

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAŠA JAZBEC

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAŠA JAZBEC

**UGOTAVLJANJE VPLIVA FIZIKALNO-KEMIJSKIH LASTNOSTI SMUKCA IZ
RAZLIČNIH VIROV NA RAZTAPLJANJE DOBRO VODOTOPNE MODELNE
ZDRAVILNE UČINKOVINE**

**DETERMINATION OF THE IMPACT OF THE PHYSICO-CHEMICAL
PROPERTIES OF TALC FROM VARIOUS SOURCES ON THE DISSOLUTION OF
GOOD WATER SOLUBLE MODEL DRUG**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala v farmacevtski družbi Lek, d. d., Ljubljana, na oddelku za Farmaceutsko tehnologijo pod delovnim mentorstvom dr. Mateje Novak Štagoj, mag. farm. in v laboratorijih Fakultete za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Odonu Planinška, mag. farm.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici dr. Mateji Novak Štagoj, mag. farm. za inspiracijo, motivacijo in strokovno vodenje pri načrtovanju in izdelavi eksperimentalnega dela. Zahvalila bi se tudi prof. dr. Odonu Planinšku za hitro pomoč v ključnih trenutkih, vse deljene nasvete in strokovno vodenje pri izdelavi magistrske naloge.

Zahvaljujem se tudi Skupini FT2 in ostalim raziskovalcem in tehnikom v Razvojnem centru Slovenija za ponujeno priložnost, vso deljeno znanje in prijetno vzdušje tako v laboratorijih kot v proizvodnji, ter asistentki Tatjani za hitro in učinkovito pomoč pri zaključnih eksperimentih.

Hvala tudi moji družini, fantu Primožu, sošolkam in prijateljicam/-em za čudovita študentska leta, neizmerno vero v moje sposobnosti in vso izkazano podporo pri študiju.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Odonu Planinška, mag. farm. in somentorstvom dr. Mateje Novak Štagoj, mag. farm.

Maša Jazbec

Ljubljana, 2016

STVARNO KAZALO

1.	UVOD	1
1.1.	SMUKEC.....	1
1.1.1.	FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI SMUKCA.....	2
1.1.2.	UPORABA SMUKCA	6
1.1.3.	POJAVNOST/RAZŠIRJENOST SMUKCA.....	7
1.1.4.	PRIDOBIVANJE IN OBDELAVA SMUKCA.....	10
1.2.	SPROŠČANJE UČINKOVINE IZ TRDNE FARMACEVTSKE OBLIKE S TAKOJŠNJIM SPROŠČANJEM.....	12
2.	NAMEN DELA IN NAČRT ZA DELO.....	14
3.	MATERIALI.....	16
3.1.	APARATURE IN PRIBOR.....	16
3.2.	PREISKOVANE SPOJINE	17
3.2.1.	MODELNA UČINKOVINA	17
3.2.2.	MODELNA FORMULACIJA / REFERENČNO ORIGINATORSKO ZDRAVILO (RLD)	17
3.2.3.	SMUKCI.....	18
3.2.4.	PRIPRAVLJENE ZMESI.....	18
3.2.5.	REFERENČNE FORMULACIJE/ORIGINATORSKA ZDRAVILA (RLD)	19
3.2.6.	ZMESI IZ RAZVOJNIH SERIJ	19
3.3.	SNOVI, UPORABLJENE PRI DELU	19
3.3.1.	SPOJINE ZA PRIPRAVO RAZTOPIN IN IZVEDBO MERITEV	19
3.3.2.	TOPILA	19
3.3.3.	OSTALI REAGENTI IN MATERIALI	19
3.4.	RAZTOPINE	20
3.5.	METODE IN ANALITSKI POSTOPKI.....	22
3.5.1.	Priprava zmesi z modelno učinkovino in polnjenje kapsul.....	22
3.5.2.	Izolacija smukca.....	22
3.5.3.	Testi sproščanja.....	23
3.5.4.	Analiza velikostne porazdelitve delcev - PSD.....	26
3.5.5.	Merjenje specifične površine z metodo BET	28

3.5.6.	Merjenje izgube vlage pri sušenju - IPS	30
3.5.7.	Pregled vzorcev z vrstičnim elektronskim mikroskopom SEM	31
3.5.8.	Sejalna analiza.....	31
3.5.9.	Nasipni in zbiti volumen/gostota	33
3.5.10.	Stisljivost in pretočnost	34
3.5.11.	Pregled vzorcev z optičnim mikroskopom s polarizirano svetlobo.....	34
3.5.12.	Analiza vzorcev z Ramanskim spektrometrom	35
3.5.13.	Analiza infrardečega spektra	37
4.	REZULTATI IN RAZPRAVA	40
4.1.	Utemeljitev izbire metod in eksperimentalnega dela.....	40
4.2.	Testi sproščanja	41
4.3.	Analiza velikostne porazdelitve delcev - PSD.....	42
4.4.	Merjenje specifične površine z metodo BET.....	44
4.5.	Merjenje izgube vlage pri sušenju – IPS	45
4.6.	Pregled vzorcev z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM).....	46
4.7.	Sejalna analiza	47
4.8.	Nasipni in zbiti volumen.....	50
4.9.	Pregled vzorcev z optičnim mikroskopom s polarizirano svetlobo.....	51
4.10.	Analiza vzorcev z Ramanskim spektrofotometrom.....	52
4.11.	Analiza infrardečega spektra	55
4.11.1.	Analiza MID – IR spektra.....	55
4.11.2.	Analiza spektra NIR.....	56
5.	ZAKLJUČEK.....	58
6.	VIRI	60
7.	PRILOGA	64

KAZALO SLIK

Slika 1: Kemijska struktura smukca.....	2
Slika 2: 3D kristalna oblika smukca (10).....	2
Slika 3: Shema procesa pridobivanja in predelave smukca	11
Slika 4: Potek dela.....	15
Slika 5: Posoda za raztapljanje aparature 1 po USP (s košaricami).....	23
Slika 6: HPLC naprava.....	23
Slika 7: Metoda 3 vrednosti na x-osi.....	26
Slika 8: Princip adsorpcije in desorpcije molekul plina na preiskovani vzorec (34)	29
Slika 9: Shematski prikaz SEM naprave	31
Slika 10: Elektromagnetni spekter	38
Slika 11: Profili sproščanja modelne zdravilne učinkovine iz kapsul s pripravljenimi zmesmi.	41
Slika 12: Velikosti delcev različnih vzorcev smukca.....	43
Slika 13: Primerjava rezultatov meritev PSD samostojno za smukec in zmes	43
Slika 14: Zaostanki vzorcev smukca na posameznih sitih po končani sejalni analizi.....	48
Slika 15: Zaostanki zmesi na posameznih sitih pri sejalni analizi	49
Slika 16: Pregled delcev in agregatov v zmesi 001X-M (200x povečava)	52
Slika 17: Skupki v zmesi 002X-M (povečana slika 50x povečava).....	52
Slika 18: Skupki v zmesi 003X-M (povečana slika 50x povečava).....	52
Slika 19: Pregled delcev in agregatov v zmesi 004X-M (50x povečava)	52
Slika 20: Pregled delcev učinkovine (50x povečava)	52
Slika 21: Referenca 13K0008P (50x povečava).....	52
Slika 22: Primerjalni ramanski spektri različnih smukcev	53
Slika 23: Ramanski spekter smukca S289/13 proizvajalca Luzenac, reference 12H0006P in zmesi 001X-X in 004X-M.....	53
Slika 24: Pointmap zmesi 001X-M (črno=smukec, modro=učinkovina).....	54
Slika 25: Pointmap zmesi 004X-M (črno=smukec, modro=učinkovina).....	54
Slika 26: Pointmap zmesi TEH 2 (črno=smukec, modro=učinkovina).....	54
Slika 27: MID-IR spekter vseh smukcev	56
Slika 28: Primerjalni MID-IR spekter pripravljenih zmesi, RLD zmesi in TEH 2.....	56
Slika 29: Primerjalni NIR spekter vseh vzorcev smukca	57
Slika 30: NIR spekter pripravljenih zmesi (001X-M, 002X-M, 003X-M in 004X-M) ter zmesi referenčnih originatorskih zdravil	57

Slika 31: Pojavnost smukca v S Evropi (13).....	64
Slika 32: Pojavnost smukca v Evropi (13).....	64
Slika 33: Pojavnost smukca na Kitajskem (13).....	64
Slika 34: Pojavnost smukca v S Ameriki (13)	64
Slika 35: Primerjalni graf specifičnih površin smukca različnih vzorcev smukca.....	64
Slika 36: Grafični prikaz izgube vlage pri izpostavitvi vzorcev smukca sušenju	65
Slika 37:PFK1178P (Imifabi Talc 3355 Dense).....	65
Slika 38:PFK1114P (Imifabi Talc 3355 Dense).....	65
Slika 39:PFK1010P (Imifabi Talc 3355 Dense).....	65
Slika 40: PFJ1097O (Imifabi Talc 3355)	65
Slika 41:PFJ1244O (Imifabi Talc 3355)	66
Slika 42:P PFJ1290O (Imifabi Talc 3355).....	66
Slika 43: 1500667 (Microtalc Pharma 30)	66
Slika 44: 1500409 (Microtalc Pharma 50)	66
Slika 45: S289/13 (Luzenac, Luzenac Pharma)	66
Slika 46: Luzenac, Intalc 60 LA Pharma	66
Slika 47: Modelna učinkovina.....	67
Slika 48: Modelna učinkovina obložena s smukcem	67
Slika 49: Nasipne in zbite gostote smukcev	67
Slika 50: PFJ1244O, Imifabi, Talc 3355 (50x povečava)	71
Slika 51: PFJ1097O, Imifabi, Talc 3355 (50x povečava)	71
Slika 52: PFJ1290O, Imifabi Talc 3355 (50x povečava)	71
Slika 53: PFK1010P, Imifabi Talc 3355 Dense (50x povečava).....	71
Slika 54: PFK1114P, Imifabi Talc 3355 Dense (50x povečava).....	71
Slika 55: PFK1178P, Imifabi Talc 3355 Dense (50x povečava).....	71
Slika 56: S289/13, Luzenac, Luzenac Pharma (50x povečava)	72
Slika 57: 1500409, Mondo, Microtalc Pharma 50 (50x povečava).....	72
Slika 58: 1500667, Mondo, Microtalc 30 (50x povečava).....	72
Slika 59: Ramanski spekter smukca S289/13 (rdeč) v območju 1200 - 1350 cm ⁻¹ primerjan z referenčnim spektrom smukca (moder) iz knjižnice spektrov (programska oprema Spectral ID).....	73
Slika 60: MID-IR spekter modelne učinkovine	73
Slika 61:NIR spekter Mondo Microtalc Pharma 50, 1500409	74
Slika 62: NIR spekter Mondo Microtalc Pharma 30, 1500667	74

Slika 63: NIR spekter Imifabi Talc 3355, PFJ1290O	74
Slika 64: NIR spekter Imifabi Talc 3355, PFJ2440O	75
Slika 65: NIR spekter Imifabi Talc 3355 Dense, PFK1010P.....	75
Slika 66: NIR spekter Imifabi Talc 3355 Dense, PFK1114P.....	75
Slika 67: NIR spekter Imifabi Talc 3355 Dense, PFK1178P.....	76
Slika 68: NIR spekter Luzenac, Luzenac Pharma, S289/13.....	76
Slika 69: NIR spekter Mondo, Microtalc Pharma 50, 1500409.....	76
Slika 70: NIR spekter Mondo, Microtalc Pharma 30, 1500667.....	77
Slika 71: Primerjava NIR spektrov smukcev Microtalc Pharma 30 in Microtalc Pharma 50, ne izkazuje nobenih razlik.....	77
Slika 72: Primerjava NIR spektrov Imifabi Talc 3355 Dense.....	77
Slika 73: Primerjava NIR spektrov smukcev Imifabi Talc 3355	78
Slika 74: NIR spekter modelne učinkovine.....	78
Slika 75: NIR spekter smukcev, ki so vstopali v pripravljene zmesi (PFJ1290O, PFK1114P, 1500409 in S289/13).....	78
Slika 76: NIR spektri pripravljenih zmesi in modelne učinkovine	79
Slika 77: NIR spektri pripravljenih zmesi in zmesi referenčnih originatorskih zdravil.....	79
Slika 78: NIR spektri pripravljenih zmesi in RLD 12H0006P (modro).....	79
Slika 79: Informativna PCA analiza smukcev, s katerimi smo pripravili zmesi 001X-M, 002X-M, 003X-M in 004X-M	80
Slika 80: Informativna PCA analiza vseh vzorcev.....	80
Slika 81: Informativna PCA analiza vzorcev smukca.....	80
Slika 82: Informativna PCA analiza pripravljenih zmesi (desno) in zmesi RLD (levo).....	80
Slika 83: Umeritvena premica 1.....	82
Slika 84: Umeritvena premica 2.....	82
Slika 85: Profil sproščanja za zmes 001X-M (0,05M K-fosfatni pufer, pH = 6,8).....	88
Slika 86: Profil sproščanja za zmes 002X-M (0,05M K-fosfatni pufer, pH = 6,8).....	89
Slika 87: Profil sproščanja za zmes 003X-M (0,05M K-fosfatni pufer, pH = 6,8).....	89
Slika 88: Profil sproščanja za zmes 004X-M (0,05M K-fosfatni pufer, pH = 6,8).....	89

