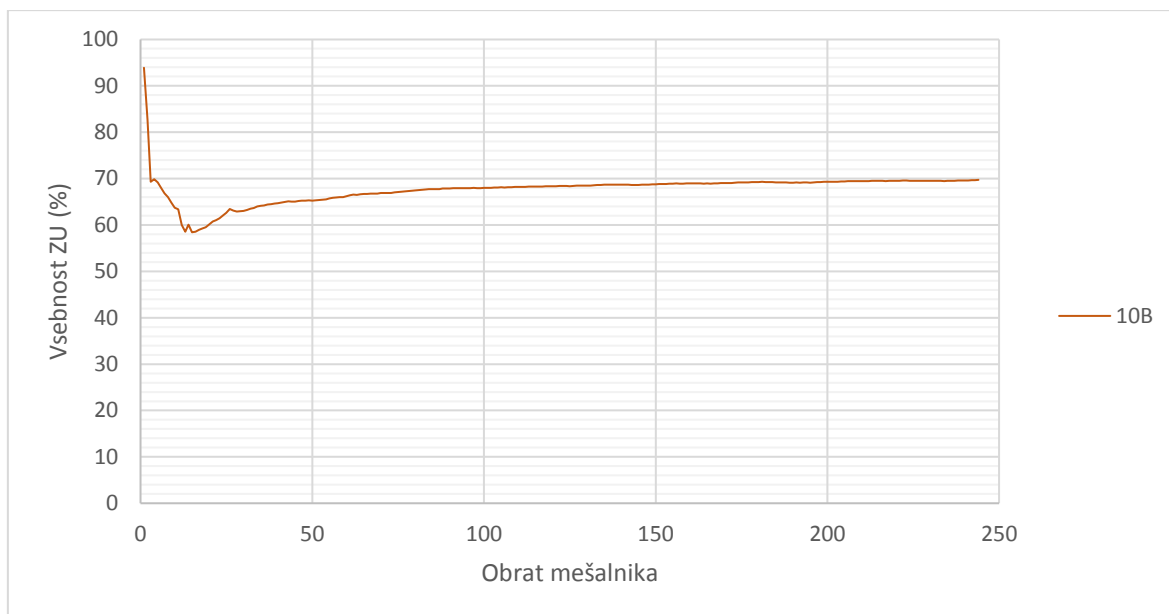
Zmesi A imajo primerljive oziroma enakomerno razpršene končne točke mešanj določene z NIR spektroskopijo. Pri zmeseh B odstopajo 5B, 6B in 10B. Domnevamo, da so za daljši čas mešanja odgovorne fizikalne lastnosti ZU. Iz Priloge 2 je razvidno, da sta ZU₁₄ in ZU₁₅, uporabljeni pri zmeseh 5B in 6B, sestavljeni iz večjega deleža velikih delcev v primerjavi z ostalimi serijami v zmeseh B. Razliko opazimo predvsem pri manjšem odstotku delcev, ki so manjši od 10 μm in višji vrednosti $D_{0,9}$. Podobno je pri ZU₁₉, ki je vstopala v zmes 10B poleg ZU₂₀, višja vrednost $D_{0,9}$.

Preglednica XIV Končne točke mešanj določene s kalibracijskim modelom za zmesi A in B ter serije ZU uporabljene za posamezne zmesi. Obrat – končna točka – obrat pri katerem s pomočjo definiranega kriterija ocenimo zadovoljivo homogenost zmesi

Oznaka zmesi A	Serijska ZU	Obrat – končna točka	Oznaka zmesi B	Serijska ZU	Obrat – končna točka
7A	ZU ₁	203	5B	ZU ₁₄	170
8A	ZU _{2/3}	238	6B	ZU _{14/15}	170
9A	ZU _{4/5}	313	7B	ZU _{16/17}	70
10A	ZU ₆	255	8B	ZU ₁₇	91
11A	ZU _{6/7}	214	9B	ZU _{17/18}	78
12A	ZU ₇	326	10B	ZU _{19/20}	173
13A	ZU _{7/8}	225	11B	ZU ₂₀	61
14A	ZU _{9/10}	259	12B	ZU _{20/21}	94
15A	ZU ₁₀	287	13B	ZU ₂₁	93
16A	ZU ₁₁	238	14B	ZU _{21/22}	78
17A	ZU ₁₁	302			
18A	ZU _{12/13}	249			

4.2.2. VIZUALIZACIJA SEKVENC MEŠANJ

Med procesom program izrisuje krivuljo vsebnosti ZU v realnem času. Za vsak obrat poda vsebnost ZU. Vizualizacija omogoča grobo oceno stopnje homogenosti zmesi. Slika 23 prikazuje mešanje zmesi 10B, kjer je razvidno, da je ob prvem obratu mešalnika vrednost 93,9 % in postopoma pada. Vzrok temu je zaporedno združevanje surovin v zalogovnik. Ob prvem zasuku mešalnika v večini ZU prekrije okno NIR instrumenta. Že v tretjem obratu pade vrednost na 69,3 %, ki je znotraj specifikacijskega intervala. Odločitev, da je v tej točki mešanje zadostno bi bila napačna, kar je razvidno iz preostalega dela krivulje. V tretjem obratu je ustrezna sestava zmesi le ob vzorčnem oknu, ne pa tudi na vseh ostalih lokacijah zmesi. Vsebnost z nadaljevanjem mešanja upade celo pod spodnjo mejo specifikacijskega intervala. Vizualizacija torej omogoča le spremljanje poteka mešanja in grobo oceno homogenosti zmesi in ni primerno orodje za določanje končne točke mešanja. Za določanje končne točke mešanja smo definirali kriterij (RSD zadnjih 27 obratov), s katerim na podlagi stabilnosti krivulje vsebnosti ZU opredelimo zadovoljivo homogenost.



Slika 23 Vsebnosti ZU zmesi 10B določene z NIR spektroskopijo v posameznih obratih mešanja.

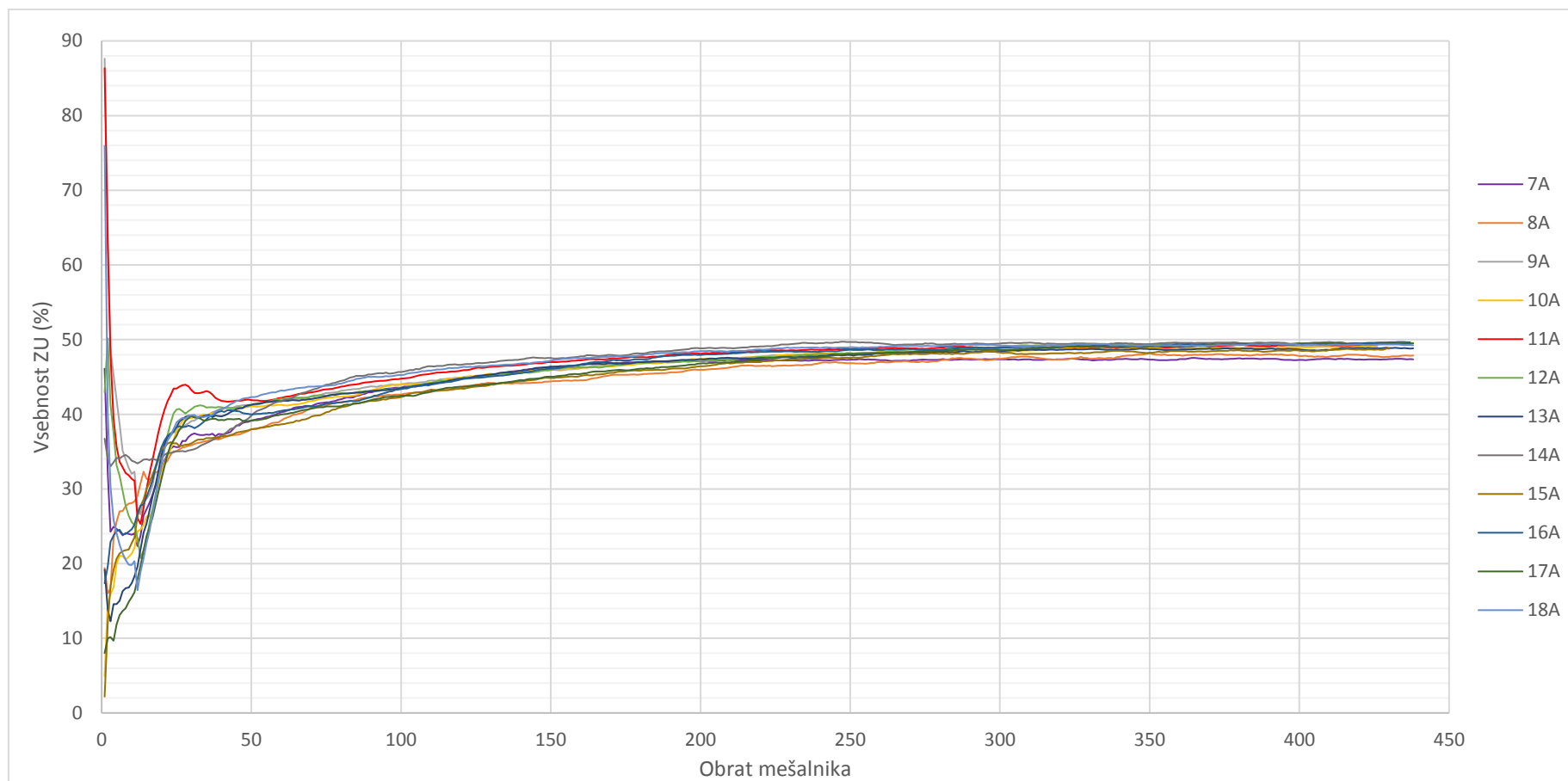
Na slikah 24 in 25 so zbrane sekvence mešanj za vse opazovane zmesi tipa A in B. Opazimo različne začetne poteke homogenizacije zmesi, ki so odvisne predvsem od zaporedja združevanja surovin v mešalnik. Zaradi naključnega gibanja delcev in prekrivanja merilnega okna nehomogene zmesi so v začetnih vrtljajih nihanja vsebnosti največja in se manjšajo tekom procesa.

Zmesi A

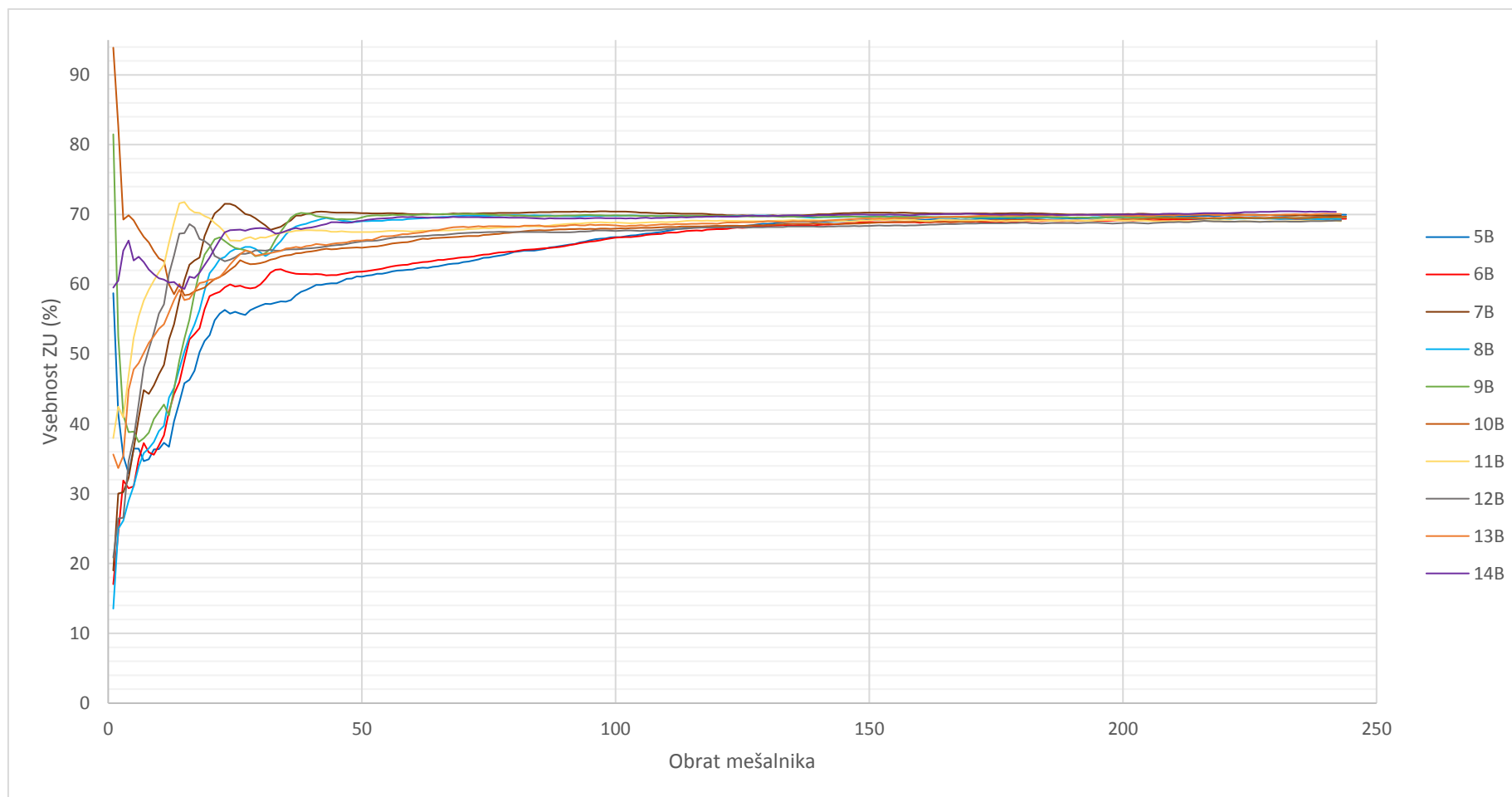
Vsebnosti zmesi 7A, 8A, 10A, 12A, 13A, 14A, 15A, 16A in 17A imajo vsebnost v prvem obratu mešanja pod spodnjo mejo specifikacijskega intervala. V nadaljnjih obratih prihaja do pomikanja vsebnosti k tarčnim vrednostim. Nasprotno je pri 9A, 11A in 17A, kjer vrednosti nihajo s prevladujočim zviševanjem proti tarčni vsebnosti.

Zmesi B

Vsebnosti zmesi 5B, 6B, 7B, 8B, 11B, 12B, 13B in 14B so ob začetku mešanja pod spodnjo mejo in se tekom poteka mešanja pomikajo proti tarčni vrednosti. 9B in 10B imata ob začetku mešanja vsebnost nad zgornjo mejo, ki ji sledi nihanje s prevladujočim padanjem vrednosti in stabilizacija h končni vrednosti.



Slika 24 Krivulje prikazujejo z NIR spektroskopijo določene vsebnosti ZU v posameznih obratih za vse opazovane zmesi A.



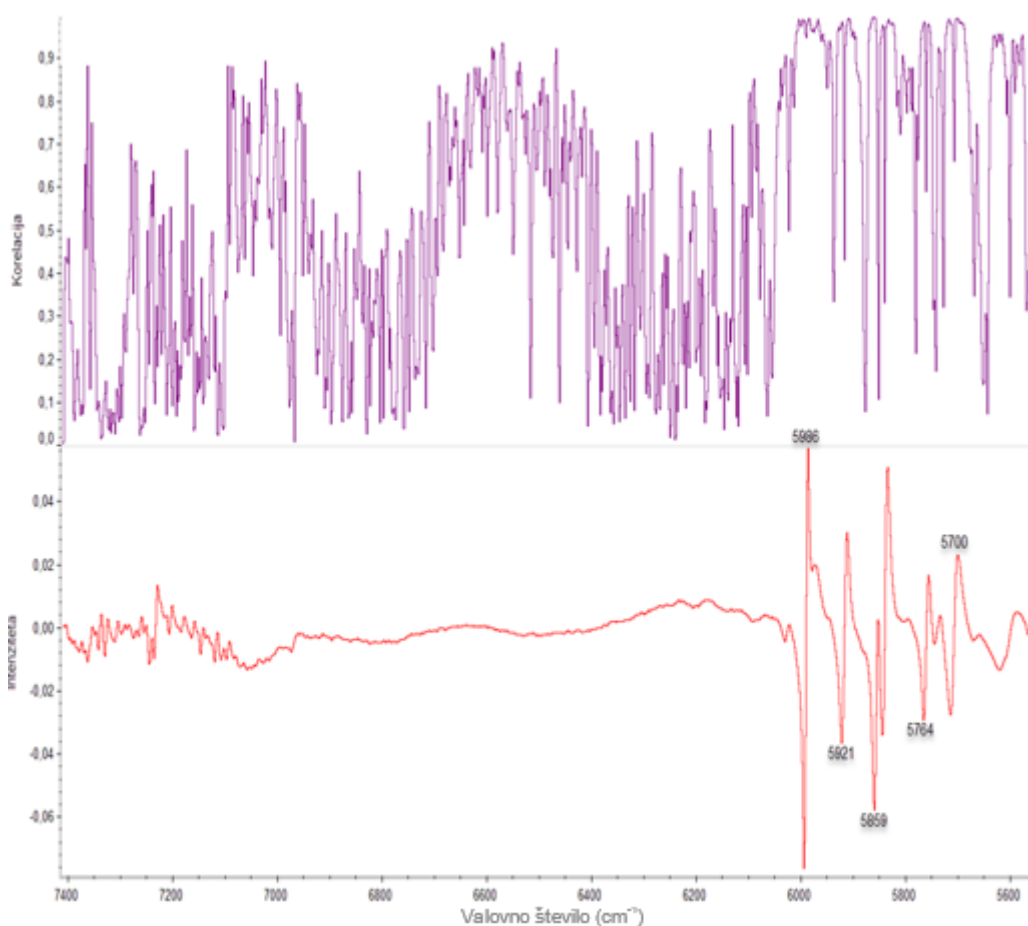
Slika 25 Krivulje prikazujejo z NIR spektroskopijo določene vsebnosti ZU v posameznih obratih za vse opazovane zmesi B.

4.3. RAZVOJ IN VREDNOTENJE KVALITATIVNEGA MODELA

4.3.1. DOLOČANJE ZA ZDRAVILNO UČINKOVINO ZNAČILNIH PODROČIJ SPEKTROV S PCA

S PCA metodo smo določili valovna števila vrhov NIR spektra, ki vsebujejo predvsem kemijsko informacijo ZU. Slika 26 prikazuje statistične spektre s korelacijo kot odzivom za oba tipa zmesi, ki smo jih dobili po uporabi PCA metode na prvih odvodih spektrov s pomočjo kalibracijskih standardov. V nadaljnjem razvoju kvalitativne metode smo uporabili sledeča valovna števila, okoli katerih je v določenem območju program sam poiskal najvišjo absolutno vrednost vrha:

- Zmesi A: 5986, 5921, 5859, 5764 in 5700 cm^{-1}

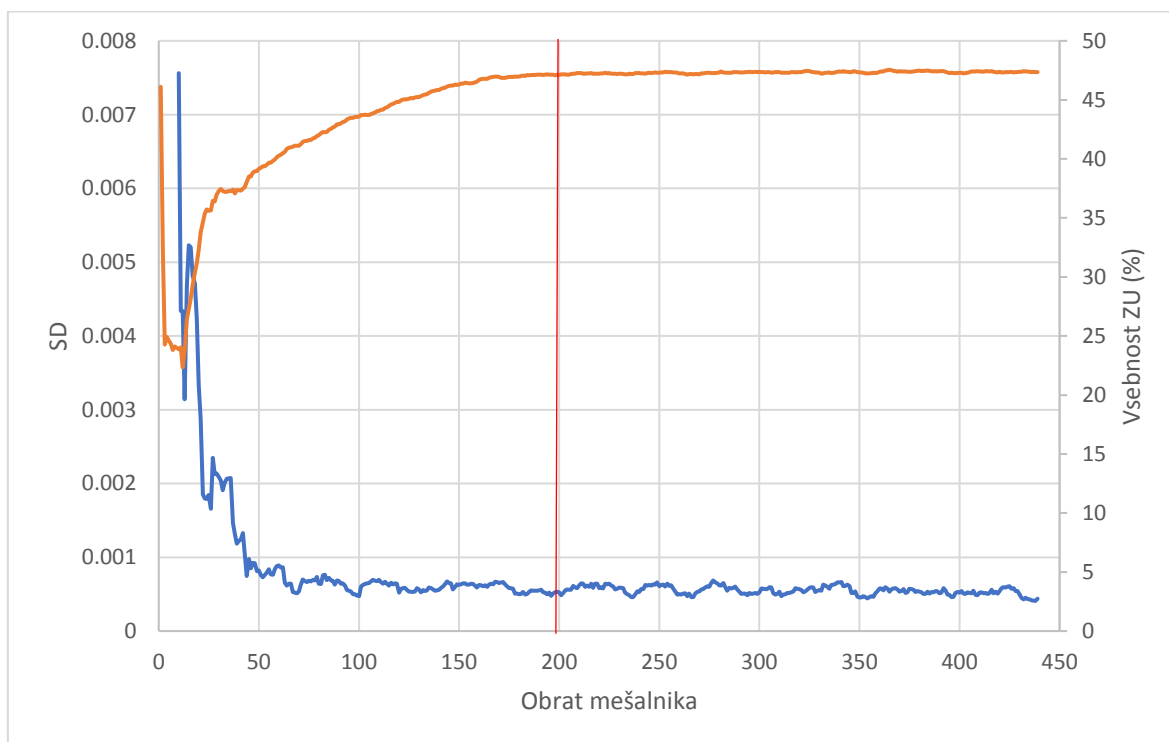


Slika 26 Prikaz statistični spektrov (vijolična krivulja), ki izražajo korelacijo med intenziteto spektra pri določenem valovnem številu in vsebnostjo ZU. Rdeča krivulja predstavlja povprečen spekter z oznakami valovnih števil, ki smo jih uporabili pri razvoju kvalitativnih modelov.

- Zmesi B: Ker gre pri zmesih tipa B za enako ZU in pomožno snov v različnem tarčnem razmerju, smo za analizo uporabljali vrhove pri enakih valovnih številih kot pri zmesih tipa A.

4.3.2. VARIANČNA METODA

Na Sliki 27 je prikazana sekvenca mešanja zmesi 7A z uporabljenom metodo drseče SD. Vidimo, da metoda ni dovolj občutljiva, saj se vrednost SD stabilizira okoli 70. obrata. Modra krivulja, ki prikazuje SD med zaporednimi bloki spektrov se stabilizira pod vrednostjo 0,001 okoli 70. obrata. Takrat vsebnost ZU v zmesi ni znotraj specifikacijskega intervala. Glede na izbran kriterij na podlagi kvantitativnega modela lahko zmes kot homogeno označimo šele po 203. obratu mešanja (navpična rdeča črta). Z metodo drsečega okvirja standardne deviacije ne moremo zadovoljivo oceniti točke, kjer je zmes homogena.



Slika 27 Modra krivulja predstavlja SD računano po metodi MSD. Oranžna krivulja predstavlja drseče povprečje vsebnosti ZU določenih z NIR. Z rdečo črto je označena točka, kjer je zmes homogena.

4.3.3. DISTANČNA METODA

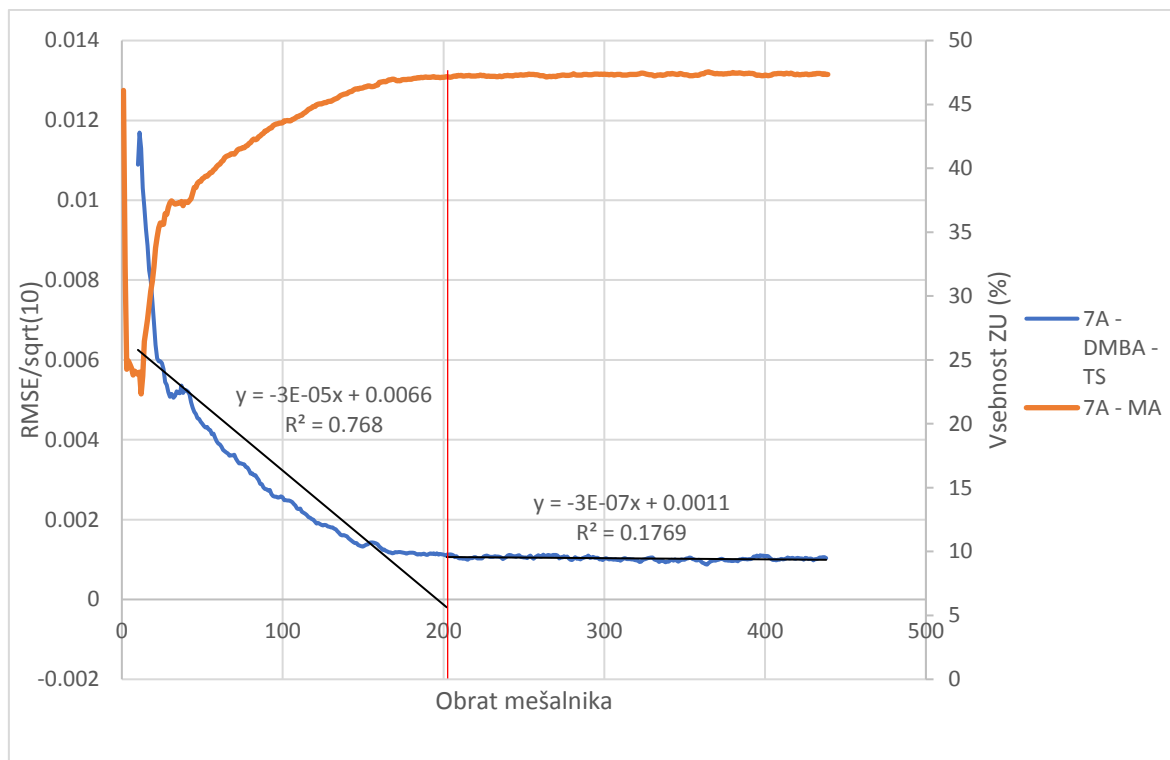
Osnova za distančno metodo DMBA - TS je bil referenčni set spektrov. V Preglednici XV so navedene intenzitete treh spektrov pri valovnih številih določenih s PCA. Povprečja za vsako valovno število smo primerjali z vrednostmi spektrov pridobljenimi med industrijskim mešanjem.

Preglednica XV Intenzitete spektrov pri valovnih številih določenih s PCA in njihove povprečne vrednosti.