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Fizikalno – kemijske lastnosti smukca (7).....	1
Preglednica II: Farmakopejski kriteriji za ustreznost posameznih vzorcev smukca (5, 6)	5
Preglednica III: Pregled proizvajalcev in rudnikov po celinah	8
Preglednica IV: Vhodne surovine za pripravo zmesi za kapsuliranje	18
Preglednica V: Sestava za pripravo zmesi in kosovnica za ročno kapsuliranje	22
Preglednica VI: Parametri procesa raztapljanja kapsul	23
Preglednica VII: Vzorci in redčitve za pripravo umeritvene premice 1	24
Preglednica VIII: Vzorci in redčitve za pripravo umeritvene premice 2	25
Preglednica IX: HPLC parametri	26
Preglednica X: Parametri meritev PSD	27
Preglednica XI: Parametri BET meritev	29
Preglednica XII: Parametri IPS meritev	30
Preglednica XIII: Parametri sejalnih analiz.....	32
Preglednica XIV: Parametri meritev zbitega volumna.....	34
Preglednica XV: Parametri Ramanske meritev	36
Preglednica XVI: Oznake in vrste vzorcev	40
Preglednica XVII: Sestava pripravljenih zmesi	41
Preglednica XVIII: Rezultati PSD analiz smukcev.....	42
Preglednica XIX: Rezultati analize PSD referenčnih originatorskih zdravil	43
Preglednica XX: Rezultati merjenja specifične površine na vzorcih smukca	44
Preglednica XXI: Primerjalni rezultati specifične površine izoliranega smukca RLD in smukca ustrezne serije	44
Preglednica XXII: Vsebnost vlage v vzorcih smukca.....	46
Preglednica XXIII: Povzetek rezultatov sejalne analize smukcev	48
Preglednica XXIV: Rezultati testov nasipnega in zbitega volumna smukcev s preračuni (HR – Hausnerjevo razmerje, CI – Carrov indeks).....	50
Preglednica XXV: Rezultati testov nasipnega in zbitega volumna zmesi s preračuni	50
Preglednica XXVI: Kritični parametri smukca	59
Preglednica XXVII: Povzetek rezultatov sejalnih analiz zmesi	67
Preglednica XXVIII: Rezultati sejalnih analiz smukcev	68
Preglednica XXIX: Rezultati sejalnih analiz pripravljenih zmesi	70
Preglednica XXX: Preverjanje ustreznosti kromatografskega sistema 1	80

Preglednica XXXI: Rezultati umeritvene premice 1	81
Preglednica XXXII: Preverjanje ustreznosti HPLC sistema 2	81
Preglednica XXXIII: Rezultati umeritvene premice 2	81
Preglednica XXXIV: »Raw data« rezultati HPLC analiz disolucijskih vzorcev	83
Preglednica XXXV: Rezultati testov sproščanja za vzorec 001X-M.....	86
Preglednica XXXVI: Rezultati testov sproščanja za vzorec 002X-M	87
Preglednica XXXVII: Rezultati testov sproščanja za vzorec 003X-M.....	87
Preglednica XXXVIII: Rezultati testov sproščanja za vzorec 004X-M.....	88

KAZALO ENAČB

Enačba 1: Izpeljava enačbe za preračun vsebnosti iz umeritvene premice	25
Enačba 2: Enačba za izračun srednje vrednosti za površino delcev.....	26
Enačba 3: BET enačba	28
Enačba 4: Enačba za preračun nasipne gostote [g/mL].....	33
Enačba 5: Enačba za preračun nasipnega volumna [mL/g]	33
Enačba 6: Enačba za preračun zbite gostote [g/mL]	33
Enačba 7: Enačba za preračun zbitega volumna [mL/g].....	33
Enačba 8: Enačba za preračun indeksa stisljivosti	34
Enačba 9: Enačba za preračun Hausnerjevega razmerja	34

POVZETEK

Smuvec je v farmaciji pogosto zastopana pomožna snov. Do sedaj je bil poznan kot inertna sestavina, ki ne vpliva na lastnosti farmacevtske oblike. Vendar pa se je v praksi izkazalo drugače, zato smo se odločili, da bomo ovrednotili lastnosti smukca, ki bi lahko prispevale k sproščanju dobro topne modelne učinkovine iz končne farmacevtske oblike, kapsule.

V sklopu eksperimentalnega dela smo se v začetku osredotočili na pregled rudnikov in svetovnega trga smukca. V nadaljevanju smo izbrali smukce, ki so medsebojno najbolj izstopali glede na določene parametre, s čimer smo lahko okarakterizirali kritične lastnosti, ki so vplivale na raztapljanje dobro topne modelne učinkovine. Za vrednotenje fizikalno-kemijskih lastnosti vzorcev smukca smo uporabili metodo sejalne analize, metodo nasipnega in zbitega volumna, vrstični elektronski mikroskop (SEM) in svetlobni mikroskop, PSD (porazdelitev velikosti delcev s pomočjo sipanja laserske svetlobe), BET (specifična površina), Ramansko spektroskopijo ter MID-IR (infrardeč spekter v srednjem spektralnem območju) in NIR (infrardeč spekter v bližnjem spektralnem območju) spektroskopijo. Po izvedenih vseh analizah smo izbrali štiri vzorce, ki so se medsebojno najbolj razlikovali in z njimi pripravili zmesi, ki smo jih polnili v končne farmacevtske oblike, kapsule. Te vzorce smo nato ovrednotili s testi raztapljanja in ugotavljali katere fizikalno kemijske lastnosti smukca so se izkazale za najbolj kritične pri sproščanju dobro topne učinkovine iz kapsul. Najbolj reprezentativne metode za razlikovanje med vzorci in za določanje kritičnih parametrov so se izkazale PSD, BET in Ramanska spektroskopija. Ugotovili smo, da na hitrost raztapljanja dobro topne modelne učinkovine iz končne farmacevtske oblike vplivajo predvsem površinske lastnosti smukca, ki pogojujejo interakcijo z modelno učinkovino. V nadaljevanju bi bilo smiselno z istimi metodami ovrednotiti še dodatne vzorce smukca drugih proizvajalcev. Poleg tega bi bilo smiselno ovrednotiti smukce s pomočjo inverzne plinske kromatografije in s tem dodatno okarakterizirati površinske lastnosti, ki bi lahko vplivale na interakcijo z delci modelne učinkovine.

ABSTRACT

Talc is a widely represented pharmaceutical excipient. Until now it was known as an inert ingredient which does not affect the properties of the pharmaceutical formulation; however, the results in practice turned out differently, therefore we decided to evaluate certain properties of talc which could contribute most to the release of good soluble model drug from the final dosage form, the capsule. As part of the experimental work we first focused on the review of the mines and the global market of talc. Secondly we chose a certain number of talc samples which were prominent for evaluation of dissolution of good-soluble drug according to certain parameters and with those we were able to characterize the critical features that had influence on the dissolution of good-soluble model substance. For the evaluation of the physico-chemical properties of talc samples we used sieve analysis, bulk and tapped density, scanning electron microscope (SEM), optical microscope with polarized light, PSD (particle size diffraction by using the scattering of laser light), BET (specific surface area), Raman spectroscopy, MID-IR (infrared spectrum in the medium spectral range) and NIR (infrared spectrum in the proximate spectral range). After completing all of the analyzes, we determined four samples that varied the most and with those samples we prepared mixtures, which we filled into the final dosage forms, the capsules. With the dissolution tests we then evaluated these final formulation and identified the physico-chemical properties of talc which proved to be the most critical in release of good soluble model substance from the capsules.

The most representative methods to distinguish between samples and to determine the critical parameters were the following methods: PSD, BET and Raman spectroscopy. We concluded that surface properties of talc are the main characteristics that have influence on the dissolution of model drug from finished dosage form. In future it would be reasonable to evaluate additional samples of talc from other manufacturers with same analytical procedures. In addition, evaluation of the samples using inverse gas chromatography would be suitable method to evaluate talc by using inverse gas chromatography and to further characterize surface properties that could affect the interaction of the particles with a model substance.

Ključne besede

Smuhec, fizikalno-kemijske lastnosti, raztapljanje, dobro topna učinkovina, velikost delcev, specifična površina

SEZNAM OKRAJŠAV

ANDA	skrajšana vloga za novo zdravilo (ang. »Abbreviated New Drug Application« -)
ATR	oslabljena popolna odbojnost (ang. »Attenuated Total Reflectance«)
BCS	Biofarmacevtski klasifikacijski sistem
BET	Brunauer-Emmett-Teller analiza vrednotenja specifične površine delcev
BP	Britanska farmakopeja
c	koncentracija
DR	difuzna odbojnost (ang. »Difused Reflectance«)
FDA	Ameriška agencija za hrano iz zdravila (ang. »U.S. Food and Drug Administration«)
FO	farmacevtska oblika
IR	analiza infrardečega spektra v srednjem območju (ang. »InfraRed spectroscopy«)
JP	Japonska farmakopeja
m	masa
NDA	vloga za novo zdravilo (ang. »New Drug Application«)
NIR	analiza infrardečega spektra v bližnjem območju (ang. »Near InfraRed spectroscopy«)
NLT	ne manj kot (»Not Less Than«)
NMT	ne več kot (»Not More Than«)
PCA	analiza glavnih komponent (ang. »Principal Component Analysis«)
Ph.Eur	Evropska farmakopeja
PSD	analiza porazdelitve velikosti delcev (ang. »Particle Size Distribution«)
PQ	kvalifikacija delovanja (ang. »Performance Qualificaton«)
RCS	Razvojni center Slovenije podjetja Lek d.d.

RLD	referenčno primerjalno zdravilo (ang. »Reference Listed Drug«)
RPM	enota za hitrost vrtenja: obratov na minuto (ang. »Revolutions Per Minute«)
SEM	vrstični elektronski mikroskop (ang. »Scanning Electron Microscopy«)
USP	Ameriška farmakopeja
CFU	mikrobna celica ali skupek celic, iz katerih se razvije posamezna kolonija (ang. »Colony forming unit«)

1. UVOD

1.1. SMUKEC

Smukec je naraven, uprašen, hidriran magnezijev kalcijev silikat. Je fin prah, ki na otip deluje masten oziroma oljnat in je brez vonja (1). Se hitro veže na kožo in je mehak na dotik, brez občutka grudic, zaradi česar je pomemben industrijski material, ki se uporablja v različnih področjih industrije (glej poglavje 1.1.2.). Končno uporabo določajo njegove lastnosti kot je kemijska in mineralna sestava, oblika delcev, barva, velikost, trdnost itd. (2). V Preglednici I in v poglavju 1.1.1. so navedene fizikalno-kemijske lastnosti smukca, v Preglednica II pa so navedeni farmakopejski kriteriji za ustreznost smukca.