Valovno število (cm^{-1})	Intenziteta 1	Intenziteta 2	Intenziteta 3	Povprečje
Kvalitativni model - zmesi A				
5986	0,0571	0,0572	0,0571	0,0571
5921	0,0384	0,0385	0,0385	0,0385
5859	0,0606	0,0607	0,0605	0,0606
5764	0,0315	0,0312	0,0314	0,0314
5700	0,0240	0,0239	0,0239	0,0239
Kvalitativni model - zmesi B				
5986	0,0843	0,0844	0,0840	0,0842
5921	0,0598	0,0596	0,0596	0,0597
5859	0,0941	0,0941	0,0943	0,0942
5764	0,0506	0,0505	0,0504	0,0505
5700	0,0440	0,0438	0,0447	0,0438

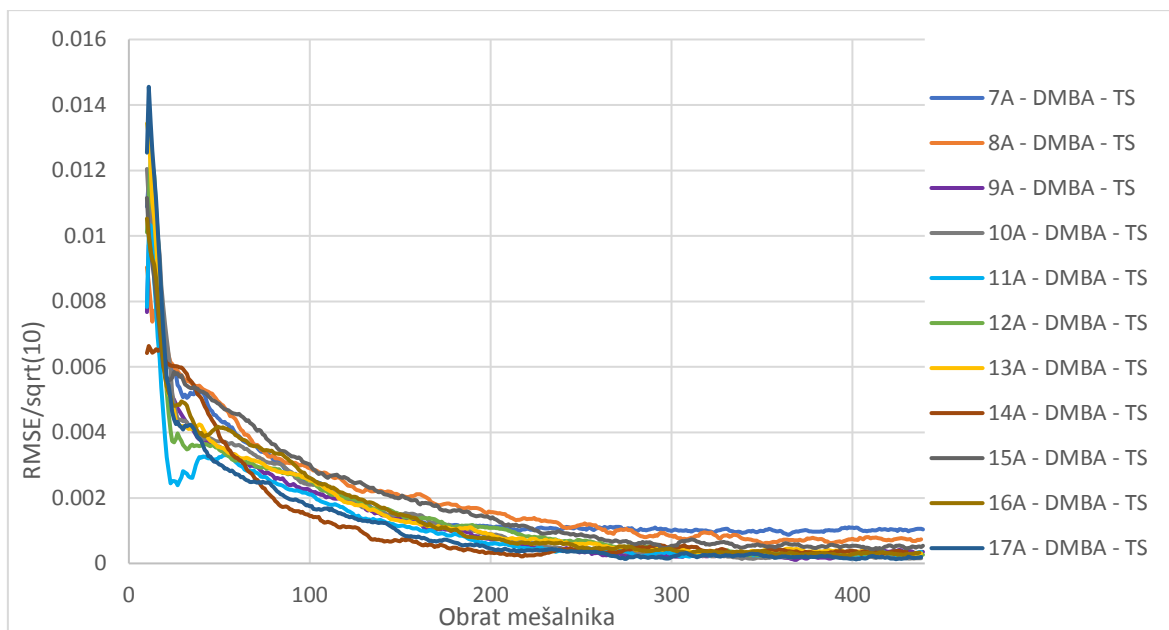
Iz poteka modre krivulje na Sliki 28 lahko ugotovimo, da je metoda DMBA - TS ustrežnejša kot MSD. Že vizualno lahko ocenimo, da se modra krivulja stabilizira v točki okoli 200. obrata, kjer smo s kvantitativnim modelom ovrednotili zmes 7A kot homogeno. Modri krivulji smo dodali dve premici. Premica od 10. do 203. obrata mešalnika ima naklon $-3 \cdot 10^{-5}$, medtem ko premica od 203. obrata naprej $-3 \cdot 10^{-7}$, kar je za dva desetiška razreda manj. Na Slikah 29 in 30 smo zbrali vse sekvence mešanj in jih analizirali z metodo DMBA - TS. Vidimo, da se krivulje stabilizirajo, vendar se razlikujejo končne vrednosti $\text{RMSE}/\sqrt{10}$ posameznih krivulj. Zato končne točke ne moremo definirati na podlagi vrednosti $\text{RMSE}/\sqrt{10}$, temveč z orodjem, ki opiše, da je krivulja stabilna. V ta namen smo izračunali naklon premice med dvema točkama na krivulji. Uporabili smo razdaljo 27.

obratov mešalnika, kar je enako obsegu podatkov za izračun RSD pri postavitvi kriterija za določanje končne točke s kalibracijskim modelom.

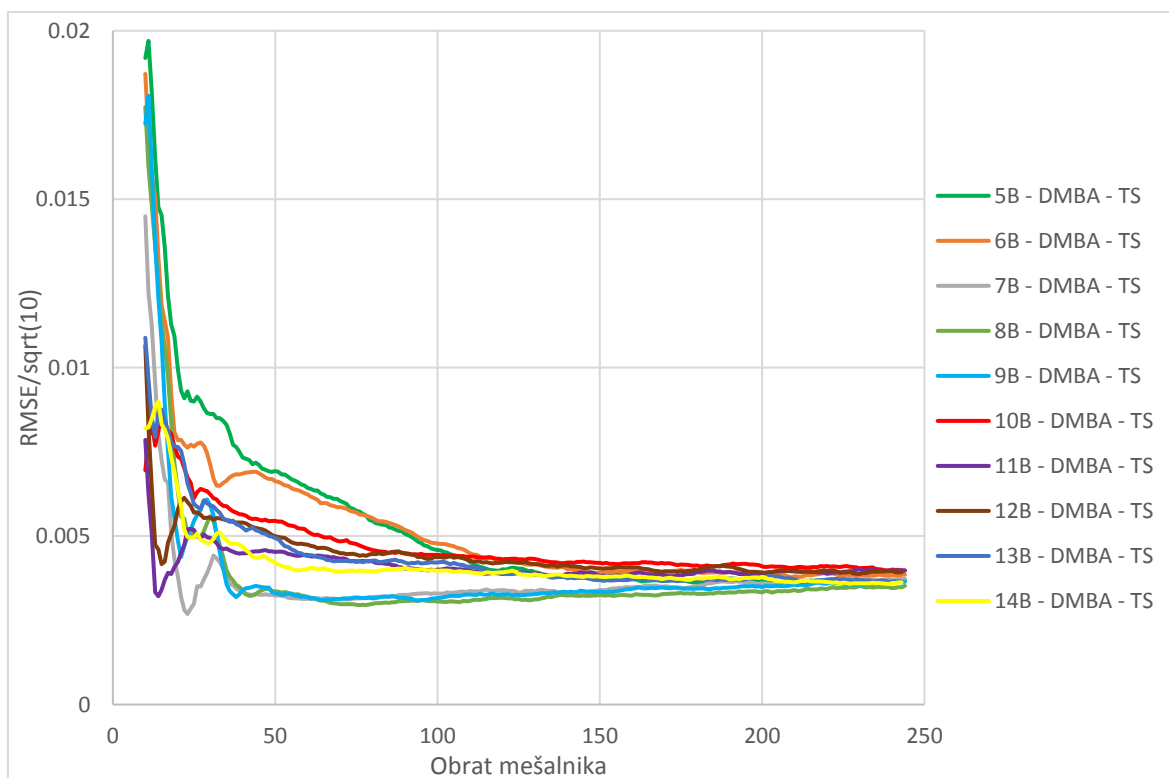


Slika 28 Modra krivulja predstavlja $RMSE/\sqrt{10}$ računano po metodi DMBA - TS. Oranžna krivulja predstavlja drseče povprečje vsebnosti ZU določenih z NIR. Z rdečo črto je označena točka, kjer je zmes 7A homogena.

Na Slikah 29 in 30 vidimo poteke krivulj DMBA - TS kvalitativnega modela za spremljanje mešanja zmesi. Vizualno smo ugotovili, da model učinkoviteje podaja čas homogenizacije kot metoda MSD, saj sledi končnim točkam mešanja določenih s kvantitativnim modelom. Zmes 12A najpočasneje doseže stanje homogene zmesi, zmes 7A pa najhitreje. To lahko razberemo iz spremljanja zelene in modre krivulje. Zelena se ustali najpočasneje, medtem ko je modra stabilizirana najhitreje. Podobno smo ugotovili pri spremljanju zmesi B z DMBA - TS metodo. Rdeča krivulja 10B – DMBA – TS predstavlja najpočasneje homogenizirajočo zmes in se stabilizira šele okoli 170. obrata. Z ozirom na kvantitativni model je zmes 11B homogena v najkrajšem času, kar lahko ugotovimo iz poteka vijolične krivulje na Sliki 29. Ustali se okoli 60. obrata. Natančnejše sklepe o homogenizaciji smo ovrednotili z izračunom naklonov posameznih odsekov krivulj.



Slika 29 Krivulje napak izračunanih po metodi DMBA – TS za sekvence mešanj zmesi A.



Slika 30 Krivulje napak izračunanih po metodi DMBA – TS za sekvence mešanj zmesi B.

S pomočjo izračuna naklonov krivulje DMBA - TS med 27. obrati mešalnika in nato povprečenjem 10 zaporednih naklonov smo ocenili, kdaj je krivulja stabilna in predstavlja končno točko mešanja določeno z NIR spektroskopijo. Izračunali smo povprečja naklonov

za najhitreje (7A z minimumom $1,5 \cdot 10^{-6}$) in najpočasneje (12A z minimumom $1,2 \cdot 10^{-6}$) homogenizirano zmes A ter zmes s časom homogenizacije najbližje povprečnemu (14A z minimumom $1,73 \cdot 10^{-6}$). Kot mejno vrednost za določitev končne točke določene s kvalitativnim modelom smo uporabili povprečje dobljenih minimumov $1,5 \cdot 10^{-6}$. Zmesi, ki jih nismo uporabili za postavitev meje, smo uporabili za vrednotenje napovedne sposobnosti postavljenega kriterija.

Na enak način smo postavili mejno vrednost za določitev homogenosti tudi za zmesi B. Uporabili smo najhitreje (11A z minimumom $5,3 \cdot 10^{-6}$) in najpočasneje (10A z minimumom $7,7 \cdot 10^{-7}$) homogenizirani zmesi ter zmes s časom homogenizacije najbližje povprečnemu (12A z minimumom $4,2 \cdot 10^{-6}$). Povprečje teh vrednosti $3,4 \cdot 10^{-6}$ smo uporabili za mejno vrednost.

Preglednica XVI Rezultati določitve končnih točk mešanj s pomočjo kvalitativne metode DMBA - TS in zbrane razlike med št. obratov končne točke mešanja s pomočjo DMBA - TS in kvantitativnim modelom. Predznak + označuje presežek št. obratov, znak – pa primanjkljaj v primerjavi s kvantitativno metodo.

Oznaka zmesi A	Obrat – končna točka DMBA - TS	Razlika (št. obratov)	Oznaka zmesi B	Obrat – končna točka DMBA - TS	Razlika (št. obratov)
8A	321	+83	5B	175	+5
9A	289	+51	6B	173	+2
10A	273	-40	7B	81	+11
11A	255	+0	8B	94	+24
13A	301	+76	9B	85	+7
15A	377	+90	13B	98	+5
16A	241	+3	14B	86	+7
17A	304	+2			
18A	232	-17			

Iz Preglednice XVI je razvidno, da je bila kvalitativna metoda točnejša za zmesi B. Za zmesi A smo določili povprečno razliko cca. 28 obratov, medtem ko za zmesi B cca. 9 obratov. Pozitivne vrednosti razlik pomenijo poznejšo določitev končnih točk mešanja glede na kvantitativni model. S tem smo preprečili tveganje, da bi model prehitro pokazal morebitno

homogenost zmesi. Le pri zmesih A smo opazili dve negativni razliki, in sicer pri 10A in 18A. To pomeni, da po kriteriju za določitev končne točke s kvantitativnim modelom, končna točka določena z DMBA - TS ni ustrezna. Pri kvantitativnem modelu zaradi računanja RSD zadnjih 27. obratov je zakasnitev v določitvi končne točke 3 minute. Na podlagi tega sklepamo, da je kljub negativni vrednosti pri zmesi 18A vsebnost ustrezna. Končna točka kvalitativnega modela je namreč znotraj zadnjih 27. obratov določenih s kvantitativnim modelom. Ker končna točka kvalitativnega modela zmesi 10A ni znotraj zadnjih 27. obratov kvantitativnega, smo preverili še vsebnost ZU določeno z NIR spektroskopijo pri obeh končnih točkah. Zmes 10A z vsebnostjo 48,4 % in zmes 18A z vsebnostjo 48,9 % ustrejata specifikacijskemu intervalu in sta ustrezni.

5. SKLEP

Razvili smo metodo na osnovi bližnje infrardeče spektroskopije za spremljanje mešanja dvokomponentnih praškastih zmesi.

Osnova NIR spektroskopske metode je bil kvantitativni kalibracijski model za zmesi s tarčno vsebnostjo ZU 50 % (zmesi A) in 70 % (zmesi B). Po postavitvi kalibracijskega modela s pomočjo ročno pripravljenih in kalibracijskih standardov pridobljenih med industrijskim mešanjem smo ovrednotili njegovo napovedno sposobnost. Primerjava odzivov obeh kalibracijskih modelov v primerjavi z referenčnimi HPLC vrednostmi je pokazala skoraj popolno linearnost (model za zmes A s korelacijskim koeficientom 0,9863 in za zmes B 0,9938). Napovedno sposobnost smo najprej ovrednotili le znotraj kalibracijskega modela z metodo navzkrižne validacije z izvzemanjem po enega vzorca iz modela in izračunom njegove vsebnosti ZU. Napaka navzkrižne validacije je za model zmesi A znašala 1,38 % ter za zmesi B 1,23 %. Hkrati smo ovrednotili še vpliv razlik v velikosti delcev ZU na učinkovitost določanja s kalibracijskim modelom. Primerjali smo dve zmesi A, pri čemer je ena od zmesi imela signifikantno manjše delce od druge. Rezultati vsebnosti ZU zadnjih 140 obratov mešalnika so pokazali, da je RSD pri zmesi z večjim deležem manjših delcev 1,37 %, pri zmesi z manjšim deležem majhnih delcev pa 0,51 %. Domnevamo, da so za to odgovorni iz manjših delcev nastali aglomerati kot posledica večje kohezivnosti. Ker NIR svetloba ne prodre dovolj globoko v delce, da bi bil zajet reprezentativen vzorec, lahko zaključimo, da zmesi s takšnimi delci niso primerne za določanje z NIR spektroskopijo. Natančnejše vrednotenje velikosti delcev, ki so še primerne za določanje z NIR spektroskopijo in vpliva ostalih fizikalnih lastnosti delcev ZU ter pomožnih snovi, bi lahko bilo predmet nadaljnjih raziskav.

Preverili smo tudi napovedno sposobnost modela na neodvisnih serijah mešanj. Odstopanje določitev s kalibracijskim modelom od referenčnih vrednosti HPLC analiz smo ocenili z RMSE. Za zmesi A je znašala 0,71 %, za zmesi B pa 0,45 %. Glede na razpon specifikacijskega intervala (4,7 % zmesi A in 11,2 % zmesi B) so napake sprejemljive. Ob spremljanju neodvisnih zmesi smo določili tudi končne točke mešanja glede na predhodno definiran kriterij. Za homogeno zmes smo označili tisto, ki je zadostila predpisanemu specifikacijskemu intervalu za vsebnosti ZU in kjer je bil RSD vsebnosti v zadnjih 3 min mešanja manjši od 0,150 %. Kriterij smo potrdili z medfaznim vzorčenjem, pri čemer smo

odvzeli vzorec zmesi, ko smo jo s kvantitativnim modelom označili za homogeno. Vsi HPLC rezultati vsebnosti so bili znotraj specifikacijskega intervala in se od izračunanih z modelom razlikovali za manj kot 1 %. Za zmesi A, bi se v povprečju skrajšalo mešanje za 18,5 min, za zmesi B pa 14 min. Ugotovili smo tudi, da so zmesi B, z 20 % višjo tarčno vsebnostjo ZU kot zmesi A, homogenizirane prej. To je v skladu s teorijo o nastajanju naključne zmesi. Z namenom časovne optimizacije mešanja, bi morali zožati meje definiranega kriterija (RSD je manjši od 0,150 %) in ga ponovno dokazati. Kvantitativni model bi lahko nadomestil končno HPLC analizo zmesi, vendar bi bilo potrebno kriterij določanja validirati na večjem številu neodvisnih serij mešanj v skladu s smernicami PAT.

Nazadnje smo razvili kvalitativno metodo določanja vsebnosti ZU z NIR spektroskopijo. Prednost tovrstnih metod je preprost razvoj, saj ne potrebujemo kalibracijskih standardov. Potrebna je le določitev področij spektra, ki pripadajo opazovanim komponentam. Medtem ko pri variančnih tehnikah ne potrebujemo priprave tarčnih zmesi, je to nujno za distančne metode, saj spektre primerjamo z referenčnimi spektri homogene tarčne zmesi. Poskušali smo z variančno metodo MSD, kjer smo primerjali SD med zaporednimi spektri. Že vizualno smo lahko na enem izmed sekvenc mešanj ocenili, da metoda nima zadovoljive napovedne moči, saj je bi jo za homogeno označili cca. 130 obratov mešalnika prezgodaj. V takšnem primeru mešane zmesi ne bi ustrezale specifikacijskemu intervalu vsebnosti ZU. S kvantitativnim modelom primerljive rezultate smo dobili z distančno metodo DMBA - TS, kjer smo najprej tri spektralne vrhove tarčnih spektrov povprečili pri petih valovnih dolžinah. Nato smo računali razlikovanje s spektri posnetimi med industrijskim mešanjem. Vizualno smo ugotovili, da vrednost $RMSE/\sqrt{10}$ tekom mešanja zrcalno sledi trendu krivulje kalibracijskega modela. Z računanjem naklona krivulje SD med zaporednimi 27. obrati mešalnika smo potrdili stabilizacijo SD. Z DMBA – TS metodo so bile končne točke na 9 neodvisnih zmesih A v povprečju določene 28 obratov mešalnika kasneje kot s kvantitativnim modelom, na 7 neodvisnih zmesih A pa 9 obratov kasneje. Le pri dveh serijah mešanja zmesi A je bila točka homogenosti z DMBA – TS določena prej kot s kvantitativnim modelom. V teh točkah smo preverili vsebnost ZU, pri čemer sta bili obe pogojno vprašljivi zmesi ustrezni. Z nadgradnjo razvitih kvalitativnih tehnik bi lahko ovrednotili možnost pojavnosti segregacije zaradi zakasnjene določitve končne točke mešanja v primerjavi s kvantitativnim modelom.

LITERATURA

1. Rantanen J, Khinast J. The Future of Pharmaceutical Manufacturing Sciences. *J Pharm Sci* 2015; 104(11): 3612–3638.
2. The benefits of in-line COD measurement in industrial wastewater. <https://www.rhosonics.nl/news/the-benefits-of-in-line-cod-measurement-in-industrial-wastewater/> Dostop: 05.05.2018
3. Guidance for Industry PAT - A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, manufacturing, and Quality Assurance. <https://fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070305.pdf> Dostop: 05.05.2018
4. Bakeev KA. Process Analytical Technology: Spectroscopic Tools and Implementation Strategies for the Chemical and Pharmaceutical Industries. Wiley, 2005: 13–17.
5. Guidance for Industry - Part 11, Electronic Records; Electronic Signatures — Scope and Application. <https://www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/ucm125125.pdf> Dostop: 05.05.2018
6. Scott P. Process Analytical Technology: Applications to the Pharmaceutical Industry. *DISOLUT TECHNOL* 2002; 9(3): 6–8.
7. Troup GM, Georgakis C. Process systems engineering tools in the pharmaceutical industry. *Comput Chem Eng* 2013; 51: 157–171.
8. Kamble R, Sharma S, Varghese V, Mahadik K. Process Analytical Technology (PAT) in Pharmaceutical Development and its Application. *J Pharm Sci* 2013; 23(2): 212-223.
9. Abraham J. International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. Pp. 1041–1054 in Brouder A, Tietje C (eds). *Handbook of Transnational Economic Governance Regimes*. Brill, 2009.
10. Satinder A, Scypinski S. *Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis*. 1st ed. San Diego: Academic Press, 2001: 195–295.
11. Hickey AJ, Ganderton D. *Pharmaceutical Process Engineering*. 2nd ed. London: CRC Press, 2009: 155–168.
12. Aulton ME. *Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines*. 4th ed. Churchill Livingstone, 2007: 170–183.
13. Mayer-Laigle C, Gatumel C, Berthiaux H. Mixing dynamics for easy flowing powders in a lab scale Turbula® mixer. *Chem Eng Res Des* 2015; 95: 248–261.

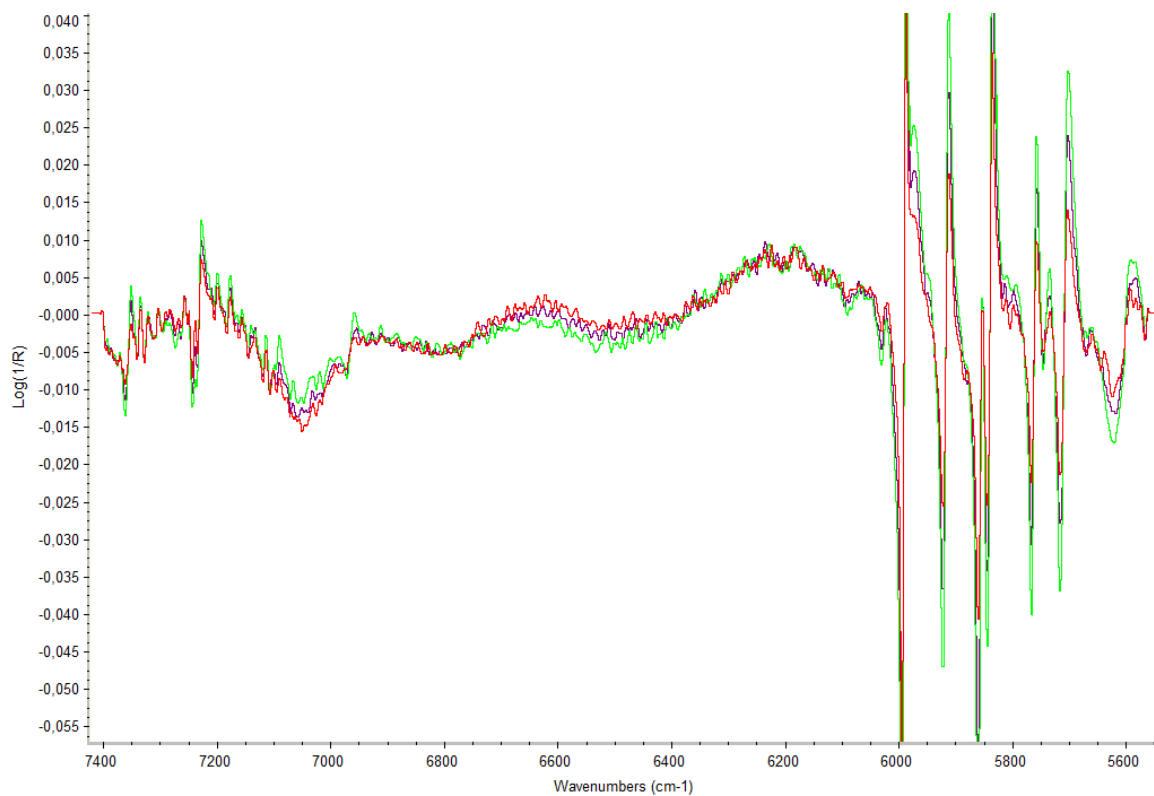
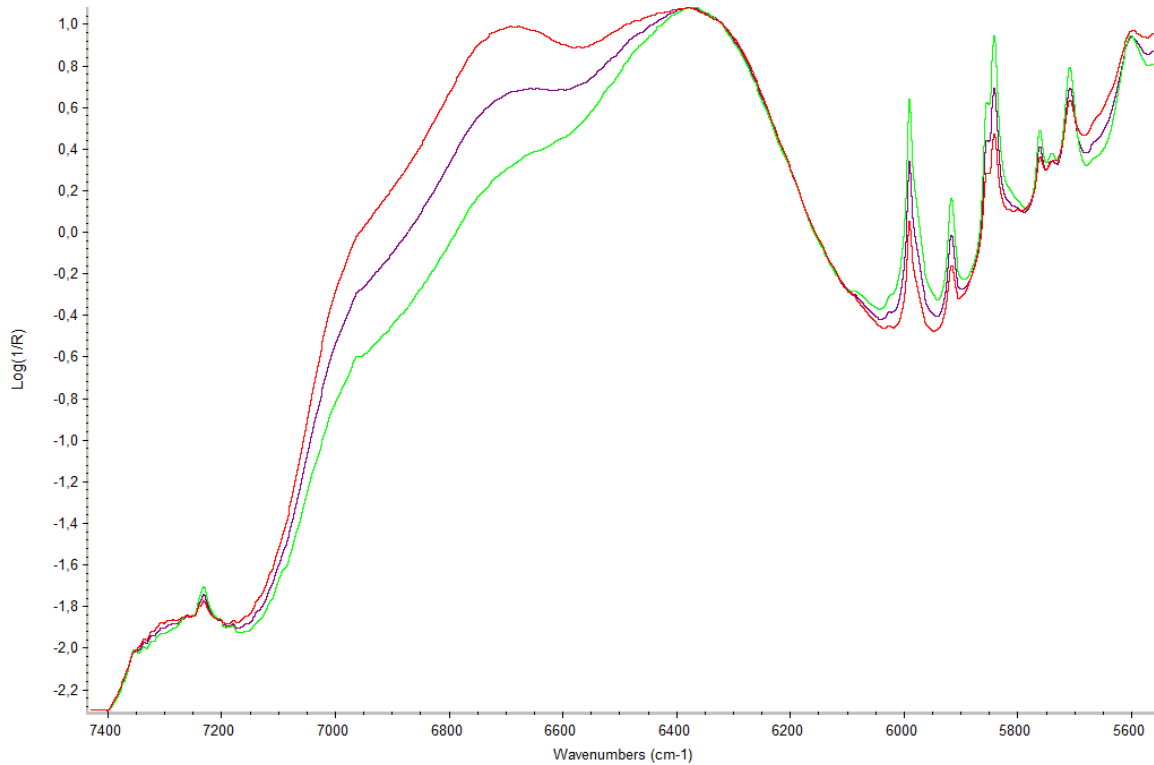
14. Drahn JA, Bridgwater J. The mechanisms of free surface segregation. *Powder Technol* 1983; 36(1): 39–53.
15. Yang W-C. *Handbook of Fluidization and Fluid-Particle Systems*. 1st ed. Pittsburg: Marcel Dekker, 2003: 1-2.
16. Guevara J. Review of Particle Size Distribution Analysis Methods. https://soils.ifas.ufl.edu/media/soilsifasufledu/sws-main-site/pdf/technical-papers/Guevara_Jorge_One_Year_Embargo.pdf. Dostop: 07.05.2018
17. Parikh DD. *Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology*. Owing Mills, Maryland: Atlantic Pharmaceutical Services, 1997: 82-88.
18. Cullen PJ, Romañach RJ, Abatzoglou N, Rielly CD. *Blending and Mixing*. 1st ed. United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd., 2015: 90-95, 412-419.
19. Whiting J, Fox J. Characterization of Feedstock In the Powder Bed Fusion Process: Sources of Variation in Particle Size Distribution and the Factors That Influence Them. https://ws680.nist.gov/publication/get_pdfcfm?pub_id=921552 Dostop: 07.05.2018
20. Young PM, Sung A, Traini D, Kwok P, Chiou H, Chan H-K. Influence of humidity on the electrostatic charge and aerosol performance of dry powder inhaler carrier based systems. *Pharm Res* 2007; 24(5): 963–970.
21. Thanh Tien Nguyen. Particle – particle interactions in dry powder blending. https://www.tipharma.com/fileadmin/user_upload/Theses/PDF/Nguyen_Tien_Thanh_D6-203.pdf Dostop: 10.05.2018
22. Masuda H, Higashitani K, Yoshida H. *Powder Technology Handbook*. 3rd ed. CRC Press, 2006: 379.
23. Lee SL, O'Connor TF, Yang X, Cruz CN, Chatterjee S, Madurawe RD, Moore CMV, Yu LX, Woodcock J. Modernizing Pharmaceutical Manufacturing: from Batch to Continuous Production. *J Pharm Sci* 2015; 10(3): 191–199.
24. Augsburger LL, Hoag WS. *Pharmaceutical Dosage Forms - Tablets*. 3rd ed. Taylor & Francis, 2016: 41-44.
25. Dreu R. *Zapiski iz predmeta Industrijska farmacija*. 2017.
26. Rhodes M, Rhodes JM. *Introduction to Particle Technology*. John Wiley & Sons, Ltd., 2008: 300-304.
27. Bouwman-Boer Y, Fenton-May V, Le Brun P. *Practical Pharmaceutics: An International Guideline for the Preparation, Care and Use of Medicinal Products*. Springer, 2015: 632.