Preglednica I: Fizikalno – kemijske lastnosti smukca (7)

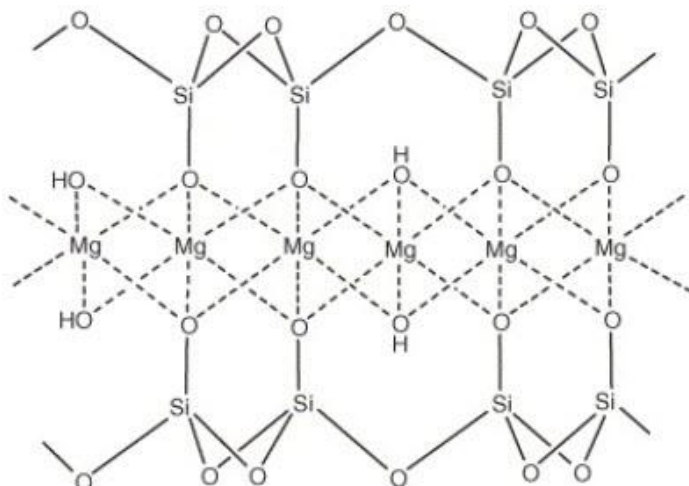
Ne-lastniško ime	Smukec (SI) Talcum (Ph.Eur) Talc (JP, USP) Purified Talc (BP) Talq (Arabic)
Kemijska formula	Mg₃Si₄O₁₀(OH)₂
Molekulska masa	379,26 g/mol
Mineralna sestava (w/w)	Mg 19,23 % MgO 31,88 % Si 29,62 % SiO ₂ 63,37% H 0,53% H ₂ O 4,75% O 50,62% (8)
CAS številka	14807-96-6
Smiles	O.O=[Mg].O=[Mg].O=[Mg].O=[Si]=O.O.O=[Si]=O.O.O=[Si]=O.O.O=[Si]=O
Druga imena/oznake	E553b, hidriran magnezijev kalcijev silikat, hidriran magnezijev silikat, magnezijev metasilikat, uprašeni smukec, čista francoska kreda, soapstone, stealtit

1.1.1. FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI SMUKCA

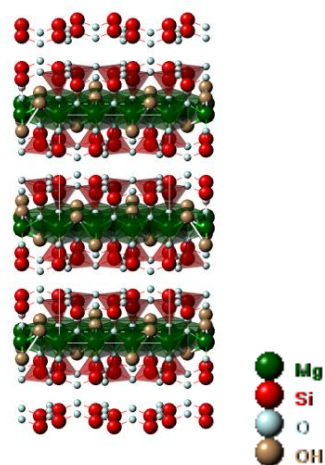
KEMIZEM in SESTAVA (KRISTALNA OBLIKA IN SESTAVA)

Smukeyc je zgrajen v obliki monoklinskega kristalnega sistema. Po klasifikaciji, ki določa stopnjo polimerizacije tetraedrov (SiO_4)⁴⁻ v kristalni strukturi, je smukeyc plastnati silikat (t.i. filosilikat) sestavljen iz oktaedrično oblikovanih plasti $[\text{Mg}_3(\text{OH})_2]^{2n-}$, nameščenih med dvema plastema tetraedričnih silikatnih plasti $[\text{Si}_2\text{O}_5]^{2n-}$, pri čemer so sosednje plasti med seboj šibko vezane z Van der Waalsovimi silami. V kristalni strukturi se pojavljajo energetske šibke, hidrofobne bazalne površine z bazičnimi in hidrofobnimi skupinami Si-O-Si in energetske močnejše, hidrofilne lateralne površine oz. robovi s kislimi in hidrofilnimi skupinami Si-OH in preostalimi magnezijevimi kationi (Mg^{2+}) (Slika 1 in 2) (3), (4).

V svoji strukturi lahko vsebuje različne mineralne nečistote, med katerimi prevladujejo serpentini, dolomit, kremen, klorit (hidrirani aluminijevi in magnezijevi silikati), magnezit (magnezijev karbonat), kalcit (kalcijev karbonat) in dolomit (kalcijev in magnezijev karbonat) (2), (5), vendar ne sme vsebovati azbesta (6). Najpogostejše nečistote so nikelj, železo, aluminij, kalcij in voda. V tem primeru nečistote povzročajo spremembo barve, kar je najbolj očitno pri aluminiju in železu. Majhne količine Al^{3+} ionov lahko zamenja v kristalni strukturi Si^{4+} in majhne količine Al^{3+} , Fe^{3+} in Fe^{2+} pa lahko zamenjajo magnezijeve ione v oktaedrični plasti. Prisotnost aluminijevih ionov v silikatni tetraedrični plasti smukca lahko v prisotnosti polarnih skupin povzroči spremembo hidrofobnosti oktaedrične bazalne plasti (2), (4), (9).



Slika 1: Kemijska struktura smukca



Slika 2: 3D kristalna oblika smukca (10)

MORFOLOGIJA (OBLIKA, VELIKOST IN PORAZDELITEV VELIKOSTI DELCEV) in **DRUGE FIZIKALNE LASTNOSTI**

OBLIKA in VELIKOST

Lamelarnost smukca določa njegovo velikost plastovitih struktur in je lahko različna glede na izvorne geološke pogoje pod katerimi nastaja. Visoko lamelarni/makrokristalinični smukec ima velike individualne plastovite delce, ki so dobro definirani, za razliko od mikrokristaličnega smukca, ki ima majhne, naključno orientirane plastovite delce. Velikost posameznega delca lahko variira med $1\mu\text{m}$ do $100\mu\text{m}$ (2), odvisno od oblike depozita v katerem se nahaja, predvsem pa tudi od končne obdelave (glej poglavje 1.1.4.). Velikost delcev smukca za dermalno uporabo se giba v območju med $4\mu\text{m}$ - $15\mu\text{m}$, merjeno s sedimentacijsko metodo.

Drugi viri navajajo velikostne razrede smukca kot velikostni razred, kjer 95 – 99% materiala prehaja določeno velikost odprtine v mreži (t.i. »mesh«). Velikostni razredi, ki se pri tej opredelitvi uporabljajo in so namenjeni za dermalno uporabo so 200 mesh, 325 mesh in 400 mesh ($74\mu\text{m}$, $44\mu\text{m}$ in $37\mu\text{m}$) (11).

Tipično se pojavljata 2 velikostna razreda:

$d[0,9] = 44\mu\text{m}$ (#325 mesh)

$d[0,9] = 74\mu\text{m}$ (#200 mesh)

ultramikronizirani: $d[0,9] \leq 8\mu\text{m}$ (1), (2)

BARVA

Bela, sivo-bela. Čisti smukec je brezbarven, belo barvo pridobi s samim mletjem, medtem ko je sivo-bele barve v primeru, ko je eden izmed glavnih elementov v kristalni strukturi zamenjan z železom ali drugimi kovinskimi elementi (4), (12).

MOHS-ova TRDOTNA LESTVICA

1 (1 - najmanjša trdota, 10 (diamant) – največja trdota) (13)

VRSTA LUMINISCENCE

Fluorescenca (12).

OTIP

Voskast, masten, perlasi, smolnati (13).

TRANSPARENTNOST

Transparenten, prosojen (12).

HIGROSKOPNOST

Smuhec absorbira ne-signifikantne količine vode pri 25°C in relativni vlažnosti do 90%.

GOSTOTA

2,6 – 2,8 g/mL (2)

SPECIFIČNA POVRŠINA

2,41 – 13,42 m²/g (1)

REFRAKCIJSKI INDEKS

$n_D^{20} = 1,54-1,59$ (1)

KISLOST/BAZIČNOST

pH = 7 - 10 za 20% m/V vodne disperzije (1), (12)

TOPNOST

Praktično netopen v razredčenih kislinah in bazah, organskih topilih in vodi (1), (12).

NEKOMPATIBILNOST

Smuhec je nekompatibilen s kvaternimi amonijevimi spojinami (12).

STABILNOST

Smuhec je stabilen material do temperature 900°C, kjer začne postopoma izgubljati hidroksilne skupine, nad 1500°C pa rekristalizira v različne oblike brezvodnega magnezijevega silikata. Za namene sterilizacije ga lahko segrevamo do temperature 160°C.

MIKROBIOLOŠKA KAKOVOST

Smuhec je naravni material, zato lahko vsebuje mikroorganizme.

Dovoljene meje mikroorganizmov za različne načine uporabe:

za farmacevtsko in dermatološko uporabo: max. 10² CFU/g

za oralno/peroralno uporabo: max. 10³ CFU/g (6), (12).

FARMAKOPEJSKI PREDPISI ZA SMUKEC

Preglednica II: Farmakopejski kriteriji za ustreznost posameznih vzorcev smukca (5),

(6)

TEST		Ph.Eur 8.8	USP 39–NF 34
Identifikacija		+ ^(A: IR)	+ ^(A: IR)
V kislem topne substance		-	-
Kislost ali bazičnost		+	+
pH		-	-
Vodotopne substance		≤ 0,2%	≤ 0,1%
Prisotnost aluminija		≤ 2,0%	≤ 2,0%
Prisotnost kalcija		≤ 0,9%	≤ 0,9%
Prisotnost magnezija		17,0 – 19,5 %	-
Prisotnost železa		≤ 0,25%	0,25%
Prisotnost svinca		≤ 10 ppm	≤ 10 ppm
Prisotnost magnezija		17,0–19,5%	17,0–19,5%
Izguba pri vžigu		≤ 7,0%	≤ 7,0%
Mikrobiološka kontaminacija		+	+
Aerobne bakterije	Topikalna aplikacija	≤10 ² cfu/g	10 ² cfu/g
	Peroralna aplikacija	≤ 10 ³ cfu/g	10 ³ cfu/g
Glivice	Topikalna aplikacija	≤10 ² cfu/g	50 cfu/g
	Peroralna aplikacija	-	10 ² cfu/g
V kislem in bazičnem topne primesi		—	≤ 2,0%
Odsotnost azbesta		—	+

1.1.2. UPORABA SMUKCA

Smukec je zaradi svojih lastnosti in visoke funkcionalnosti eden najpomembnejših mineralov. Uporaba ni vezana samo na farmacevtsko uporabo, temveč ga največ uporabljamo predvsem pri proizvodnji barv, plastike, papirja, keramike in konstrukcijskega materiala. Uporabo določajo predvsem njegove lastnosti: lamelarnost in s tem pogojena morfologija in velikost delcev ter prisotnost nečistot in drugih mineralov (15). Zaradi visoke rezistence na visoke temperature in električni tok, ga pogosto uporabljamo tudi kot izolacijsko sredstvo. V farmaciji je smukec široko uporabna snov. Desetletja je veljal za eno izmed najpomembnejših pomožnih snovi pri proizvodnji konvencionalnih farmacevtskih oblik kot so tablete in kapsule zaradi svoje fizikalno-kemijske inertnosti. Njegova vloga je bila predvsem kot drsilo, polnilo in lubrikant. Dandanes smukec manj uporabljamo za predhodno naštetе funkcije, ga pa zelo pogosto uporabljajo kot snov za povečanje motnosti in zmanjšanje prepustnosti filmskih oblog ter vedno pogosteje kot zakasnjevalec sproščanja pri razvoju farmacevtskih oblikah z zakasnjениm sproščanjem in tudi kot pomožna snov pri proizvodnji pelet, zaradi svoje fizikalno-kemijske inertnosti in nizke cene (2), (12), (15), (16).

- **Drsilo**

Kot drsilo ga uporabljamo pri pripravi zmesi za tabletiranje in drugih procesih, pri katerih je pomemben enakomeren in konstanten pretok prahov. V tem primeru zmesi prahov dodamo nekje 0,5% - 2% smukca glede na celotno maso zmesi (12). Pri takšni uporabi je potrebno upoštevati velikost smukca glede na velikost delcev ostalih prahov v zmesi, saj veliki agregati smukca sicer dobro pripomorejo k pretočnosti prahov, vendar lahko povzročijo težave pri samem tabletiranju in ustrezni kompaktnosti tablet. Najbolj priporočena velikost delcev smukca za izboljšanje pretočnosti je 2,5 μ m, medtem ko se velikost 2 - 3 μ m priporoča tako za lubriciranje kot tudi za izboljšanje pretočnosti (12), (16).

- **Mazivo**

Kot lubrikant ga uporabljamo predvsem v procesu tabletiranja, s čimer preprečimo lepljenje zmesi na pečatno orodje in matrico tabletirke. Z zmanjševanjem velikosti delcev smukca se povečuje specifična površina in s tem tudi učinkovitost lubrikantnih sposobnosti, vendar tudi najmanjša velikost smukca nima tako dobrih lubrikantnih sposobnosti kot najpogostejši lubrikant magnezijev stearat (16).