28. Siesler WH, Ozaki Y, Kawata S, Heise HM. *Near Infrared Spec - Principles*. John Wiley & Sons, Ltd., 2008: 3-7, 11-17, 119.
29. Putzig CL, Leugers MA, McKelvy ML, Mitchell GE, Nyquist RA, Papenfuss RR, Yurga L. *Infrared Spectroscopy*. *Anal Chem* 1994; 66(12): 26–66.
30. Ciurczak WE, Drennen KJ. *Pharmaceutical and Medical Applications of Near-Infrared Spectroscopy*. CRC Press, 2002: 2-8. 17-19.
31. An introduction to near infrared (NIR) spectroscopy. <http://www.impublications.com/content/introduction-near-infrared-nir-spectroscopy>
Dostop: 22.05.2018
32. FTIR Sample Techniques - Transmission. <https://www.thermofisher.com/us/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-sample-handling-techniques/ftir-sample-handling-techniques-transmission.html> Dostop: 22.05.2018
33. Diffuse Reflectance Spectroscopy. <http://mmrc.caltech.edu/FTIR/Literature/Diff%20Reflectance/Diffuse%20Reflectants%20Spec%20%20J.%20Blitz.pdf> Dostop: 20.05.2018
34. Near Infrared (NIR) Spectroscopy for Cannabis Potency Analysis. <https://www.steepphill.com/pdf/uploads/whitepapers/06acfb8365c1bc894aecbaaf609579d9.pdf> Dostop: 15.05.2018
35. Aenugu HPR, Kumar DS, Parthiban N, Ghosh SS, Banji D. Near Infra Red Spectroscopy- An Overview. *Int J Chem Tech* 2011; 3(2): 825-836.
36. Mazur L, Peralta-Zamora PG, Demczuk B, Hoffmann Ribani R. Application of multivariate calibration and NIR spectroscopy for the quantification of methylxanthines in yerba mate (*Ilex paraguariensis*). *J Food Compos Anal* 2014; 35(2): 55–60.
37. Ferreira AP, Tobyn M. Multivariate analysis in the pharmaceutical industry: enabling process understanding and improvement in the PAT and QbD era. *Pharm Dev Technol* 2015; 20(5): 513–527.
38. Practical Considerations in Data Pre-treatment for NIR and Raman Spectroscopy. <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/116330-Practical-Considerations-in-Data-Pre-treatment-for-NIR-and-Raman-Spectroscopy/> Dostop: 10.06.2018

39. Fernández-Cabanás VM, Garrido-Varo A, Pérez-Marín D, Dardenne P. Evaluation of pretreatment strategies for near-infrared spectroscopy calibration development of unground and ground compound feedingstuffs. *Appl Spectrosc* 2006; 60(1): 17–23.
40. Rinnan Å, Berg F van den, Engelsen SB. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. *TRAC-Trend Anal Chem* 2009; 28(10): 1201–1222.
41. Vision 4.1. <https://www.metrohm.com/en-us/products-overview/spectroscopy/nirs-lab-analyzers/vision-software/66069412> Dostop: 15.06.2018
42. Real-Time NIR Monitoring of a Pharmaceutical Blending Process through Multivariate Analysis-Derived Models. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.472.4935&rep=rep1&type=pdf> Dostop: 29.06.2018
43. Modelling of a Fed-Batch Fermentation Process. <http://jultika.oulu.fi/files/isbn9514275144.pdf> Dostop: 15.07.2018
44. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6th ed. Pharmaceutical Press, 2009: 129-133.
45. IBC Blenders - GEA. <https://www.gea.com/en/products/ibc-blenders.jsp> Dostop: 05.07.2018
46. Murn M. Korelacije med različnimi celicami za merjenje velikosti delcev z metodo laserske difrakcije: [diplomsko delo visokošolskega strokovnega študijskega programa]. University of Maribor, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, 2005.
47. Thermo Fisher Scientific. <https://www.thermofisher.com/us/en/home.html> Dostop: 10.07.2018
48. Mlinar U. Vrednotenje uporabe bližnje infrardeče (NIR) spektroskopije za spremljanje homogenosti vsebnosti v procesu mešanja: [enoviti magistrski študij farmacije]. 2014.
49. Detection of Lumps in Powder Blends by Inline NIR. <http://www.pharmtech.com/detection-lumps-powder-blends-inline-nir> Dostop: 20.07.2018

Priloga 1

Primer čistih spektrov (obdelanih le s SNV) treh standardnih vzorcev (zgoraj) in njihovih prvih odvodov (spodaj).



Priloga 2

Zbrani podatki velikosti delcev ZU za vse uporabljene serije.

Serijska ZU	D _{0,5} (μm)	D _{0,9} (μm)	10 μm (%)	75 μm (%)	150 μm (%)
ZU ₀	21,62	86,83	25,95	86,79	98,00
ZU ₁	25,72	82,32	19,21	87,66	99,18
ZU ₂	28,28	88,95	17,29	85,33	98,96
ZU ₃	23,50	95,36	23,60	84,60	97,19
ZU ₄	28,00	92,64	17,31	84,19	98,49
ZU ₅	26,83	101,21	20,93	82,37	96,73
ZU ₆	27,75	105,66	19,03	80,90	95,78
ZU ₇	30,05	96,89	16,64	82,5	98,27
ZU ₈	27,75	87,56	16,96	85,85	98,69
ZU ₉	29,21	109,74	22,40	80,12	95,44
ZU ₁₀	26,52	93,88	19,72	84,09	98,10
ZU ₁₁	24,93	90,87	19,98	85,20	98,44
ZU ₁₂	33,09	104,09	15,47	80,60	96,60
ZU ₁₃	30,79	97,58	15,95	82,44	97,95
ZU ₁₄	30,64	95,60	14,44	82,98	98,17
ZU ₁₅	32,08	98,17	14,11	81,81	98,06
ZU ₁₆	32,55	90,29	15,12	84,26	99,06
ZU ₁₇	33,48	90,90	14,90	83,91	99,04
ZU ₁₈	32,51	92,05	15,11	83,58	99,09
ZU ₁₉	29,71	97,67	16,49	82,32	97,95
ZU ₂₀	28,51	88,77	16,16	85,41	98,77
ZU ₂₁	26,04	85,50	19,02	86,62	99,09
ZU ₂₂	28,29	85,43	17,37	86,43	99,16

Priloga 3

Primer vseh zbranih podatkov kvantitativnega in kvalitativnega modela sekvence 7A.

Obrat	MA (%)	Višina 1	Višina 2	Višina 3	Višina 4	Višina 5	MSD	RMSE/sqrt(10)	Naklon
1	46.10152	0.049484	0.035429	0.055674	0.029621	0.021522			
2	32.20683	0.019937	0.016965	0.021882	0.013683	0.004719			
3	24.26903	0.010828	0.009452	0.011199	0.007629	0.005025			
4	24.93132	0.031162	0.022709	0.033231	0.018052	0.010246			
5	24.63743	0.028116	0.020131	0.028823	0.015686	0.007038			
6	24.33574	0.027897	0.019858	0.028283	0.015979	0.007388			
7	23.811	0.025361	0.018284	0.025479	0.01426	0.004681			
8	24.10677	0.032427	0.022294	0.032493	0.01728	0.008747			
9	23.99159	0.02803	0.020278	0.028306	0.015531	0.006962			
10	23.86095	0.028375	0.019373	0.028271	0.015944	0.006321	0.007562	0.010889883	
11	24.04152	0.031657	0.021376	0.031544	0.017224	0.00941	0.00434	0.011695073	
12	22.33802	0.033505	0.022182	0.03392	0.017636	0.009153	0.004339	0.011302973	
13	23.73727	0.040313	0.028038	0.041356	0.021123	0.013375	0.003143	0.010302253	
14	26.44402	0.045362	0.030028	0.04778	0.023834	0.016382	0.004689	0.009822393	
15	27.2928	0.042453	0.029316	0.045161	0.022061	0.015331	0.005228	0.009277113	
16	28.18223	0.039665	0.027716	0.039985	0.020385	0.013055	0.005204	0.008863103	
17	29.29181	0.042234	0.028233	0.043513	0.021804	0.013836	0.004815	0.008247553	
18	30.3882	0.039489	0.026563	0.039733	0.020619	0.012734	0.004714	0.007988583	
19	31.16949	0.04175	0.029533	0.042623	0.022428	0.013643	0.004231	0.007479883	
20	32.29966	0.043129	0.028868	0.043969	0.022301	0.014176	0.003334	0.006938293	
21	33.77307	0.046352	0.031673	0.047811	0.024598	0.017052	0.002879	0.006375543	
22	34.62266	0.042113	0.02794	0.043157	0.02284	0.014151	0.001855	0.006037493	
23	35.35669	0.04304	0.028353	0.043584	0.021722	0.014814	0.001795	0.005964413	
24	35.7218	0.044753	0.030355	0.046 842	0.024459	0.016871	0.001792	0.005965473	
25	35.60476	0.043807	0.030529	0.045761	0.02393	0.015168	0.001842	0.005916743	
26	35.62304	0.043993	0.030023	0.044696	0.022658	0.014866	0.001658	0.005762443	
27	36.45026	0.050119	0.033546	0.052211	0.026633	0.018578	0.002349	0.005447773	
28	36.39265	0.041224	0.028631	0.041855	0.021774	0.013445	0.002127	0.005369863	
29	36.9573	0.047375	0.031618	0.048357	0.023813	0.016771	0.002136	0.005190293	
30	37.29918	0.04555	0.030897	0.046995	0.024591	0.016138	0.002088	0.005073013	
31	37.44043	0.045157	0.030319	0.045103	0.023293	0.015862	0.002038	0.005150533	
32	37.30336	0.044693	0.030582	0.045482	0.023359	0.015502	0.001912	0.005056363	
33	37.20972	0.041605	0.02877	0.042077	0.021592	0.013266	0.002011	0.005098393	
34	37.21885	0.04327	0.028919	0.04334	0.021946	0.014258	0.002064	0.005213863	
35	37.28904	0.045518	0.030961	0.04688	0.023905	0.015748	0.002071	0.005175693	
36	37.26947	0.043291	0.029919	0.044711	0.023804	0.015905	0.002073	0.005161753	
37	37.39037	0.045189	0.030718	0.046344	0.023326	0.015624	0.001462	0.005360613	0.000166
38	37.07476	0.046868	0.030442	0.048094	0.023886	0.016119	0.001315	0.005175813	0.000154
39	37.36478	0.044256	0.030317	0.045851	0.024176	0.015797	0.001186	0.005251183	0.000137
40	37.34589	0.045441	0.0307	0.047701	0.024613	0.017077	0.001221	0.005237573	0.00012
41	37.32964	0.045523	0.030889	0.047218	0.023742	0.015591	0.001244	0.005205283	0.000107

42	37.48084	0.046473	0.030982	0.046737	0.025398	0.016682	0.001327	0.005138743	9.55E-05
43	37.62638	0.046658	0.031357	0.047765	0.024116	0.017122	0.001039	0.004941663	8.63E-05
44	38.05717	0.046075	0.030768	0.047443	0.024373	0.017065	0.000748	0.004801753	7.79E-05
45	38.51303	0.047591	0.032082	0.049996	0.026312	0.017404	0.000977	0.004698023	6.98E-05
46	38.50604	0.044971	0.031253	0.047312	0.023328	0.016253	0.000851	0.004643153	6.21E-05
47	38.8297	0.046836	0.033058	0.049005	0.024914	0.017992	0.000925	0.004537113	5.53E-05
48	38.94437	0.046883	0.031206	0.048078	0.023418	0.017082	0.000922	0.004524533	5.03E-05
49	38.98273	0.046231	0.031941	0.047834	0.024339	0.017366	0.00081	0.004451393	4.72E-05
50	39.1707	0.04717	0.031893	0.047809	0.025738	0.017459	0.000822	0.004406023	4.53E-05
51	39.24804	0.046383	0.032537	0.048611	0.02455	0.017141	0.000759	0.004343433	4.39E-05
52	39.37157	0.046819	0.032063	0.048339	0.025845	0.01727	0.000731	0.004302793	4.29E-05
53	39.3854	0.046088	0.030589	0.048212	0.023859	0.016494	0.000764	0.004320553	4.19E-05
54	39.50518	0.047382	0.031477	0.049773	0.025191	0.018219	0.000793	0.004257373	4.14E-05
55	39.66407	0.048128	0.032054	0.05079	0.026137	0.017492	0.000839	0.004245213	4.33E-05
56	39.67233	0.046948	0.032724	0.050253	0.025982	0.017979	0.000768	0.004137523	4.46E-05
57	39.84335	0.047416	0.032353	0.048964	0.024818	0.016435	0.000765	0.004155713	4.69E-05
58	39.95231	0.048836	0.032676	0.050299	0.026693	0.01864	0.000841	0.004050943	4.92E-05
59	40.14159	0.049028	0.033319	0.05077	0.025959	0.017447	0.000882	0.003962823	5.15E-05
60	40.26054	0.047543	0.033598	0.050776	0.025615	0.017929	0.000892	0.003908903	5.34E-05
61	40.34349	0.046625	0.032551	0.05006	0.025292	0.017632	0.00086	0.003879523	5.41E-05
62	40.49531	0.049027	0.032508	0.050883	0.026144	0.016846	0.000865	0.003828803	5.37E-05
63	40.59808	0.047905	0.032019	0.050287	0.026235	0.017397	0.000656	0.003742793	5.32E-05
64	40.82979	0.048635	0.032551	0.050564	0.025573	0.017614	0.000615	0.003713843	5.26E-05
65	40.93924	0.048839	0.033083	0.050325	0.026722	0.018536	0.000641	0.003684803	5.08E-05
66	40.98795	0.048661	0.032733	0.050042	0.026407	0.018602	0.000642	0.003659213	4.95E-05
67	41.02482	0.047887	0.032337	0.050786	0.026277	0.018114	0.00053	0.003605063	4.77E-05
68	41.12744	0.048343	0.033552	0.050779	0.026279	0.01767	0.000519	0.003610273	4.56E-05
69	41.12739	0.048329	0.033247	0.050383	0.026292	0.018374	0.00051	0.003609253	4.35E-05
70	41.10118	0.047802	0.033011	0.049187	0.025425	0.018252	0.000537	0.003627093	4.15E-05
71	41.25524	0.049866	0.034112	0.051376	0.027952	0.018905	0.000631	0.003526583	4.06E-05
72	41.43796	0.050361	0.033846	0.051656	0.026294	0.01935	0.000699	0.003465593	4.03E-05
73	41.50959	0.049145	0.032934	0.051052	0.026696	0.019379	0.000676	0.003411963	4E-05
74	41.53407	0.048514	0.032811	0.0505	0.025414	0.018089	0.000665	0.003408053	3.94E-05
75	41.61533	0.049405	0.033405	0.051499	0.026019	0.018984	0.000682	0.003389983	3.92E-05
76	41.61526	0.048676	0.032916	0.051039	0.026167	0.01828	0.000674	0.003383653	3.87E-05
77	41.72567	0.050105	0.03334	0.052401	0.026508	0.019425	0.000697	0.003319873	3.84E-05
78	41.79265	0.048391	0.033336	0.051651	0.026508	0.01815	0.000684	0.003305743	3.84E-05
79	41.92676	0.050342	0.033898	0.052068	0.02786	0.019114	0.000733	0.003239173	3.82E-05
80	42.01784	0.049853	0.033637	0.052789	0.027272	0.019215	0.000642	0.003148283	3.83E-05
81	42.17493	0.050765	0.033849	0.051767	0.026543	0.018151	0.000636	0.003159643	3.79E-05
82	42.28704	0.050916	0.034459	0.053558	0.027382	0.020231	0.000756	0.003109253	3.74E-05
83	42.24464	0.048963	0.032981	0.052336	0.026981	0.017849	0.000762	0.003110213	3.69E-05
84	42.27786	0.049543	0.034502	0.051604	0.027147	0.019017	0.00069	0.003045363	3.65E-05
85	42.45709	0.05062	0.033668	0.053595	0.02731	0.019846	0.00072	0.002988093	3.62E-05
86	42.54067	0.051002	0.03413	0.053061	0.027511	0.020319	0.000688	0.002898643	3.62E-05
87	42.65784	0.050642	0.033629	0.052634	0.02721	0.01846	0.000682	0.002890683	3.64E-05
88	42.74764	0.051136	0.034253	0.053006	0.02805	0.019707	0.000627	0.002809523	3.66E-05