- **Razgrajevalo**

Pokazali so, da je smukec zelo dobro razgrajevalo, ko ga vključimo v tabletno jedro kot pomožno snov, ker je neobčutljiv na silo stiskanja in trdnost samih tablet, za razliko od drugih drsil (16). Hkrati lahko z dodajanjem smukca v zmes izboljšamo oz. povrnemo razgrajevalne sposobnosti pri zmesih, kjer je razgradnja končne farmacevtske oblike zmanjšana zaradi dodatka magnezijevega stearata. Za ta namen velikost delcev smukca ni pomembna.

- **Polnilo**

Še vedno ga v določenih formulacijah uporabljamo kot osnovno polnilo iz istega razloga kot zgoraj naštetu, zaradi visoke fizikalno-kemijske inertnosti in ugodne cene. Pri mnogih učinkovinah so potrdili, da je smukec dobro polnilo pri procesu ko-kristaloaglomeracije, saj je nagnjen k aglomeraciji, zaradi svoje netopnosti v vodnih medijih pa tudi ne povzroča izgub tekom procesa, hkrati pa so dokazali, da se s prisotnostjo smukca izboljšajo tako kompresibilnost kot tudi sproščanje nekaterih zdravilnih učinkovin (16).

- **Kozmetični in dermalni pripravki**

V kozmetičnih in dermalnih pripravkih uporabljamo smukec predvsem kot lubrikant, sredstvo proti sprijemanju, abraziv in absorbent ter kot zaščitno sredstvo za kožo(16). Pomembna je uporaba v lepotni kozmetiki, kjer je smukec osnova za prenos pigmentov (senčila, šminke)(15), matirajoča osnova in polnilo (pudri) (12).

1.1.3. POJAVNOST/RAZŠIRJENOST SMUKCA

Smukec je pomemben mineral, ki ga pridobivajo v več kot 80 državah sveta (Slika 31, 32, 33 in 34 v prilogi). Čeprav je smukec prisoten po celem svetu, so zaloge le-tega zelo majhne v primerjavi z ostalimi minerali (16). Največji proizvajalci so predvsem ZDA in Kitajska, sledijo Indija, Finska, Francija, in Brazilija. Glede na geografski izvor se smukci razlikujejo po deležu določenih primesi in sami obliki delcev, kar je odvisno predvsem od mineralne zgradbe izvorne podlage (12). Francoski smukec dobavitelja Luzenac in italijanski smukec, ki ju pridobivajo v Brossu in Lessolu imata dobro definirano kristalno zgradbo z zelo majhnimi kristali, pri čemer francoski vsebuje veliko aluminijevih oksidov, italijanski pa kalcijevih silicatom. Smukec, ki ga pridobivajo v Nemčiji vsebuje veliko dobrih psevdomorfov s kremnom, norveški z enstatitom in španski z dolomitom (12). Ameriški in kanadski smukec

sta po navedbah *Simandle in Paradisl* (22) prekambrijska, zaradi česar vsebujeta veliko karbonata (Ontario, New York), steatita (New York, Pensilvanija, Kalifornija, Massachusetts, Connecticut, Vermont), železovih oksidov (Montana), aluminijevih oksidov (Alabama) in karbonatov (Kalifornija) (12, 22). Indijski smukci vsebujejo veliko železovi in aluminijevih oksidov (12). Afriški smukec, natančneje nigerijski naj bi po navedbah določenih virov imel več primesi kot so tremolit in klorit, ki sta hkrati tudi dva najpomembnejša minerala, ki se pojavljata poleg smukca.

Do leta 1980 so trg oskrbovali manjša in srednje velika podjetja, danes pa je oskrba trga grobo pogledano v rokah petih velikih podjetjih, ki pokrivajo izkopališča na vseh kontinentih kjer je smukec prisoten, ter več kitajskih in indijskih podjetij, ki pa so orientirani bolj na lasten kot svetovni trg. Glavni in največji proizvajalci smukca so Luzenac Group (pod lastništvom Imerys-a, s sedežem v Franciji), Rio Tinto Minerals (s sedežem v VB), Mondo minerals (Finska), Specialty minerals, del podjetja Mineral Technologies Inc. (ZDA) in Imifabi (s sedežem v Italiji) (16), (20) (Preglednica III).

Letna svetovna proizvodnja po podatkih iz leta 2006 in 2007 je bila koli 8,1 milijona ton. Kitajska in ZDA sta v tem primeru daleč vodilna proizvajalca z 0,9-2,5 milijona ton, sledijo jima Indija, Finska, Francija in Brazilija s 400.000-600.000 tonami letno; Avstrija, Avstralija, Rusija, Italija, Iran in Španija s 100.000-170.000 tonami in Kanada, Mehika in Južna Koreja s 50.000-100.000 tonami letno, ostali pa proizvedejo do 50.000 ton letno(19).

Po navedbah (22) je bila Finska v letu 2008 prva po količini proizvedenega smukca v Evropi in hkrati četrta na svetu. Po navedbah *Jadhav in sodelvacev* (16), pa je bil v letu 2013 največji proizvajalec Luzenac group s sedežem v Franciji (8), (12), (13).

Preglednica III: Pregled proizvajalcev in rudnikov po celinah

Celina	Podjetje	Sedež podjetja	Rudniki
S. Amerika	Imerys Talc & Lusenc	Francija, Avstrija	Španija, Malaga Toulouse Luzenac-sur-Ariege Porte Weisskirchen Graz Oberfeistritz Spielberg
	Rio Tinto Minerals	Kanada, ZDA	Kanada, Avstralija (Three springs) ZDA

Celina	Podjetje	Sedež podjetja	Rudniki
			Avstrija (Graz)
	RT Vanderbilt	Norwalk, ZDA	New York
	American Talc Co.	ZDA	Teksas
	Specialty minerals, Minerals technologies	ZDA	Montana, Indiana
J. Amerika	Magnesita	Brazilija	ε
Evropa	Mineral IM.ES.CO	Italija	Verona
	Mondo minerals	Finska/Nizozemska	Finska (Sotkamo, Kaavi) Amsterdam (Katwijk) Norveška (Knarrewik)
	Turkish minerals (1)	Turčija	İstanbul / Bostanci Kadikoz Esenler Esentepe sisli
	Paltentaler Minerals	Avstrija	Lassing Altdorf
	Imifabi EU	Italija	Italija (Sondrio) Avstralija (Mount Seabrook) ZDA (West Benwood)
Azija	Liaoning Aihai Talc Co., LTD	Kitajska	Liaoning Shangdong Guangxi
	Golcha	Indija	Rajasthan Jaipur Tajska
	Fukuoka Talc Co. LTD	Japonska	Hiratsuka, Iiduka-city Minato-chi, Yatsuro-city
	Jai (Vardhman Khaniz) Group	Indija	Bharkundi
	Uma minerals	Indija	Kutch gujarat, Indija
	Alankar Mineral Industries	Indija	Gujarat Maharashtra Delhi Andhra Pradesh Rajastan
	Sun minerals	Indija	Rajastan ^a
	Vaidehi Minerals Pvt. Ltd.	Indija	Rajastan ^a
	Krishna miners	Indija	Udaipur ^b Pratapgarh ^b
Avstralija	Three springs		Perth
	Imifabi Avstralija		Perth
	Perrigo Australia		Balcatta

^a – smukec se pridobiva na različnih gorskih lokacijah v Rajastan-u

^b – rudniki se nahajajo na različnih lokacijah po državi

^ε – rudniki na 28 lokacijah v Braziliji

1.1.4. PRIDOBIVANJE IN OBDELAVA SMUKCA

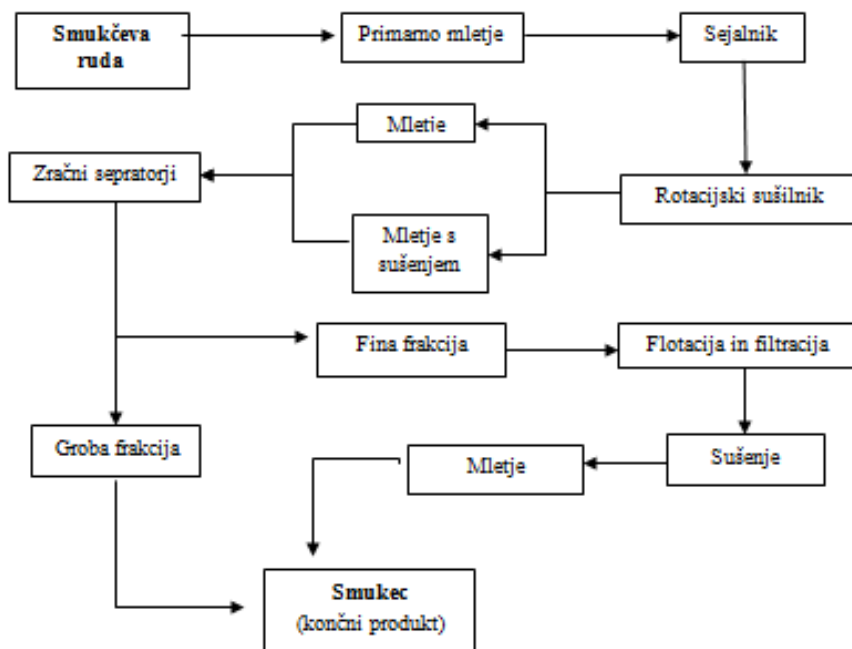
Več kot 95% smukčeve rude, ki jo pridobivajo v Evropi in ZDA prihaja iz odprtih rudnikov.

Predelava smukca poteka v po sledečih korakih:

- 1) Primarno mletje
 - Separacija in rotacijsko sušenje (po potrebi)
- 2) Sekundarno mletje s sočasnim sušenjem ali dekalcinacija
- 3) Zračna separacija
- 4) Faza prečiščevanja
 - Flotacija
 - Kloriranje in beljenje

Proces izkopavanja je sestavljen iz konvencionalnega vrtanja in drobljenja. Rudo nato prepeljejo iz rudnika v predelovalni obrat, kjer ga prenesejo v proces primarnega mletja s čeljustnim drobilcem in sejanja. Grobi material odstranijo in ponovno vrnejo v fazo drobljenja. Po drobljenju do ustrezne velikosti smukec nato po potrebi posušijo v rotacijskih sušilnikih. Sledi lahko faza sekundarnega drobljenja, pri čemer uporabljajo valjčne mline s katerimi lahko dosežejo delce z velikostjo od 44 – 149 μm (325 – 100 mesh) ali faza dekalcinacije, kar velja predvsem za smukec, ki ga izkopavajo na področju ZDA in vsebuje veliko organskih primesi. Nekateri valjčni mlini v procesu sekundarnega drobljenja lahko med samim procesom vpihavajo segret zrak, ki še dodatno posušijo material do želene vsebnosti vlage. Pri dodatnih zahtevah uporabljajo mline kladivarje ali mline na stisnjen zrak, pri čemer lahko material zmeljejo do manjših velikostnih razredov. Zračni separatorji, ki so v zaprtem krogu povezani z mlino nato separirajo/presejejo material v več velikostnih razredov – groba frakcija, groba in fina frakcija, ki ju shranjujejo kot končni produkt ter fina frakcija, ki jo v primeru dodatnih zahtev obdelajo z naslednjo fazo predelave (Slika 3). Lahko uporabijo fazo koncentriranja, z uporabo vibrirajoče mize, pri čemer odstranijo iz produkta možno prisotne kovine: nikelj, železo, kobalt in druge, čemur sledi proces flotacije (12), (23). Pri uporabi v farmaciji, kozmetiki in prehrabeni industriji mora biti smukec visoke čistote, kar lahko dosežejo predvsem z mokro obdelavo (proces flotacije ali kloriranja in beljenja), ki ima pred suho obdelavo (lasersko in vizualno selekcioniranje) marsikatero prednost: doseganje stopnje čistote do 99-100%, s ponavljajočim spiranjem s kislinami ali bazami odstranijo topne

nečistote in omogočijo odstranjevanje mikrobioloških kontaminantov (16). Pri procesu flotacije smukec suspendirajo v alkoholu z nizko molekulsko maso. Suspenzijo nato procesirajo v zaporedju pretočnih celic, kamor vpihavajo zrak pod določenim tlakom, ki povzroči izhajanje mehurčkov na površino, na katere se zaradi svoje hidrofilnosti primejo delci smukca, vendar ne tudi hidrofobne nečistote. Pena, ki jo tvorijo mehurčki s ima večjo čistost kot suspenzija, ki prihaja v celice. Proces nato ponavljajo do zelene čistote. Delce lahko naknadno obdelajo z magnetno separacijo ali spiranjem s kislino, kjer dobijo najvišjo stopnjo čistote (12). Suspenzijo prefiltrirajo in posušijo z uporabo pnevmatskega sušilnika. V primeru prečiščenja s kloriranjem in beljenjem so dokazali, da v procesu uspešno odstranijo Fe_2O_3 . Najboljše rezultate so dosegli, če so smukec predhodno spirali z 10% (m/m) HCl, s čimer so odstranili prisotne karbonate. V procesu kloriranja in beljenja uporabijo uplinjen klor in dušik v razmerju 1:1 pri temperaturi nad 800°C (16).



Slika 3: Shema procesa pridobivanja in predelave smukca

1.2. SPROŠČANJE UČINKOVINE IZ TRDNE FARMACEVTSKE OBLIKE S TAKOJŠNJIM SPROŠČANJEM

Absorpcija učinkovine iz trdne farmacevtske oblike po peroralnem zaužitju je odvisna od sproščanja zdravilne učinkovine iz farmacevtske oblike, raztapljanja oziroma solubilizacije zdravilne učinkovine v fizioloških pogojih in permeabilnosti stene gastrointestinalnega trakta. Zaradi kritičnosti prvih dveh korakov v procesu doseganja tarčnih tkiv so *in vitro* testi sproščanja primerni za napovedovanje obnašanja učinkovine *in vivo* po zaužitju farmacevtske oblike. Ti testi so zahteva za vse trdne farmacevtske oblike v vseh fazah razvoja. So ključni analitski testi za spremljanje vpliva fizikalno-kemijskih lastnosti zdravilne učinkovine v formulaciji, kot vodilo pri razvoju novih formulacij, prav tako se testi sproščanja uporabljajo za medsebojno preverjanje kakovosti serij (ang. »batch-to-batch quality«) in za zagotovitev kontinuirane kakovosti izdelka po uvedenih določenih spremembah v formulaciji (ang. »minor, post-approval changes«), proizvodnem procesu, spremembi lokacije proizvodnje ali pri samem prehodu na večji nivo proizvodnje. FDA smernice pri izvedbi testov sproščanja upoštevajo BCS klasifikacijo, ki temelji na topnosti in permeabilnosti zdravilne učinkovine. Testi sproščanja morajo biti robustni in ponovljivi, hkrati pa morajo biti metode diskriminatorne in morajo izpostaviti signifikantne spremembe pri učinkovitosti samega izdelka. Pri razvoju metode moramo izbrati primeren medij za sproščanje, tip naprave, primeren za farmacevtsko obliko, ki jo želimo testirati in določiti primerno hidrodinamiko (hitrost vrtenja košaric, vesel, hitrost pretoka medija, itd.).

Ameriška farmakopeja (USP) navaja 4 tipe aparatov: Aparatura 1 (košarice), aparatura 2 (vesla), aparatura 3 (izmenični cilindri), aparatura 4 (pretočna celica), aparatura 5 (veslo nad diskom), aparatura 6 (cilinder) in aparatura 7 (izmenična držala).

Evropska farmakopeja pa za izvajanje testov določa naslednje naprave: aparatura z vesli, aparatura s košaricami in aparatura s pretočno celico. Za oblike s takojšnjim sproščanje je najpogosteje v uporabi USP aparat 1 s košaricami (29), (30), (31).

FDA pogoji za sproščanje in določanje specifikacij za farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem:

Pri oddaji vloge za novo zdravilo (NDA) ali pri oddaji skrajšane vloge za novo zdravilo (ANDA) je potrebno predložiti podatke o biološki uporabnosti, bioekvivalenci ali rezultate *in vitro* testov raztapljanja, skupaj s podatki o kakovosti in delovanju novega/generičnega zdravila. S pomočjo BCS klasifikacije je potrebno okarakterizirati učinkovino, ki je prisotna v zdravilu, s čimer določimo ali so potrebne študije bioekvivalentnosti ali pa je primerljivost, varnost in učinkovitost zdravila možno dokazovati z *in vitro-in vivo* testi (IVIVC). S tem je določeno, da imajo učinkovine v BCS razredu 1 in 3 majhno tveganje, da bi raztapljanje vplivalo na delovanje samega zdravila, zato so za zdravila s takšnimi učinkovinami potrebni le *in vitro-in vivo* testi sproščanja (5). FDA smernice za izdelke s takojšnjim sproščanjem določajo pogoje za teste sproščanja glede na BCS razred v katerem se nahaja učinkovina.

WHO smernice za preverjanje in možnosti bioekvivalence za modelno učinkovino

WHO je izdal smernice za dokazovanje bioekvivalentnosti, kjer se odločitev vrši na podlagi klasifikacijskega sistema BCS. Znotraj tega je modelna učinkovina opredeljena kot BCS razred 1 ali 3, zato sta za dokazovanje bioekvivalence opredeljena dva IVIVC testa:

a) če je modelna učinkovina uvrščena v BCS razred 1, mora dosegati naslednje pogoje: V prvih **15 minutah** se mora sprostiti **najmanj 85% učinkovine** v standardnem mediju s pH 1,2, 4,5 in 6,8 pri uporabi aparata 2 (z vesli) po USP, pri 75 obratih na minuto ali uporabi aparata 1 (s košaricami), pri 100 obratih na minuto. Če je po izvedbi testa zadoščeno vsem zgoraj navedenim pogojem lahko zaključimo, da je sproščanje zelo hitro in izdelek ustreza predpisu.

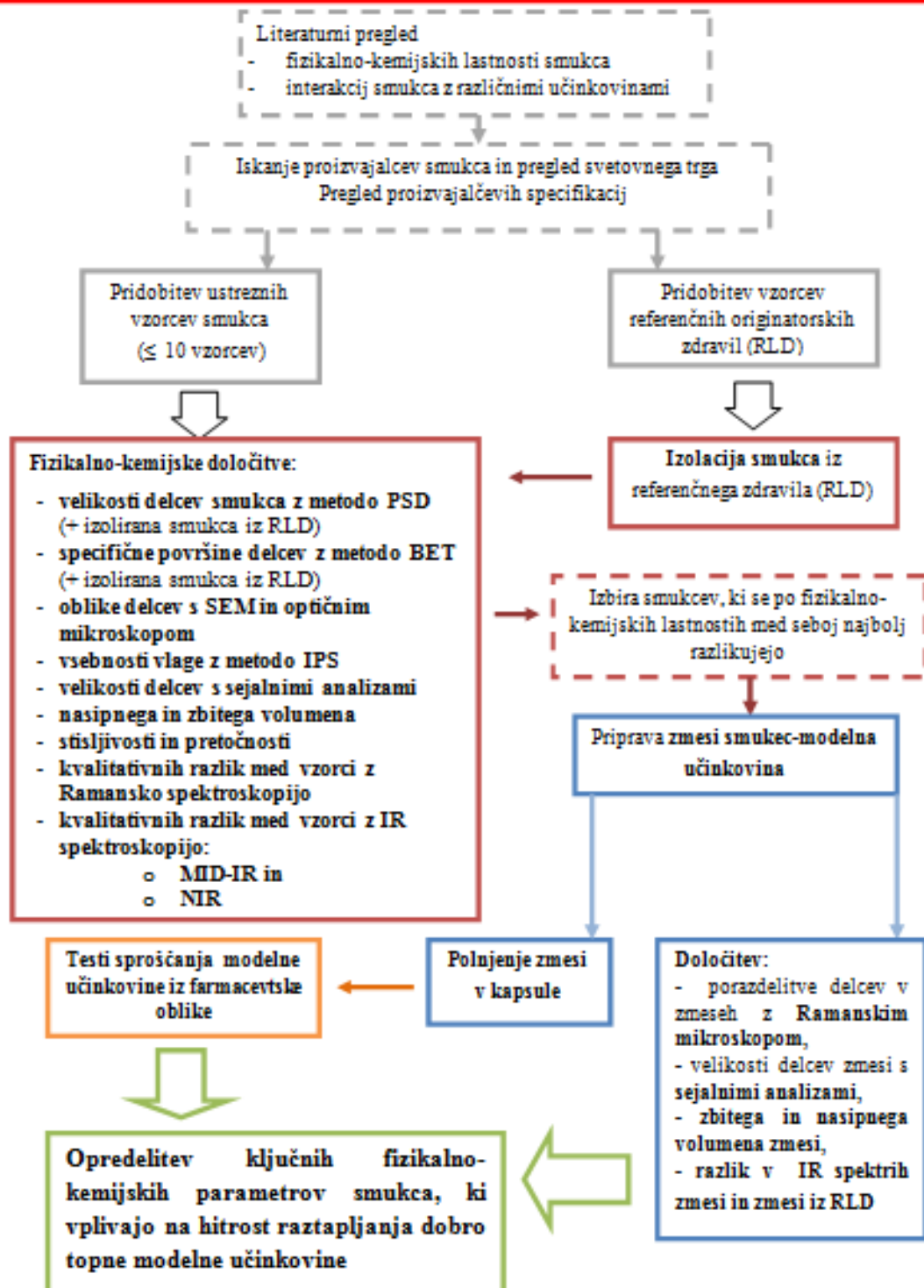
b) če je modelna učinkovina uvrščena v BCS razred 3, mora dosegati naslednje pogoje: v prvih **15 minutah** se mora sprostiti **najmanj 85% učinkovine** v standardnem mediju s pH 1,2, 4,5 in 6,8 pri uporabi aparata 2 (z vesli) po USP, pri 75 obratih na minuto ali uporabi aparata 1 (s košaricami), pri 100 obratih na minuto. Na splošno je potrebno bolj kritično ovrednotiti tveganja pri izbiri in dokazovanju bioekvivalentnosti pri učinkovinah v BCS razredu 3 (npr. absorpcijo na specifičnih mestih, indukcijo/zaviranje na mestu absorpcije, pomožne snovi in terapevtska tveganja) (28).

2. NAMEN DELA IN NAČRT ZA DELO

Zaradi svoje kemijske in fizikalne inertnosti je smukec zelo pogosta pomožna snov v farmaciji. Veliko ga uporabljamo kot polnilo in do sedaj se ni izkazalo, da bi lahko vplival na sproščanje dobro topne modelne učinkovine iz končne farmacevtske oblike. Pri razvoju novega generičnega zdravila, v katerega kot surovini vstopata modelna učinkovina in smukec pa se je izkazalo, da lahko tudi smukec pripomore k slabšemu sproščanju. Ker so testi sproščanja ena izmed metod dokazovanja ustreznosti, kakovosti in varnosti novega generičnega zdravila, se želimo v tej magistrski nalogi osredotočiti predvsem na fizikalno-kemijske lastnosti smukca, ki lahko vplivajo na sproščanje dobro topne modelne učinkovine iz končne farmacevtske oblike.

V sklopu magistrske naloge bomo naredili pregled svetovnega trga proizvajalcev smukca in pridobili smukcev iz različnih virov. Na vzorcih smukcev bomo izvedli naslednje analize: z metodo PSD bomo vrednotili velikosti delcev smukca, z metodo BET bomo pomerili specifične površine in z metodo IPS bomo preverjali vsebnost vlage. Z meritvami nasipnega in zbitega volumna ter pretočnosti in stisljivosti bomo vrednotili obnašanje različnih smukcev. Z metodama infrardeče spektroskopije v srednjem (MID IR) in bližnjem (NIR) območju bomo ugotavljali razlike v kemijski sestavi vzorcev in preverjali prisotnost morebitnih primesi. Iz referenčnih originatorskih zdravil bomo izolirali smukec z namenom ugotavljanja določenih fizikalno-kemijskih lastnosti. Na smukcih iz RLD bomo za primerjavo z vzorci smukca izvedli meritve velikosti delcev z metodo PSD in specifične površine z metodo BET. Po narejenih analizah fizikalno-kemijskih lastnosti vseh vzorcev bomo primerjali rezultate in izbrali smukce, s katerimi bomo pripravili zmesi z modelno učinkovino. Z Ramansko spektroskopijo bomo opazovali porazdelitev smukca in modelne učinkovine in s pomočjo vrstičnega elektronskega mikroskopa (SEM) ter svetlobnim mikroskopom vrednotili obliko delcev in pojav agregatov. Zmesi bomo polnili v kapsule in z njimi testirali hitrost sproščanja. Teste sproščanja bomo naredili z namenom opredelitve ključnih fizikalno-kemijskih parametrov vzorcev smukca, ki bi lahko vplivale na hitrost sproščanja dobro topne modelne učinkovine. Pri tem nam bo kot vodilo služil WHO predpis za farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem. Potek dela je predstavljen na sliki 4.