89	42.91865	0.051352	0.034676	0.053387	0.028651	0.019252	0.000684	0.002769163	3.66E-05
90	42.94035	0.050045	0.034249	0.052734	0.027498	0.01917	0.000679	0.002759863	3.61E-05
91	43.02589	0.050181	0.034415	0.053313	0.02679	0.019276	0.00064	0.002730863	3.56E-05
92	43.1263	0.051291	0.03462	0.053766	0.02691	0.018952	0.000648	0.002740933	3.52E-05
93	43.16639	0.051009	0.035766	0.054424	0.028167	0.019869	0.000618	0.002639683	3.5E-05
94	43.32743	0.050969	0.03396	0.053689	0.028136	0.020116	0.000555	0.002589113	3.49E-05
95	43.41786	0.050971	0.034727	0.053447	0.027112	0.019817	0.000548	0.002578763	3.45E-05
96	43.46252	0.05114	0.034916	0.053944	0.027465	0.019243	0.000539	0.002571913	3.38E-05
97	43.48327	0.050243	0.03392	0.053402	0.027728	0.019759	0.000498	0.002547143	3.28E-05
98	43.55124	0.050516	0.034691	0.053706	0.0266	0.019683	0.000501	0.002556703	3.15E-05
99	43.54762	0.050673	0.034592	0.053251	0.026363	0.019692	0.000483	0.002584173	3.07E-05
100	43.57625	0.050772	0.034158	0.054345	0.027743	0.018941	0.000472	0.002561543	3.02E-05
101	43.71654	0.052668	0.035609	0.055383	0.027677	0.020475	0.000604	0.002483173	3.02E-05
102	43.72493	0.050627	0.03492	0.053026	0.027699	0.018672	0.000624	0.002489123	2.99E-05
103	43.75003	0.051432	0.034676	0.055186	0.028191	0.020456	0.000637	0.002482063	2.92E-05
104	43.70519	0.051917	0.033863	0.054064	0.028	0.019173	0.000648	0.002480593	2.85E-05
105	43.7101	0.051053	0.034813	0.054613	0.027088	0.020017	0.00065	0.002465493	2.8E-05
106	43.80621	0.051961	0.035144	0.054396	0.028196	0.019452	0.000672	0.002441083	2.74E-05
107	43.8628	0.052318	0.035033	0.053317	0.028138	0.020986	0.000696	0.002393683	2.7E-05
108	43.94538	0.052444	0.034673	0.054003	0.02824	0.020209	0.000682	0.002349953	2.69E-05
109	44.04051	0.051582	0.036091	0.054666	0.029075	0.020523	0.000678	0.002276293	2.67E-05
110	44.07451	0.051262	0.034698	0.053355	0.026745	0.021005	0.000694	0.002265233	2.65E-05
111	44.14171	0.052397	0.035605	0.054261	0.027654	0.020499	0.000664	0.002279193	2.58E-05
112	44.17589	0.052621	0.035859	0.055005	0.029387	0.020329	0.000644	0.002196623	2.53E-05
113	44.30241	0.051933	0.036162	0.055272	0.027698	0.021054	0.000667	0.002174843	2.52E-05
114	44.36271	0.05146	0.034191	0.054979	0.028617	0.020647	0.000642	0.002146073	2.5E-05
115	44.46695	0.052049	0.035435	0.055047	0.027465	0.020183	0.000615	0.002120123	2.48E-05
116	44.60753	0.053271	0.035493	0.055696	0.029361	0.020932	0.000656	0.002064083	2.49E-05
117	44.66281	0.051821	0.035746	0.055237	0.028192	0.020854	0.000633	0.002043503	2.52E-05
118	44.74392	0.053103	0.035412	0.055936	0.028172	0.020126	0.000648	0.002011703	2.52E-05
119	44.82978	0.052718	0.035968	0.055497	0.028955	0.020434	0.000644	0.001995353	2.49E-05
120	44.8385	0.052157	0.035381	0.054855	0.028768	0.020356	0.000521	0.001950833	2.47E-05
121	44.97049	0.05286	0.036056	0.056606	0.029713	0.01976	0.000571	0.001905043	2.47E-05
122	45.0107	0.052077	0.036324	0.05475	0.028903	0.020018	0.000582	0.001916333	2.49E-05
123	45.03721	0.05212	0.036952	0.055517	0.029454	0.020574	0.000588	0.001891353	2.48E-05
124	45.04771	0.051683	0.035509	0.055492	0.027948	0.021178	0.000557	0.001872193	2.49E-05
125	45.09547	0.052742	0.035998	0.055628	0.027955	0.020107	0.000534	0.001849683	2.48E-05
126	45.14601	0.052585	0.036808	0.05444	0.028838	0.020412	0.000535	0.001866383	2.47E-05
127	45.13569	0.052777	0.036066	0.055302	0.028397	0.019657	0.000528	0.001862893	2.42E-05
128	45.20782	0.053292	0.036909	0.055532	0.029582	0.020622	0.000539	0.001831013	2.4E-05
129	45.23789	0.051927	0.036166	0.05604	0.028648	0.021625	0.000583	0.001822673	2.42E-05
130	45.23336	0.05235	0.036126	0.055914	0.028591	0.0207	0.000564	0.001801033	2.39E-05
131	45.31123	0.052723	0.03669	0.054937	0.029402	0.021028	0.000526	0.001803183	2.36E-05
132	45.38662	0.053251	0.035596	0.056415	0.029095	0.021051	0.000554	0.001769823	2.32E-05
133	45.44937	0.053209	0.0367	0.055886	0.028923	0.020819	0.000545	0.001760623	2.29E-05
134	45.48156	0.053587	0.035921	0.056839	0.029201	0.021661	0.00055	0.001706633	2.25E-05
135	45.59466	0.054426	0.036206	0.05695	0.028313	0.020582	0.000589	0.001666163	2.23E-05

136	45.69894	0.054118	0.036768	0.056925	0.02882	0.021355	0.000581	0.001617133	2.2E-05
137	45.73923	0.052685	0.03538	0.055171	0.028627	0.021439	0.000563	0.001606103	2.19E-05
138	45.78733	0.053419	0.036901	0.055426	0.028471	0.020962	0.000548	0.001613683	2.15E-05
139	45.82676	0.054369	0.036886	0.055743	0.028169	0.020807	0.000551	0.001598003	2.1E-05
140	45.84014	0.052802	0.036567	0.056965	0.028751	0.020279	0.000562	0.001581173	2.1E-05
141	45.94014	0.054012	0.036854	0.056872	0.030191	0.021682	0.000585	0.001532863	2.09E-05
142	45.98982	0.053502	0.036899	0.056232	0.029692	0.022019	0.000602	0.001503503	2.09E-05
143	46.03143	0.054063	0.036027	0.057282	0.030202	0.021215	0.000635	0.001470983	2.06E-05
144	46.11845	0.054778	0.036861	0.056832	0.030391	0.021823	0.000675	0.001436223	2.03E-05
145	46.19627	0.054292	0.036843	0.056487	0.029766	0.021467	0.000651	0.001412443	2E-05
146	46.21595	0.054153	0.036718	0.056738	0.029188	0.020913	0.000648	0.001415203	1.94E-05
147	46.20045	0.053444	0.036187	0.056472	0.030124	0.021812	0.000565	0.001367833	1.87E-05
148	46.28204	0.053455	0.037292	0.057681	0.029126	0.01962	0.000598	0.001347883	1.81E-05
149	46.27922	0.052636	0.038243	0.05592	0.029041	0.021884	0.000632	0.001330383	1.75E-05
150	46.28769	0.052472	0.036353	0.056875	0.028906	0.021746	0.000626	0.001320503	1.68E-05
151	46.37836	0.053985	0.036084	0.056713	0.02904	0.02139	0.000632	0.001344493	1.61E-05
152	46.37486	0.053074	0.036608	0.055756	0.02957	0.02074	0.000648	0.001370453	1.55E-05
153	46.45125	0.053791	0.036437	0.057509	0.02861	0.021615	0.000649	0.001378723	1.5E-05
154	46.43343	0.053072	0.036622	0.055814	0.030135	0.020622	0.00063	0.001422923	1.45E-05
155	46.39624	0.05334	0.037169	0.057742	0.029032	0.021014	0.000631	0.001428503	1.4E-05
156	46.39731	0.054445	0.037022	0.056438	0.029308	0.020905	0.000644	0.001424423	1.4E-05
157	46.42219	0.053333	0.03658	0.057223	0.030298	0.021389	0.00064	0.001416583	1.4E-05
158	46.4874	0.054383	0.036777	0.057812	0.028758	0.020897	0.000615	0.001402053	1.41E-05
159	46.52512	0.054764	0.036584	0.05731	0.030821	0.020468	0.000591	0.001379823	1.4E-05
160	46.71157	0.054342	0.037153	0.058761	0.02983	0.022094	0.000624	0.001321543	1.39E-05
161	46.75778	0.053431	0.036831	0.057671	0.030088	0.021861	0.000621	0.001294843	1.36E-05
162	46.77464	0.05433	0.037655	0.056932	0.030284	0.02134	0.00061	0.001246913	1.31E-05
163	46.79536	0.054366	0.035955	0.056138	0.029473	0.02131	0.000622	0.001254113	1.26E-05
164	46.78215	0.05475	0.037691	0.056346	0.029552	0.02129	0.0006	0.001220473	1.21E-05
165	46.85626	0.054122	0.038527	0.057627	0.029453	0.020435	0.000629	0.001201803	1.14E-05
166	46.9163	0.053964	0.037524	0.057562	0.029049	0.022245	0.000644	0.001179543	1.06E-05
167	46.93444	0.054335	0.037279	0.057465	0.028801	0.020568	0.000635	0.001183293	9.73E-06
168	46.97545	0.055103	0.037347	0.058213	0.028649	0.022141	0.000667	0.001155033	8.83E-06
169	46.964	0.052851	0.037051	0.057161	0.030317	0.021836	0.000664	0.001162343	8.25E-06
170	46.93255	0.053362	0.037607	0.056717	0.030428	0.021338	0.00065	0.001189623	7.74E-06
171	46.85092	0.053608	0.037086	0.057251	0.03082	0.021913	0.000659	0.001181663	7.37E-06
172	46.86046	0.053626	0.037145	0.057659	0.030359	0.021506	0.000664	0.001184123	7.38E-06
173	46.85592	0.053658	0.036432	0.057283	0.028886	0.020656	0.000636	0.001187393	7.47E-06
174	46.9247	0.054413	0.037153	0.057187	0.029661	0.022115	0.000609	0.001178393	7.59E-06
175	46.95564	0.053814	0.036689	0.058223	0.030744	0.021511	0.000581	0.001170223	7.95E-06
176	46.95678	0.054446	0.036755	0.057591	0.030947	0.021383	0.000581	0.001162443	8.35E-06
177	46.93863	0.053657	0.037002	0.056401	0.030102	0.022509	0.000574	0.001150213	8.65E-06
178	46.96442	0.054165	0.037815	0.057277	0.029877	0.021218	0.000506	0.001161223	8.79E-06
179	46.96352	0.05411	0.037102	0.057373	0.02939	0.020589	0.00051	0.001167743	8.66E-06
180	46.97212	0.05438	0.036807	0.056995	0.029815	0.02082	0.000499	0.001174093	8.27E-06
181	47.0312	0.054092	0.037602	0.056811	0.030043	0.02222	0.000504	0.001173193	7.98E-06
182	47.05234	0.054461	0.03684	0.058562	0.030358	0.021264	0.000531	0.001161293	7.44E-06