RAZISKOVALNI PROBLEM: NEUSTREZEN PROFIL SPROŠČANJA MODELNE UČINKOVINE IZ RAZVOJNEGA GENERIČNEGA ZDRAVILA GLEDE NA WHO PREDPIS ZA SPROŠČANJE DOBRO TOPNE UČINKOVINE IZ FO S TAKOJŠNJIM SPROŠČANJEM



Slika 4: Potek dela

3. MATERIALI

3.1. APARATURE IN PRIBOR

- PSD - Malvern Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd., Velika Britanija
- BET - Micrometrics Tristar 3000, Norcross, Georgia, ZDA
- IPS - Mettler Toledo HR73, Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švica
- Optični mikroskop Leica CTR 6000, Leica microsystems, Wetzlar, Nemčija
- SEM Jeol JSM-IT300 LV, Jeol Ltd., Tokio, Japonska
- Ramanski spektrometer Renishaw InVia Reflex, Gloucestershire, Velika Britanija
- FT-IR ThermoFisher Nexus Nicolet 20 STS Smart iTX, Waltham, Massachusetts, ZDA
- FT-NIR Bruker MPA FT-NIR Series, Billerica, Massachusetts, ZDA
- Analitska tehnica Mettler Toledo AX205DR, Schwerzenbach, Švica
- Precizna tehnica Mettler Toledo XS2002S, Schwerzenbach, Švica
- Digitalna tehnica Radwag 4500 PS, Radon, Poljska
- Sita Retsch, Haan, Nemčija
- Stresalnik Retsch AS200 Control, Haan, Nemčija
- Pretočnost Pharma test PTG-S4, Hainburg, Nemčija
- Nasipni/zbiti volumen – Erweka SVM222, Erweka GmbH, Heusenstamm, Nemčija
- Disolucijske naprave:
 - Aparat za raztapljanje: aparat 1 po USP (košarice), Agilent technologies, 708-DS, Santa Clara, Kalifornija, ZDA
 - Avtomatski vzorčevalnik: Agilent technologies, 850-DS, Santa Clara, ZDA
 - Odzračevalec: Distek Ezfill 4500, Distek Inc., North Brunswick, New Jersey, ZDA
- HPLC:
 - Agilent technologies 1100 series, Santa Clara, Kalifornija, ZDA
 - HPLC kolona: xTerra RP 18 15 μ m, 6x250mm, Waters Corporation, ZDA
 - Spark Midas avtosampler, Spark Holland BV, Emmen, Nizozemska
 - Knauer UV detektor K-2501, Wissenschaftliche Geräte GmbH, Berlin, Nemčija
 - WellChrom HPLC črpalka, K-1001, Knauer Wissenschaftliche Geräte GmbH, Berlin, Nemčija

- Centrifuga Domel, Železniki, Slovenija
- Hitrovrteči mešalnik Vibromix 10, Domel, Železniki, Slovenija
- pH meter MP 220, Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švica
- membranski filtri, velikost por 0,45 μ m, Sartorius AG, Nemčija
- steklovina: merilni valj 250mL, merilne bučke Duran različnih volumnov (10 mL, 100 mL, 1 L, 2 L), merilne čaše in tehtiči, merilne pipete
- ostali inventar: spatule, 3x 10 L vedro, centrifugirke 50 mL

3.2. PREISKOVANE SPOJINE

3.2.1. MODELNA UČINKOVINA

Modelna učinkovina je bel do rumeno-bel kristalinični prah. Je dobro topna (1g/10mL) v vodi, srednje dobro topna v metanolu in propilenglikolu (1g/100-1000mL) in rahlo topna v etanolu (~750 g/l). Je praktično netopna v diklorometanu. pH raztopine s koncentracijo $c = 100\text{mg/mL}$ v vodi brez CO_2 je 5,5 – 6,5 (26). Učinkovina ni močljiva, vendar je rahlo higroskopna(26).

Modelna učinkovina je po BCS uvrščena v razred 1 ali 3. Gre za dobro topno učinkovino, pri kateri je razlog za dvom glede uvrstitve permeabilnost, zaradi nezadostnosti literarnih podatkov (65% učinkovine se je izločilo z urinom, 70 - 90% odmerka je absorbiranega). Zaradi aktivnega transportnega mehanizma pa je permeabilnost skozi CaCO_2 celice zelo visoka, tudi odstotek izločene učinkovine z blatom je zelo majhen, s čimer lahko zaključimo, da je absorpcija modelne učinkovine skoraj popolna, hkrati pa jo tudi lažje uvrstimo v BCS razred 1 kot 3 (28).

3.2.2. MODELNA FORMULACIJA / REFERENČNO ORIGINATORSKO ZDRAVILO (RLD)

Modelna formulacija je sestavljena iz 2 primarnih surovin, modelne zdravilne učinkovine in smukca v okvirnem razmerju 2:1 (Preglednica IV). Modelna učinkovina nastopa kot aktivna farmacevtska učinkovina, smukec pa kot neaktivna pomožna snov in ima nalogo polnila.

Zmes teh dveh surovin je fizikalna zmes, pripravljena v procesu sejanja in mešanja ter polnjenja v trdne želatinske kapsule. Pakirana je HDPE plastenke po 100 kapsul in zaščitena s PE/PET/Al folijo. Pogoji shranjevanja so priporočeni pod 25°C, zaščiteno pred vlago.

Preglednica IV: Vhodne surovine za pripravo zmesi za kapsuliranje

Komponenta	Kakovost določena po	Funkcija	Količina
<i>Zmes za kapsuliranje</i>			
Modelna učinkovina	Ph.Int.	Aktivna snov – zdravilna učinkovina	250 mg
Smukec	USP	Polnilo	135 mg

3.2.3. SMUKCI

Proizvajalec Imifabi, Industria Mineraria Italiana Fabi S.p.A. Postalesio, Italija;

proizvodni obrat Benwood, West Virginia, ZDA:

- Smukec Imifabi, Talc 3355, kontrolna številka: PFJ10970
- Smukec Imifabi, Talc 3355, kontrolna številka: PFJ12440
- Smukec Imifabi, Talc 3355, kontrolna številka: PFJ12900
- Smukec Imifabi, Talc 3355 Dense, kontrolna številka: PFK1178P
- Smukec Imifabi, Talc 3355 Dense, kontrolna številka: PFK1114P
- Smukec Imifabi, Talc 3355 Dense, kontrolna številka: PFK1010P

Proizvajalec Luzenac, Imerys talc, Pointner&Rothschadl GMBH, Salzburg, Avstrija:

- Smukec Luzenac, S289/3, Luzenac Pharma

Proizvajalec Mondo Minerals B.V. Amsterdam, Nizozemska:

- Smukec Mondo, Microtalc Pharma 30, kontrolna številka: 1500667
- Smukec Mondo, Microtalc Pharma 50, kontrolna številka: 1500409

3.2.4. PRIPRAVLJENE ZMESI

001X-M – fizikalna zmes z modelno učinkovino s serijsko številko 1 in smukcem proizvajalca Imifabi – PFJ12900 (»ustrezen« smukec)

002X-M – fizikalna zmes z modelno učinkovino s serijsko številko 1 in smukcem proizvajalca Imifabi – PFK1114P (»delno ustrezen« smukec)

003X-M – fizikalna zmes z modelno učinkovino s serijsko številko 1 in smukcem proizvajalca Luzenac – S289/13 (»delno neustrezen« smukec)

004X-M – fizikalna zmes z modelno učinkovino s serijsko številko 1 in smukcem proizvajalca Mondo – 1500409 (»neustrezen« smukec)

3.2.5. REFERENČNE FORMULACIJE/ORIGINATORSKA ZDRAVILA (RLD)

- 12H0006P – REF 1
- 13K0008P – REF 2

3.2.6. ZMESI IZ RAZVOJNIH SERIJ

- **TEH 1** – zmes tehnične serije 1 (uspešna serija), smukec Luzenac
- **TEH 2** – zmes tehnične serije 2 (neuspešna serija), smukec Luzenac
- **TEH 3** - zmes tehnične serije 3 (neuspešna serija), smukec Luzenac

3.3. SNOVI, UPORABLJENE PRI DELU

3.3.1. SPOJINE ZA PRIPRAVO RAZTOPIN IN IZVEDBO MERITEV

- Natrijev-1-dekansulfonat, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija, M = 244,33 g/mol
- Kalijev dihidrogenfosfat, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija, M = 136,08 g/mol
- Dilut – IT, koncentrat za pripravo fosfatnega pufra s pH = 6,8, J.T.Baker, Avantor Performance Materials B.V., Deventer, Nizozemska
- Natrijev hidroksid, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija, M = 40,00 g/mol

3.3.2. TOPILA

- Acetonitril, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija, M = 41,05 g/mol
- Glacialna očetna kislina, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija, M = 60,05 g/mol
- Demineralizirana voda, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija
- Bidestilirana voda, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija

3.3.3. OSTALI REAGENTI IN MATERIALI

- Tween 80 (PSD) – K46921061 534, Merck KGaA, Darmstadt, 1L=1,07 kg
- Parafinsko olje – serijska številka: K46427662 521 , Merck KGaA, Darmstadt, 1L=0,86 kg
- Trde želatinske kapsule Qualicaps, velikost 1, Mitsubishi Chemical Holdings Corporation, North Carolina, ZDA

3.4. RAZTOPINE

- **0,2M NaOH**

V litrsko bučo smo prenesli 200 mL standardizirane raztopine 1M NaOH in z demineralizirano vodo dopolnili do oznake.

- **0,2 M KH₂PO₄**

Natehtali smo 27,22 g KH₂PO₄ in raztopili v 800 mL demineralizirane vode in dobro premešali. Z demineralizirano vodo smo nato dopolnili do oznake 1000 mL in zopet dobro premešali.

- **Medij za raztapljanje:**

- **0,05 M K-fosfatni pufer, pH = 6,8(Ph.Eur, USP)**

Za pripravo 1L K-fosfatnega pufera s pH = 6,8 smo v 1 L buči zmešali 250 mL 0,2 M KH₂PO₄ in 112 mL 0,2 M NaOH ter z demineralizirano vodo dopolnili do oznake in dobro premešali. Medij smo odzračili in preverili pH. Po potrebi uravnamo pH s pomočjo 0,2 M NaOH do pH = 6,8 ± 0,05.

- **Dilut – IT, koncentrat za pripravo fosfatnega pufera s pH = 6,8**

Koncentrat smo prelili v 1000 mL merilni valj in z demineralizirano vodo dopolnili do 1 L. Raztopino smo prelili v 10 L vedro in s pomočjo 5 L buče dodali 5 L demineralizirane vode. Preverili smo pH (pH = 6,8 ± 0,05), medij odzračili ter segreli.

- **Mobilna faza – pufer pH = 4,4**

V 1 L buči smo v 800 mL demineralizirane vode raztopili 0,5 g Na-1-dekansulfonata (C₁₀H₂₁NaO₃S). Dodali smo 50 mL CH₃CN in 5 mL glacialne CH₃COOH ter uravnali pH na 4,4 z 1 M NaOH.

- **Standardna raztopina modelne učinkovine, c = 0,25 mg/mL**

Natehtali smo točno 25 mg delovnega standarda modelne učinkovine, kvantitativno prenesli v 100 mL bučko in ga raztopili v 0,05 M K-fosfatnem pufru. Bučko smo dopolnili do oznake in dobro premešali. Pripravili smo 2 paraleli standardne raztopine.

- **Raztopine čiste zdravilne učinkovine za umeritveno premico**

- 1) Pripravili smo 2 natehti čiste učinkovine (0,0105 g in 0,0257 g) za pripravo 2 različnih koncentracij (0,105 mg/mL in 0,257 mg/mL). Učinkovini smo nato kvantitativno prenesli v 250 mL bučki in ju raztopili v 0,05 M K-fosfatnem puftru. Bučki smo dopolnili do oznake in dali mešati na magnetno mešalo 10 min, nato v UZ kadičko 10 min in še enkrat na magnetno mešalo za 10 min, da se je učinkovino popolnoma raztopila. Redčitve smo nato pripravili tako, da smo iz prve raztopine odmerili 1 mL in prenesli v 10 mL bučko in redčili s fosfatnim pufrom do oznake (1:10). Naslednje redčitve smo pripravili tako, da smo iz raztopine s koncentracijo 0,257 mg/mL odmerili 1 mL in redčili do 10 mL (1:10), nato smo odmerili 5 mL in redčili do 10 mL (1:2) in na koncu odmerili 8 mL in redčili do 10 mL z 0,05 M K-fosfatnim pufrom (8:10).
- 2) V drugem poizkusu smo zopet pripravili 2 natehti čiste učinkovine (0,0154 g in 0,0254 g) in ju po istem postopku kot prvi raztopili v 0,05 M K-fosfatnem puftru v 250 mL bučkah in prav tako 10 min mešali z magnetnim mešalom, 10 min v UZ kadički in nato še 10 min na magnetnem mešalu. Razredčitve smo tokrat pripravljali z naslednjimi redčitvami: iz prve raztopine (s koncentracijo 0,154 mg/mL) smo odmerili 1 mL in redčili do 10 mL (redčitev 1:10), ter 5 mL in redčili do 10 mL (redčitev 1:2). Nato smo iz raztopine s koncentracijo 0,254 mg/mL odmerili 1 mL in redčili do 10 mL (1:10) ter 8 mL in redčili z 0,05 M K-fosfatnim pufrom do 10 mL (8:10).

3.5. METODE IN ANALITSKI POSTOPKI

3.5.1. Priprava zmesi z modelno učinkovino in polnjenje kapsul

Referenčno originatorsko zdravilo je sestavljeno iz suhe fizikalne zmesi, polnjene v trdne želatinske kapsule. Ker zdravilo vsebuje poleg zdravilne učinkovine le eno pomožno snov – smukec, je proces izdelave preprost in sestoji predvsem iz faze mešanja in sejanja.

Uporabljena oprema:

Precizna tehtnica Mettler Toledo XS2002S

Analitska tehtnica Mettler Toledo AX205DR

Sito 1,00 mm

Postopek dela:

Natančno smo natehtali smukec in modelno učinkovino (Preglednica 5). Surovini smo nato stresli v plastično vrečko in ročno mešali 5 min. Zmes smo nato presejali skozi sito 1,00 mm in jo pretresli nazaj v vrečko. Ročno smo mešali še 5 min. Za ročno polnjenje kapsul smo pripravili 20 kapsul za posamezno zmes in jih napolnili. Preostanek zmesi smo shranili za nadaljnje analize.

Preglednica V: Sestava za pripravo zmesi in kosovnica za ročno kapsuliranje

SUROVINA	KOLIČINA / kos	IZRAČUN. KOLIČINA za celotno zmes
Zmes za kapsuliranje (za 50 kapsul)		
Modelna učinkovina	253,036 mg	12,652 g
Smukec	131,964 mg	6,598 g
SKUPAJ	385,000 mg	19,250 g
Kapsuliranje		
Zmes za kapsuliranje	385,000 mg	
Kapsule velikost 1	1 kos	

3.5.2. Izolacija smukca

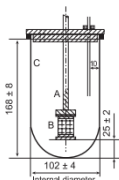
Izolirali smo smukca iz referenčnega originatorskega zdravila in iz zmesi, ki je vstopala v neuspešno tehnično serijo (TEH 2). Izolacija je potekala tako, da smo vsebino desetih kapsul

stresli v 50mL centrifugirko in dodali 50 mL demineralizirane vode s temperaturo 37°C. Vsebinsko smo dobro premešali na visoko hitrostnem mešalniku in vzorec vstavili v centrifugo. Centrifugirali smo 2 min pri 2500 obratih na minuto. Nato smo odlili supernatant in še enkrat dodali 50 mL vode ter postopek mešanja in centrifugiranja ponovili. Zopet smo odlili supernatant in dodali 25 mL demineralizirane vode ter suspenzijo filtrirali. Smukec smo posušili v vakuumskem sušilniku.

3.5.3. Testi sproščanja

Napravi za izvedbo analize:

- Aparat za raztapljanje: aparat 1 po USP (košarice), Agilent technologies, 708-DS
- Avtomatski vzorčevalnik: Agilent technologies, 850-DS
- HPLC: Agilent technologies 1100 series (Slika 6)



Slika 5: Posoda za raztapljanje aparature 1 po USP (s košaricami)



Slika 6: HPLC naprava

Parametri meritev in izvedba analiz:

3.5.3.1. Raztapljanje farmacevtske oblike

Preglednica VI: Parametri procesa raztapljanja kapsul

Količina medija za raztapljanje	900 mL
Hitrost vrtenja košaric	100 vrt./min
Temperatura	(37± 0,5)°C
Čas vzorčenja	45 min
Razdalja med dnom posode in spodnjim robom košarice	(2,5 ± 0,2) cm
Filtracija	Membranski PVDF, velikost por 1 µm, premer 25mm

Priprava medija za raztapljanje:

Fosfatni pufer pH 6,8 (brezzračen) (glej poglavje 3.4).

Priprava standardne raztopine:

Natehtali smo točno 25 mg standarda, ga kvantitativno prenesli v 100 mL bučko in ga raztopili v mediju za raztapljanje. Bučko smo dopolnili do oznake in dobro premešali. ($c = 0,25\text{mg/mL}$. Glej poglavje 3.4. Raztopine.)

Postopek:

Teste sproščanja smo izvajali po USP predpisu za modelno učinkovino na 4 vzorcih, ki smo jih pripravili z ročnim polnjenjem kapsul pripravljenih zmesi (001X-M, 002X-M, 003X-M in 004X-M). Vsak vzorec smo merili v 6 paralelah in vzorčili v 6 časovnih točkah (5min, 10min, 15min, 20min, 30min in 45min). Teste smo izvajali po parametrih, predpisanih v Preglednici VI. Pripravili smo aparat za raztapljanje po USP. Prenesli smo 900 mL brezračnega medija v posodo za raztapljanje. Ko se je vzpostavila konstantna temperatura ($37 \pm 0,5$)°C smo v košarico dali eno kapsulo. Istočasno smo vklopili tudi vrtenje košaric. Po 5 min mešanja smo vzorčili prvih 10 mL testne raztopine z mesta, ki je na sredini med površino medija za raztapljanje in zgornjim robom košarice ter ni bilo kot 1 cm oddaljeno od stene posode. Odzeti vzorec smo filtrirali skozi membranski filter, pri tem smo prvih 5 mL filtrata zavrgli. Postopek vzorčenja testne raztopine in filtracije smo ponovili še po 10 min, 15 min, 30 min in 45 min mešanja. Vsebnost modelne učinkovine smo nato določevali s HPLC metodo.

3.5.3.2. Priprava vzorcev za umeritveno premico

Pred analiziranjem dejanskih vzorcev smo s pomočjo čiste zdravilne učinkovine pripravili raztopine z različnimi redčitvami za pripravo umeritvene premice. Koncentracijski razpon, ki smo ga želeli pokriti s pomočjo premice je bil od okvirno 5 - 100% koncentracije standardne raztopine (0,01 – 0,25 mg/mL) (Preglednica VII) (glej poglavje 3.4). Za statistično relevantne rezultate smo pomerili 6 različnih koncentracij.

Preglednica VII: Vzorci in redčitve za pripravo umeritvene premice 1

	Masa zatehte [g]	Redčitev	c [mg/mL]
Vz. 1	-	1:10 (Vz. 3)	0,0105
Vz. 2	-	1:10 (Vz. 6)	0,025
Vz. 3	0,0105	-	0,105
Vz. 4	-	1:2 (Vz. 6)	0,125
Vz. 5	-	8:10 (Vz. 6)	0,2056
Vz. 6	0,0257	-	0,257

Preglednica VIII: Vzorci in redčitve za pripravo umeritvene premice 2

	Masa zatehte [g]	Redčitev	c [mg/mL]
1	-	1:10 (Vz. 4)	0,0154
2	-	1:10 (Vz. 6)	0,0254
3	-	5:10 (Vz. 4)	0,077
4	0,0154	-	0,154
5	-	8:10 (Vz. 6)	0,2032
6	0,0254	-	0,254

Enačba za preračun vsebnosti zdravilne učinkovine:

$$y = k x + n$$

$$A = k c + n$$

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

c – koncentracija, *A* – površina signala HPLC

Enačba 1: Izpeljava enačbe za preračun vsebnosti iz umeritvene premice

HPLC smo pred injiciranjem stabilizirali tako, da smo čez noč pustili pretok mobilne faze skozi sistem na 0,2 mL/min. Pred meritvijo smo injicirali medij za raztapljanje in preverili stabilnost bazne linije. Za izvedbo testa ustreznosti kromatografskega sistema smo vzorec delovnega standarda modelna učinkovina 3-krat aplicirali v sistem, pri čemer RSD ni smel odstopati za več kot ±2,0%. Za merjenje vzorcev smo vzorce iz predhodnih testov raztapljanja zložili v stojala za vzorce in še enkrat preverili ustreznost nastavljenih parametrov in začeli z meritvami. Zaradi velikega števila vzorcev (144) smo meritev pustili delovati čez noč. Koncentracije vzorcev smo nato preračunali po

Enačba 1 s tem da smo pri preračunu upoštevali še dejansko vsebnost učinkovine (98,8%).

3.5.3.3. HPLC določevanje koncentracije sproščene učinkovine

Preglednica IX: HPLC parametri

Mobilna faza	pufer pH = 4,4
Pretok	1,0 mL/min
Kolona	Hypersil BDS C18 5µm, 250 x 4,6 mm
Temperatura kolone	30°C
Volumen injiciranja	10 µL
Vrsta detektorja	UV
Valovna dolžina detekcije	219 nm
Sampling rate	2 pt/sec
Retencijski čas učinkovine	8,5 min

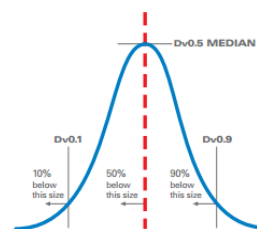
3.5.4. Analiza velikostne porazdelitve delcev - PSD

»Particle size distribution« - Metoda porazdelitve velikosti delcev je tehnika merjenja velikosti delcev s pomočjo sipanja laserske svetlobe. Meritev poteka tako, da naprava meri količino in smer sipane svetlobe, ko z laserskim žarkom presvetlimo suho ali mokro disperzijo. Ti podatki so nato obdelani in prikazani kot velikost delcev, ki so povzročili določeni vzorec sipanja laserske svetlobe (6, 26, 32). Metoda nam poda vrednosti v naslednjih oblikah: ko gre za simetrično porazdelitev dobimo vrednosti »Mean« (povprečje), kar nam podaja srednjo vrednost vseh dobljenih rezultatov (Enačba 2):

$$D[3,2] = \frac{\sum Di^3}{\sum Di^2} \quad Di - \text{premer posameznega delca}$$

Enačba 2: Enačba za izračun srednje vrednosti za površino delcev

Z distribucijsko širino določamo širino grafa porazdelitve rezultatov s standardno deviacijo (STDEV). Uporablja se predvsem ko gre za normalno porazdelitev. Pri metodi podajanja rezultatov s 3 vrednostmi na x-osi pa določamo širino grafa porazdelitve na način, ki je v farmaciji najbolj zaželen in sicer tako, da določimo $d(0,1)$, $d(0,5)$ in $d(0,9)$. $D(0,1)$ določa vrednost, pri kateri 10% analizirane populacije leži pod to vrednostjo, $d(0,5)$ vrednost mediane (ang. »median«), za $d(0,9)$ pa velja, da pod to vrednostjo leži 90% analizirane populacije delcev (Slika 7).



Slika 7: Metoda 3 vrednosti na x-osi

Uporabljena naprava:

Malvern Mastersizer 2000

Parametri meritve:

Preglednica X: Parametri meritev PSD

Analizni model	General purpose, normal sensitivity, irregular particles
Lomni količnik	1,7
Absorpcija	0,01
Lomni količnik medija	1,33
Čas meritve	6s
Zatemnitev	10% - 20%
Hitrost mešala	2500 obr/minuto
Izvedba meritve	po 1 min

Priprava vzorcev in potek meritev:

Parametre meritev smo nastavili kot je navedeno v preglednici X. Pri meritvah smo disperzno celico v aparaturi Malvern Mastersizer 2000 napolnili z demineralizirano vodo in dodali 1 kapljico Tweena 80. Po minuti mešanja smo pomerili ozadje vode in Tween-a. Čas merjenja ozadja mora biti enak času merjenja vzorca. Vzorec smo dodali s spatulo do ustrezne zatemnitve (10% - 20%) in ga pomerili. Meritve smo izvajali pri temperaturi 20-27°C. Po vsaki meritvi smo disperzno celico dvakrat spirali z demineralizirano vodo in mešali 1 minuto.