183	47.03536	0.054173	0.036657	0.056348	0.029982	0.021926	0.000496	0.001139583	6.73E-06
184	47.09748	0.054781	0.037202	0.057924	0.030463	0.021754	0.000505	0.001123633	5.86E-06
185	47.08416	0.053879	0.03733	0.057114	0.028706	0.022367	0.000528	0.001139483	5.01E-06
186	47.11128	0.055058	0.037813	0.057787	0.029342	0.022593	0.000553	0.001124773	3.98E-06
187	47.10805	0.054223	0.03603	0.057379	0.029317	0.02162	0.000547	0.001135793	3.19E-06
188	47.11674	0.054496	0.036291	0.057437	0.029225	0.022033	0.000549	0.001144493	2.58E-06
189	47.13936	0.05507	0.036522	0.057456	0.030445	0.021434	0.000546	0.001120863	2.2E-06
190	47.12252	0.05424	0.035963	0.057044	0.030432	0.021408	0.00055	0.001118163	1.98E-06
191	47.13361	0.053667	0.036661	0.057321	0.030395	0.020899	0.000562	0.001136413	1.71E-06
192	47.11382	0.054398	0.037064	0.056989	0.029762	0.021723	0.000526	0.001151903	1.53E-06
193	47.13745	0.053995	0.036803	0.058098	0.029376	0.022368	0.000523	0.001136363	1.51E-06
194	47.17181	0.054274	0.03702	0.057661	0.029668	0.021703	0.000501	0.001154343	1.64E-06
195	47.12567	0.055017	0.037087	0.057178	0.028904	0.023228	0.000522	0.001134163	1.56E-06
196	47.12679	0.05489	0.036668	0.057143	0.030046	0.021441	0.000477	0.001158213	1.71E-06
197	47.1259	0.055713	0.036771	0.057869	0.030267	0.021177	0.000508	0.001125933	1.75E-06
198	47.09028	0.05383	0.036032	0.057529	0.029174	0.021441	0.000526	0.001140693	1.83E-06
199	47.1223	0.054436	0.037096	0.057909	0.030365	0.022433	0.000535	0.001127573	1.87E-06
200	47.1202	0.054909	0.037109	0.056924	0.029283	0.021134	0.000525	0.001124853	2.08E-06
201	47.14878	0.054515	0.036866	0.057475	0.030006	0.021563	0.000488	0.001110033	2.08E-06
202	47.17071	0.054532	0.036605	0.058026	0.030684	0.021015	0.000514	0.001100773	2.18E-06
203	47.1541	0.05304	0.036768	0.056603	0.030145	0.021796	0.000553	0.001123653	2.37E-06
204	47.12991	0.054223	0.036338	0.057688	0.030439	0.022035	0.000564	0.001119683	2.46E-06
205	47.14531	0.053591	0.038216	0.058114	0.029347	0.021268	0.000561	0.001128463	2.8E-06
206	47.19907	0.054646	0.03655	0.057987	0.029999	0.021566	0.000559	0.001122863	3.08E-06
207	47.21206	0.054616	0.038245	0.058993	0.030898	0.02086	0.000611	0.001104713	3.33E-06
208	47.20369	0.054353	0.037423	0.057783	0.030357	0.022422	0.000592	0.001061393	3.61E-06
209	47.26726	0.054584	0.036548	0.057581	0.030041	0.02155	0.000581	0.001080743	3.77E-06
210	47.25762	0.054942	0.038221	0.056595	0.031127	0.022246	0.000616	0.001043023	3.84E-06
211	47.26615	0.054244	0.036517	0.058339	0.030088	0.02279	0.000647	0.001027493	3.99E-06
212	47.21872	0.054028	0.03608	0.057767	0.030306	0.02152	0.000643	0.001039103	4.05E-06
213	47.22489	0.054887	0.036188	0.057638	0.029935	0.021755	0.0006	0.001018593	3.91E-06
214	47.24876	0.053818	0.036835	0.057783	0.029403	0.022202	0.000616	0.001025413	4.07E-06
215	47.2554	0.055489	0.036994	0.057738	0.030522	0.020868	0.000599	0.001014663	4.02E-06
216	47.26554	0.055439	0.035976	0.058091	0.030713	0.022866	0.000643	0.000991293	3.98E-06
217	47.21513	0.05424	0.036915	0.057388	0.029231	0.022583	0.000585	0.001023843	3.96E-06
218	47.22441	0.055606	0.037977	0.057387	0.029034	0.02128	0.000642	0.001034383	3.66E-06
219	47.21593	0.054333	0.036736	0.057395	0.030082	0.021563	0.000645	0.001036333	3.33E-06
220	47.21255	0.054584	0.037552	0.057113	0.030353	0.021258	0.000584	0.001059043	2.91E-06
221	47.24326	0.055121	0.038438	0.057064	0.029784	0.021636	0.000595	0.001058393	2.7E-06
222	47.24698	0.055065	0.037718	0.057841	0.029866	0.022165	0.000578	0.001028853	2.55E-06
223	47.29434	0.054189	0.037112	0.059076	0.029856	0.020656	0.000642	0.001023993	2.5E-06
224	47.25368	0.054582	0.036245	0.057455	0.030102	0.021008	0.000633	0.001030483	2.22E-06
225	47.2649	0.054176	0.038487	0.057614	0.029433	0.022144	0.000642	0.001028053	1.92E-06
226	47.22276	0.053392	0.036309	0.056608	0.030007	0.021807	0.000617	0.001077673	1.56E-06
227	47.20301	0.053975	0.03679	0.057202	0.029376	0.022048	0.000604	0.001087333	1.22E-06
228	47.21879	0.054583	0.037313	0.057681	0.029172	0.021592	0.000566	0.001096763	1.14E-06
229	47.1939	0.054759	0.036907	0.057721	0.029928	0.022271	0.000573	0.001081993	1.13E-06

230	47.20586	0.055576	0.036706	0.058065	0.030087	0.022192	0.000591	0.001064333	1.23E-06
231	47.20935	0.054129	0.03785	0.057261	0.030437	0.022379	0.000586	0.001064203	1.15E-06
232	47.19282	0.054623	0.037627	0.058345	0.029646	0.021728	0.000583	0.001071063	1.08E-06
233	47.16861	0.053675	0.037219	0.057423	0.029632	0.021763	0.00052	0.001082833	1.14E-06
234	47.17056	0.053886	0.037548	0.057533	0.028894	0.022432	0.0005	0.001073823	1.4E-06
235	47.21927	0.054792	0.037343	0.05717	0.030252	0.022476	0.000486	0.001072033	1.64E-06
236	47.17885	0.053883	0.037194	0.056903	0.028828	0.021656	0.000458	0.001068623	1.77E-06
237	47.20186	0.053981	0.037266	0.057455	0.030406	0.02233	0.000458	0.001048153	1.9E-06
238	47.25746	0.055204	0.037852	0.058718	0.030419	0.022041	0.000497	0.001009223	1.85E-06
239	47.25941	0.054453	0.036631	0.057356	0.028965	0.021234	0.000538	0.001038693	1.93E-06
240	47.26187	0.054995	0.037465	0.056216	0.029486	0.022198	0.00053	0.001061353	2.11E-06
241	47.24634	0.05426	0.036201	0.05791	0.029257	0.020966	0.000568	0.001095973	2.19E-06
242	47.23708	0.054424	0.036768	0.058255	0.029416	0.021435	0.000568	0.001112683	2.16E-06
243	47.22417	0.054808	0.036565	0.058788	0.029455	0.020371	0.000623	0.001109933	1.95E-06
244	47.26352	0.055063	0.037583	0.058177	0.030428	0.021739	0.000618	0.001082963	1.59E-06
245	47.29041	0.05447	0.037065	0.058331	0.029476	0.022953	0.000625	0.001080343	1.47E-06
246	47.2771	0.054217	0.036945	0.057004	0.030345	0.02091	0.000616	0.001070773	1.37E-06
247	47.30634	0.054035	0.035664	0.057825	0.029997	0.020819	0.000633	0.001101753	1.25E-06
248	47.32566	0.055154	0.03771	0.057984	0.029802	0.023045	0.000631	0.001107143	1.26E-06
249	47.2858	0.055273	0.036144	0.058895	0.030494	0.022095	0.000661	0.001064523	1.26E-06
250	47.30982	0.053972	0.037066	0.058816	0.029564	0.02164	0.000609	0.001057543	1.02E-06
251	47.32227	0.054053	0.036914	0.057049	0.029135	0.021936	0.000627	0.001052613	8.7E-07
252	47.33112	0.054059	0.037066	0.057653	0.029854	0.021636	0.000629	0.001052913	8.79E-07
253	47.37831	0.055312	0.037265	0.058387	0.029557	0.021555	0.000605	0.001032023	7.91E-07
254	47.35472	0.05357	0.035912	0.056727	0.030366	0.021883	0.000641	0.001077343	7.38E-07
255	47.33865	0.054347	0.037053	0.057498	0.030007	0.021572	0.000613	0.001095523	8.01E-07
256	47.34652	0.054864	0.037233	0.058384	0.030433	0.022878	0.00062	0.001051813	1.02E-06
257	47.32859	0.054019	0.037314	0.058441	0.030022	0.021744	0.000576	0.001019813	1.16E-06
258	47.32133	0.053909	0.036821	0.057606	0.029582	0.021859	0.000532	0.001058993	1.3E-06
259	47.29778	0.054401	0.037402	0.058289	0.029077	0.021466	0.000496	0.001081653	1.19E-06
260	47.24293	0.053973	0.036181	0.057162	0.029826	0.021746	0.000498	0.001103353	1.24E-06
261	47.25319	0.054984	0.0376	0.057685	0.030093	0.021762	0.000495	0.001072983	1.25E-06
262	47.24721	0.054505	0.037189	0.05714	0.029391	0.021456	0.00051	0.001078853	1.26E-06
263	47.1851	0.053199	0.036485	0.056875	0.029824	0.021512	0.000514	0.001120663	1.39E-06
264	47.14357	0.054932	0.036938	0.057533	0.030074	0.022265	0.000474	0.001087823	1.47E-06
265	47.18236	0.054538	0.037403	0.056456	0.029478	0.022318	0.000507	0.001090663	1.48E-06
266	47.19014	0.054791	0.03726	0.058027	0.030055	0.021515	0.000458	0.001112103	1.36E-06
267	47.16128	0.055042	0.037542	0.058103	0.0295	0.021585	0.000458	0.001109783	1.21E-06
268	47.20115	0.053681	0.03729	0.05912	0.029936	0.022066	0.000506	0.001086623	1.11E-06
269	47.18719	0.05359	0.036861	0.056498	0.02892	0.022183	0.000531	0.001112453	1.07E-06
270	47.17114	0.053891	0.0373	0.057009	0.029554	0.020759	0.000539	0.001116203	1.05E-06
271	47.24672	0.054324	0.037212	0.058047	0.029328	0.023287	0.000566	0.001115463	1.06E-06
272	47.23872	0.054444	0.037523	0.057664	0.029814	0.021492	0.000567	0.001102903	1.23E-06
273	47.26545	0.055244	0.037745	0.059316	0.030309	0.022842	0.000592	0.001027293	1.51E-06
274	47.30953	0.054419	0.0371	0.056551	0.029336	0.020997	0.000608	0.001060683	1.52E-06
275	47.3098	0.054362	0.037072	0.058649	0.029715	0.021279	0.0006	0.001051843	1.38E-06
276	47.2773	0.054428	0.035762	0.057719	0.029554	0.021295	0.000651	0.001080743	1.36E-06

277	47.28281	0.054644	0.037107	0.058967	0.030569	0.022888	0.000685	0.001056713	1.51E-06
278	47.27678	0.054097	0.037239	0.057892	0.02948	0.021699	0.000659	0.001073573	1.78E-06
279	47.28995	0.054933	0.038205	0.058835	0.029053	0.021547	0.000647	0.001028363	1.93E-06
280	47.32869	0.054177	0.037697	0.058091	0.029138	0.022547	0.000621	0.000996993	2E-06
281	47.39727	0.054108	0.037357	0.058777	0.030346	0.022651	0.000617	0.000986583	2.23E-06
282	47.31817	0.05393	0.036242	0.05734	0.029255	0.021264	0.000653	0.001015643	2.02E-06
283	47.28922	0.054409	0.037031	0.058038	0.030463	0.02135	0.000597	0.001057293	1.64E-06
284	47.28631	0.054512	0.037579	0.058593	0.029491	0.021971	0.000546	0.001019863	1.75E-06
285	47.30338	0.054932	0.036496	0.057112	0.029127	0.022568	0.000588	0.001028283	1.83E-06
286	47.30835	0.054923	0.035998	0.057828	0.029897	0.022299	0.000577	0.001006413	1.76E-06
287	47.34501	0.054114	0.03635	0.057838	0.031016	0.022744	0.000586	0.001027543	1.83E-06
288	47.34163	0.054653	0.036765	0.05748	0.028755	0.021562	0.000605	0.001039463	1.73E-06
289	47.35173	0.054398	0.037043	0.058021	0.028853	0.022671	0.000558	0.001055333	1.83E-06
290	47.31462	0.054244	0.036819	0.057756	0.029585	0.022259	0.000534	0.001065203	2.05E-06
291	47.32134	0.053789	0.037035	0.057934	0.029135	0.022075	0.000505	0.001097913	1.86E-06
292	47.32011	0.055414	0.037323	0.057817	0.030594	0.02211	0.00051	0.001045643	2.04E-06
293	47.3577	0.055195	0.037152	0.05696	0.029501	0.021923	0.000509	0.001051243	2.15E-06
294	47.36192	0.054784	0.036531	0.057826	0.029828	0.021566	0.000485	0.001067353	2.07E-06
295	47.37892	0.055383	0.037216	0.058794	0.029957	0.021615	0.000515	0.001040053	2E-06
296	47.36517	0.054401	0.036651	0.058213	0.029769	0.021413	0.000505	0.001045033	2.2E-06
297	47.34773	0.055122	0.037352	0.056765	0.029721	0.023298	0.000508	0.001043073	2E-06
298	47.37706	0.054739	0.037982	0.057632	0.030167	0.022407	0.000518	0.001005953	1.76E-06
299	47.35785	0.054434	0.03678	0.058254	0.029291	0.02166	0.000506	0.001011623	1.53E-06
300	47.37445	0.054864	0.036795	0.058714	0.030441	0.022051	0.000521	0.000989603	1.17E-06
301	47.34564	0.053073	0.036149	0.057098	0.029515	0.02158	0.000578	0.001015133	1.38E-06
302	47.34429	0.054783	0.036129	0.058671	0.029727	0.021947	0.000573	0.001035143	1.21E-06
303	47.32402	0.054759	0.037585	0.058522	0.030171	0.021535	0.000568	0.001016733	1.29E-06
304	47.34788	0.054408	0.037497	0.058182	0.029976	0.021928	0.000567	0.001002173	1.15E-06
305	47.34878	0.054055	0.036187	0.058462	0.030995	0.022601	0.000596	0.001008823	1E-06
306	47.29988	0.05424	0.03713	0.058272	0.029618	0.021872	0.000591	0.001001973	7.69E-07
307	47.3351	0.054864	0.037538	0.058327	0.029891	0.022176	0.000513	0.000996593	8.55E-07
308	47.35178	0.054236	0.037612	0.058327	0.029224	0.021768	0.000495	0.001014193	1.05E-06
309	47.35545	0.05486	0.037607	0.058128	0.030315	0.022383	0.000504	0.000985453	1.33E-06
310	47.35947	0.055258	0.037023	0.057112	0.03026	0.022417	0.000534	0.000993403	1.49E-06
311	47.29002	0.053939	0.036705	0.058285	0.028963	0.021635	0.000473	0.000972283	1.4E-06
312	47.30042	0.054308	0.035796	0.057491	0.02938	0.021792	0.000497	0.000997183	1.58E-06
313	47.28559	0.05421	0.036083	0.058098	0.029677	0.021446	0.000501	0.001027763	1.59E-06
314	47.29069	0.054849	0.036199	0.058077	0.030719	0.021778	0.000519	0.001031453	1.85E-06
315	47.31068	0.055046	0.037349	0.058314	0.030351	0.02311	0.000517	0.001012753	2.24E-06
316	47.34143	0.054374	0.036751	0.058764	0.030012	0.021672	0.000527	0.001008343	2.42E-06
317	47.34182	0.055506	0.036654	0.058105	0.030284	0.02184	0.000537	0.001012413	2.31E-06
318	47.33714	0.055212	0.037038	0.058493	0.028379	0.0232	0.000583	0.001000863	2.15E-06
319	47.34946	0.055344	0.037067	0.057959	0.030075	0.022518	0.000574	0.001004163	1.86E-06
320	47.35144	0.05516	0.037767	0.057869	0.030336	0.02234	0.000569	0.000990143	1.7E-06
321	47.36447	0.054492	0.037173	0.058033	0.029418	0.021317	0.000554	0.000981083	1.63E-06
322	47.41013	0.054603	0.036372	0.057978	0.029935	0.021238	0.000524	0.000967493	1.54E-06
323	47.44533	0.054278	0.038305	0.057787	0.030108	0.02201	0.00054	0.000937753	1.49E-06

324	47.45469	0.053946	0.037122	0.058273	0.030358	0.020764	0.000559	0.000949343	1.21E-06
325	47.43191	0.054482	0.036356	0.057345	0.030373	0.02069	0.000586	0.000998583	8.53E-07
326	47.37575	0.054719	0.036286	0.05804	0.029112	0.022783	0.000596	0.001004913	7.71E-07
327	47.3431	0.054336	0.03626	0.05783	0.029773	0.022451	0.000592	0.001022303	9.04E-07
328	47.32743	0.054416	0.03692	0.05705	0.030243	0.022213	0.000529	0.001037103	9.55E-07
329	47.31369	0.055713	0.036471	0.057656	0.030404	0.021937	0.000546	0.001044923	9.45E-07
330	47.29757	0.054626	0.036312	0.058725	0.030491	0.022401	0.000554	0.001054093	1.08E-06
331	47.22537	0.054142	0.037079	0.057357	0.029944	0.02192	0.000548	0.001054003	1.32E-06
332	47.25633	0.056101	0.038296	0.058279	0.030866	0.021994	0.00063	0.000999903	1.45E-06
333	47.29097	0.054958	0.037266	0.05822	0.030347	0.022924	0.000617	0.000987633	1.53E-06
334	47.2998	0.054587	0.036919	0.058593	0.029872	0.021267	0.000597	0.000979883	1.64E-06
335	47.31877	0.054492	0.037598	0.058877	0.030624	0.022001	0.000573	0.000936423	1.68E-06
336	47.2749	0.053678	0.03639	0.056657	0.030787	0.020639	0.000626	0.000964313	1.65E-06
337	47.29145	0.053819	0.037132	0.058022	0.029519	0.021797	0.000631	0.000967923	1.48E-06
338	47.31167	0.055136	0.03667	0.058623	0.029495	0.021861	0.000639	0.000958493	1.43E-06
339	47.38731	0.054691	0.037413	0.059741	0.030978	0.021829	0.000658	0.000933783	1.54E-06
340	47.39719	0.055191	0.036369	0.058181	0.029634	0.022086	0.00066	0.000944723	1.4E-06
341	47.384	0.053783	0.036659	0.057598	0.030428	0.021736	0.000665	0.000947103	1.3E-06
342	47.4343	0.054875	0.037297	0.057585	0.030096	0.022793	0.000608	0.000976003	1.14E-06
343	47.38939	0.054951	0.036754	0.057786	0.029569	0.022881	0.000613	0.000993743	9.2E-07
344	47.36832	0.054899	0.037806	0.057678	0.030379	0.022439	0.000628	0.000974113	8.86E-07
345	47.35314	0.054567	0.036485	0.058332	0.029762	0.021797	0.000613	0.001000603	8.4E-07
346	47.34276	0.055047	0.036818	0.0575	0.02961	0.021805	0.000518	0.000974313	8E-07
347	47.42014	0.055577	0.037579	0.058373	0.02979	0.021733	0.000517	0.000946683	8E-07
348	47.40512	0.054158	0.036801	0.057859	0.029842	0.020994	0.000539	0.000967993	8.99E-07
349	47.35454	0.053705	0.036656	0.057986	0.030238	0.022561	0.000464	0.001003053	9.58E-07
350	47.32473	0.05499	0.037422	0.057714	0.030413	0.021927	0.000457	0.000993003	1.03E-06
351	47.31569	0.054486	0.036574	0.058035	0.030304	0.020982	0.000456	0.000991233	8.28E-07
352	47.28918	0.053942	0.036371	0.057349	0.029448	0.021841	0.000475	0.001028183	7.26E-07
353	47.25164	0.054673	0.037167	0.057661	0.029858	0.022547	0.00046	0.001028533	8.1E-07
354	47.24258	0.054282	0.037318	0.057947	0.030202	0.02101	0.000444	0.001052953	8.78E-07
355	47.23529	0.054257	0.037758	0.058353	0.0304	0.021342	0.000461	0.001041283	1.07E-06
356	47.26249	0.055099	0.037652	0.058164	0.030356	0.022481	0.000472	0.001011563	1.3E-06
357	47.29025	0.054744	0.037573	0.058705	0.030255	0.022566	0.000466	0.001003653	1.51E-06
358	47.27089	0.054551	0.037254	0.058233	0.028798	0.023111	0.000513	0.000980723	1.48E-06
359	47.29549	0.054942	0.03594	0.057502	0.030739	0.022483	0.000537	0.000976123	1.29E-06
360	47.38114	0.054658	0.038092	0.057513	0.028891	0.021338	0.000576	0.000995863	1.27E-06
361	47.39674	0.054972	0.036851	0.058792	0.030521	0.022178	0.000578	0.000966533	1.29E-06
362	47.40687	0.055246	0.037619	0.058045	0.029688	0.022755	0.000549	0.000922513	1.26E-06
363	47.48613	0.055392	0.036554	0.059134	0.029421	0.022762	0.000593	0.000908943	1.18E-06
364	47.52693	0.055628	0.037707	0.05832	0.029933	0.021919	0.000575	0.000881463	1.12E-06
365	47.55239	0.054955	0.037356	0.058517	0.029589	0.022505	0.000532	0.000873343	1.13E-06
366	47.50517	0.054666	0.036562	0.057474	0.029898	0.021355	0.000566	0.000911313	1.05E-06
367	47.46454	0.05444	0.037286	0.057975	0.028673	0.021916	0.000578	0.000946843	8.32E-07
368	47.41961	0.054135	0.036083	0.05787	0.030241	0.022075	0.000582	0.000962273	7.54E-07
369	47.38939	0.05383	0.037106	0.057446	0.02995	0.021849	0.000566	0.000976523	7.92E-07
370	47.43368	0.055451	0.036557	0.058379	0.029512	0.021447	0.000532	0.000967983	9.52E-07

371	47.39671	0.054884	0.036958	0.057659	0.030466	0.021062	0.000544	0.000990833	1.1E-06
372	47.39391	0.055233	0.037712	0.057574	0.030881	0.021167	0.00057	0.000998693	1.4E-06
373	47.40239	0.055087	0.037331	0.057547	0.030556	0.021683	0.000515	0.001009283	1.64E-06
374	47.37518	0.055284	0.036688	0.057725	0.029518	0.022976	0.000527	0.001022443	1.69E-06
375	47.38667	0.056151	0.037696	0.05882	0.029725	0.022207	0.000571	0.001005673	1.56E-06
376	47.38791	0.054833	0.03776	0.05823	0.029781	0.021849	0.000571	0.000980693	1.45E-06
377	47.41739	0.055314	0.037269	0.057204	0.029503	0.021002	0.000561	0.000980673	1.55E-06
378	47.43494	0.054326	0.037422	0.058085	0.030063	0.021468	0.000528	0.000971073	1.54E-06
379	47.45734	0.053912	0.036771	0.05867	0.02956	0.021212	0.000543	0.000971633	1.7E-06
380	47.49171	0.054576	0.037891	0.057667	0.030265	0.021495	0.000533	0.000966153	1.82E-06
381	47.43701	0.054924	0.036854	0.057563	0.029769	0.021846	0.000527	0.000966883	1.97E-06
382	47.45002	0.054889	0.036954	0.058174	0.029509	0.022454	0.000503	0.000972753	2.09E-06
383	47.4572	0.055107	0.036923	0.058497	0.029007	0.022313	0.000506	0.000976323	2.33E-06
384	47.48104	0.055138	0.036685	0.058853	0.030743	0.022885	0.000535	0.000955193	2.56E-06
385	47.45633	0.054234	0.036405	0.05762	0.029827	0.021426	0.000507	0.001006063	2.76E-06
386	47.42619	0.054165	0.036845	0.058481	0.030871	0.022149	0.000528	0.001005483	3.08E-06
387	47.40126	0.053764	0.036828	0.057008	0.029988	0.021244	0.000527	0.001020083	3.33E-06
388	47.42225	0.054916	0.037458	0.058482	0.030384	0.021111	0.000543	0.001010213	3.77E-06
389	47.41364	0.054901	0.036484	0.058355	0.029594	0.02108	0.000536	0.001007323	3.86E-06
390	47.44283	0.055188	0.036937	0.058773	0.030102	0.021483	0.000514	0.001001433	3.94E-06
391	47.42454	0.054679	0.036866	0.057474	0.029545	0.021386	0.00052	0.001011493	3.87E-06
392	47.4289	0.054324	0.038126	0.057454	0.030956	0.021058	0.00058	0.001012113	3.72E-06
393	47.38659	0.054042	0.037327	0.057899	0.02968	0.021384	0.000551	0.001027263	3.48E-06
394	47.32517	0.054667	0.036133	0.057287	0.029732	0.021662	0.000494	0.001075493	3.52E-06
395	47.27259	0.054494	0.036664	0.057571	0.029964	0.020987	0.000492	0.001073813	3.6E-06
396	47.2856	0.054639	0.036952	0.057992	0.029014	0.021571	0.000462	0.001097243	3.44E-06
397	47.28116	0.05469	0.037306	0.057129	0.030673	0.021971	0.000466	0.001067873	3.23E-06
398	47.25845	0.053631	0.037767	0.056848	0.029421	0.020609	0.000518	0.001108623	2.84E-06
399	47.25927	0.05446	0.036915	0.058579	0.030199	0.022208	0.00053	0.001089153	2.67E-06
400	47.29209	0.053863	0.037426	0.058597	0.030297	0.021171	0.00052	0.001100443	2.29E-06
401	47.28432	0.054885	0.037556	0.057924	0.029443	0.022274	0.000542	0.001079123	2.06E-06
402	47.24642	0.054256	0.037384	0.05786	0.029156	0.021915	0.000506	0.001092593	1.93E-06
403	47.27068	0.054408	0.037533	0.057732	0.029846	0.0217	0.000505	0.001083723	1.7E-06
404	47.30828	0.055265	0.038379	0.057825	0.030582	0.021878	0.000527	0.001039243	1.28E-06
405	47.3634	0.054932	0.037767	0.058153	0.029428	0.021948	0.000515	0.001013763	9.48E-07
406	47.40264	0.05542	0.037842	0.057446	0.029973	0.021907	0.000512	0.000989563	7.57E-07
407	47.40899	0.054443	0.037074	0.05831	0.030704	0.020302	0.000545	0.000998923	7.78E-07
408	47.41658	0.054153	0.036714	0.058054	0.029559	0.021889	0.000491	0.000977993	7.95E-07
409	47.43224	0.054283	0.037884	0.05746	0.030004	0.021024	0.000487	0.000995053	7.61E-07
410	47.41313	0.053124	0.036948	0.058258	0.030712	0.021951	0.00052	0.000998663	8.67E-07
411	47.39428	0.054211	0.036623	0.058161	0.029591	0.021777	0.000526	0.001015853	8.1E-07
412	47.37205	0.054339	0.037087	0.058121	0.030143	0.021963	0.000513	0.001005033	8.53E-07
413	47.43628	0.054566	0.037152	0.05756	0.030131	0.021558	0.000516	0.001007553	9.23E-07
414	47.42974	0.055443	0.037107	0.057506	0.02975	0.022198	0.000502	0.001026803	1.16E-06
415	47.40864	0.054445	0.0361	0.057465	0.029542	0.021853	0.000512	0.001055033	1.27E-06
416	47.44457	0.055612	0.037828	0.057848	0.03144	0.022402	0.000561	0.001029613	1.52E-06
417	47.39131	0.054425	0.036553	0.057875	0.030262	0.021256	0.000513	0.001034233	1.69E-06

418	47.35299	0.054112	0.035793	0.05767	0.029653	0.021976	0.000534	0.001045883	1.8E-06
419	47.33062	0.054579	0.037744	0.057513	0.030494	0.021846	0.00051	0.001030673	1.88E-06
420	47.37238	0.054886	0.036804	0.059135	0.028834	0.022368	0.000541	0.001020333	2.06E-06
421	47.32991	0.053909	0.036592	0.057192	0.028972	0.02121	0.000581	0.001045213	2.25E-06
422	47.33447	0.05509	0.036943	0.057625	0.030822	0.022295	0.000594	0.001033993	2.13E-06
423	47.34782	0.054617	0.037244	0.057952	0.029949	0.022113	0.000592	0.001024913	2.15E-06
424	47.35498	0.054655	0.037314	0.05836	0.030639	0.021048	0.000605	0.001024793	1.98E-06
425	47.36083	0.054687	0.038156	0.057696	0.030078	0.021923	0.000606	0.000993443	1.88E-06
426	47.36618	0.053896	0.037744	0.057543	0.030028	0.020815	0.000572	0.001044483	1.74E-06
427	47.32241	0.053747	0.03725	0.058265	0.030447	0.021794	0.000581	0.001033163	1.59E-06
428	47.34051	0.054886	0.037214	0.057742	0.029568	0.022001	0.000543	0.001011093	1.59E-06
429	47.35423	0.054741	0.037288	0.057219	0.029853	0.021316	0.000543	0.001028683	1.59E-06
430	47.38645	0.055505	0.037981	0.057733	0.029759	0.022283	0.000499	0.001016343	1.49E-06
431	47.37904	0.054793	0.036625	0.058027	0.029934	0.021971	0.000448	0.000981593	1.43E-06
432	47.42273	0.054284	0.037039	0.057637	0.029411	0.021782	0.00043	0.001007813	1.5E-06
433	47.41484	0.054153	0.037791	0.057554	0.030575	0.021071	0.00045	0.001015123	1.55E-06
434	47.41584	0.054389	0.036673	0.057927	0.030101	0.021963	0.000433	0.001024753	1.69E-06
435	47.3857	0.054391	0.037267	0.05739	0.029949	0.021016	0.000428	0.001050023	1.91E-06
436	47.36022	0.054057	0.037081	0.056945	0.029875	0.021616	0.000419	0.001054543	1.96E-06
437	47.38866	0.053809	0.03775	0.057459	0.030481	0.021421	0.000413	0.001060373	1.93E-06
438	47.3408	0.054727	0.037533	0.057929	0.029849	0.021282	0.000409	0.001061283	1.87E-06
439	47.34936	0.055322	0.037348	0.058402	0.029907	0.02215	0.000439	0.001034163	2.08E-06