3.5.5. Merjenje specifične površine z metodo BET

BET -Brunauer, Emmett, Teller je metoda določanja specifične površine z adsorpcijo plina (Slika 8). Metoda temelji na principu večslojne adsorpcije plina na površino delca iz katere se izračuna količina adsorbiranega plina, ki ustreza količini adsorbata v monomolekularnem sloju na površini delca. Fizikalna adsorpcija molekul plina je rezultat relativno šibkih molekulskih Van der Waalsovih sil med adsorbentom in delcem prahu. Pri tem se najpogosteje uporablja nekorozivne pline kot so dušik, argon, ogljikov dioksid. Količina adsorbiranega plina se lahko meri z volumetrično ali pretočno metodo. Metoda BET je nadgradnja Langmuirjeve teorije, ki temelji na adsorpciji monoplasti plina na delce s predpostavkami:

- Molekule plina se fizikalno adsorbirajo na delce
- Med posameznimi plastmi ni interakcij
- Langmuirjeva teorija se lahko uporabi za vsako posamezno plast (6, 33).

Meritve se izvajajo v 3 paralelah, v primeru nelinearnosti, kjer so parcialni tlaki v bližini $0,3\text{m}^2/\text{g}$ pa je priporočljivo večje število meritev (35). Volumen adsorbiranega plina nato izračunamo po spodnji enačbi (Enačba 3):

$$V_{\text{total}} = \frac{V_{\text{mono}} C \left(\frac{P}{P_0} \right)}{\left(1 - \frac{P}{P_0} \right) \left(1 + C \left(\frac{P}{P_0} \right) - \frac{P}{P_0} \right)}$$

Enačba 3: BET enačba

P = parcialni tlak adsorbiranega plina v ravnotežju pri 77.4K [Pa]

P_o = nasičeni tlak adsorbiranega plina [Pa]

V_a = volumen adsorbiranega plina pri standardni temperaturi in atmosferskem tlaku [mL]

V_m = volumen adsorbiranega plina pri standardnih pogojih potrebnega za tvorbo monoplasti

C = brezdimenzijska konstanta povezana z adsorpcijsko entalpijo adsorbiranega plina na preizkovani vzorec

Priprava vzorcev in metode merjenja:

i. Degaziranje/razplinjenje:

Vsak vzorec mora biti pred meritvijo razplinen, da se pripravi površino za adsorpcijo plina. Če vzorec ni primerno in dovolj razplinen bo metoda pokazala prenizko površino oziroma bodo rezultati zelo variabilni.

ii. Pogoji razplinjenja:

Pogoji razplinjenja morajo biti taki, da zagotovijo ponovljive rezultate. Razplinjenje se v večini primerov doseže z aplikacijo vakuuma in s prepihanjem nereaktivnega suhega plina.

iii. *Adsorpcijski plini:*

Standardne tehnike uporabljajo pri razplinjenju vzorcev plin dušik. Pri tem se proces izvaja pri temperaturi vrelišča tekočega dušika ($T_{\text{vrel.}} = -196^{\circ}\text{C}$).

iv. *Količina vzorca:*

Količina vzorca mora biti konstanta. Uporabi se toliko vzorca, da je skupna površina vzorca večja kot 1m^2 .

v. *Volumetrična metoda*

Deluje tako, da se v merilno celico, ki je potopljena v tekoči dušik dodaja dušik in določa količino adsorbiranega plina v odvisnosti od tlaka v celici.

Naprave:

BET: Micrometrics Tristar 3000

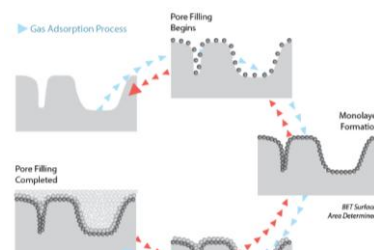
Razplinjevalec: Micrometrics Flovprep 060

Parametri meritev in potek merjenja:

Preglednica XI: Parametri BET meritev

Količina vzorca	100 – 150 mg
Razplinjenje	2h, vakuum
Območje parcialnih tlakov	0,05 – 0,3
Število točk	6
Minimalni korelacijski koeficient	0,9975
Priprava analize	
Nastavljena vrednost hitre evakuacije	50 mmHg/s
Nastavitev vakuuma	10 mmHg
Čas evakuacije	0,5 ur
Čas preizkusa tesnjenja	120 s
Mrtvi volumen	
Izmeri	Da
Znižaj Dewarjevo posodo za evakuacijo	Da
Evakuacijski čas	0,5 h
Število paralelk	3

Meritve smo izvajali po predpisih v preglednici XI. Pred meritvami smo natančno stehali prazne celice za meritve in vanje natančno natehtali vzorec v 3 paralelah. Stehtali in zabeležili



Slika 8: Princip adsorpcije in desorpcije molekul plina na preiskovani vzorec (34)

smo težo polne celice in jih razplinjevali v vakuumu 2 uri. Po razplinjenju smo zopet stehali težo celic in jih vpeli v napravo. Uporabili smo volumetrično metodo za merjenje specifične površine, ki je neodvisna od vzorca. Pred začetkom meritve smo celice potopili v Dewarjevo posodo s tekočim dušikom. Po končanih meritvah smo zopet stehali celice z vzorcem in določili razliko mase, kar je pokazatelj količine adsorbiranega plina.

3.5.6. Merjenje izgube vlage pri sušenju - IPS

Izguba pri sušenju (IPS) je metoda merjenja vsebnosti vlage (vode ali drugih topil) v trdnih in poltrdnih vzorcih. Gre za metodo pri kateri se vzorec predhodno stehta in nato izpostavi programu segrevanja določen čas, pri določeni temperaturi in nato ponovno stehta. Gre za direktno proporcionalnost izgube vlage glede na izgubo teže vzorca. Halogenski merilniki izgube vlage samodejno merijo in segrevajo ter preko preračuna izgubljene mase določajo % izgubljene vlage.

Uporabljena naprava:

Mettler Toledo HR73

Parametri meritev in potek merjenja:

Preglednica XII: Parametri IPS meritev

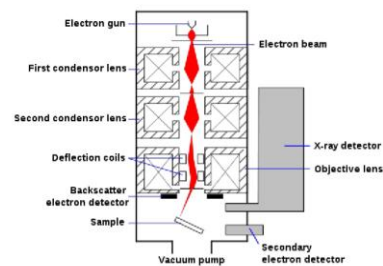
Količina vzorca	10g
Temperatura	105°C
Čas meritve	10min
Program merjenja	Standardni – po dosegu željene temperature le-to vzdržuje konstantno tekom meritve
Izpis	minutni

Pred samo uporabo halogenskega merilnika izgube vlage je potrebno aparat kalibrirati s pomočjo standardizirane uteži. Po uspešni kalibraciji smo v napravo vstavili pladenj na katerega smo direktno natehtali določeno količino vzorca (10g). Pred tem smo v napravo vnesli zgoraj navedene parametre merjenja (Preglednica XII) in začeli analizo. Naprava je sproti preračunavala % izgube mase/vlage.

3.5.7. Pregled vzorcev z vrstičnim elektronskim mikroskopom SEM

Vrstični elektronski mikroskop je vrsta elektronskega mikroskopa, ki s pomočjo snopa elektronov skenira površino vzorca in nam daje podatke o morfologiji in sestavi vzorca.

Mikroskop deluje na principu interakcije poslanih elektronov z materialom, pri čemer po stiku primarnega elektrona poslani elektroni izgubijo energijo s tem danaključno sipajo in adsorbirajo po vzorcu. Rezultat tega je odboj visokoenergetskih elektronov z elastičnim sipanjem, emisijo sekundarnih elektronov z neelastičnim sipanjem in emisijo elektromagnetnega sevanja. Prejete signale obdelata pomnoževalca in prikaže kot sliko z različnimi intenzitetami. Hkrati dobimo s pomočjo signalov visokoresolucijsko sliko površine in morfologije delcev (reliefnosti površine delca, lamelarnost, možne razpoke in druge posebnosti) (Slika 9). Za analizo z elektronskim mikroskopom nekateri vzorci potrebujejo predpripravo, saj je pogoj za meritve prevodnost samega vzorca, zato moramo določene materiale kot so razni prahovi, beton, keramika in biološki vzorci naprašiti oziroma prevleči s tanko plastjo zelo prevodne kovine kot sta zlato in srebro (36, 38, 39).



Uporabljena naprava:

Jeol JSM-IT300 LV

Postopek dela:

Na prevodni trak, ki smo ga predhodno namestili na nosilec smo nanesti tanko plast vzorca. Odvečno količino vzorca smo spihali z dušikom. Vzorca ni bilo potrebno napraševati s kovino. Vzorec smo vpeli na nosilno držalo in privili z vijaki. Pred začetkom meritev smo izenačili tlak v prostoru z vzorcem z zunanjim tlakom. Vzorec smo z nosilnim držalom vstavili v napravo. Vključili smo možnost visokega vakuuma. S pomočjo programa smo zajeli slike po čim večjem področju in pri 3 različnih povečavah: 50x, 200x in 500x.

3.5.8. Sejalna analiza

Sejanje je ena izmed najstarejših fizikalnih metod za proučevanje velikosti delcev prahov in granul in s tem določanja finosti prahov in granulotov. S pomočjo sit separiramo oziroma ločimo delce glede na njihovo povprečno velikost (širino ali dolžino, odvisno kako se delec na

mreži med sejanjem obrne). Večinoma se uporablja mehansko sejanje, pri čemer s stresanjem sit povzročimo vertikalno in horizontalno gibanje delcev in s tem pospešimo sejanje. To velja predvsem za vzorce, pri katerih so delci večji od 75 µm in je njihova teža sama po sebi dovolj velika, da nima tendence do vezave na mrežo sita ali agregacije s preostalimi delci. Za prahove in granulate z manjšimi delci pa je priporočeno sejanje s pomočjo zračnega curka (ang. »air jet«), ki delce usmeri in pospeši navzdol in s silo prepreči agregacijo ali prijemanje delcev na sita. Ne glede na to, pa se lahko sejanje uporablja kot metodo za določanje velikosti v vseh primerih, ko je metodo možno validirati. Sejanje je v farmaciji ponavadi metoda izbire za klasifikacijo prahov in granul z večjim velikostnim razredom delcev, predvsem pa je prva metoda izbire pri vzorcih, pri katerih je možna analiza samo v suhih pogojih. Analizo lahko izvajamo na vseh vzorcih, katerih imamo na voljo vsaj 25 g, predvsem je količina vzorca potrebnega za analizo odvisna od njegovega nasipnega volumna, in pa na vzorcih, ki se ne nagibajo k agregaciji in lepljenju na sita. Kot merilo lahko pri podajanju rezultatov uporabimo odstotek vzorca, ki po sejanju ostane na situ določene velikosti ali velikost sita, preko katerega preide ne manj 97% vzorca (mesh). Pri določanju odstotka mase vzorca, ki ostane na situ govorimo o 4 velikostnih razredih: »grob prah« (ne več kot 95% preide sito 1400 µm in ne več kot 40% preide skozi sito 355 µm), »relativno fin prah« (ne več kot 95% preide sito 355 µm in ne več kot 40% preide skozi sito 180 µm), »fin prah« (ne več kot 95% preide sito 180 µm in ne več kot 40% preide skozi sito 125 µm) in »zelo fin prah« (ne več kot 95% preide sito 1400 µm in ne več kot 40% preide skozi sito 355 µm).

Uporabljene naprave:

Digitalna tehtnica Radwag 4500 PS

Stresalnik in sita Retsch AS200 control

Parametri meritve:

Preglednica XIII: Parametri sejalnih analiz

Količina vzorca	50 g (smukci) 30 g (zmesi)
Amplituda stresanja	0,60
Čas meritve	10 min
Prekinjeno	Da
Režim vlage	RH ≤ 30%

Postopek dela:

Pred začetkom merjenja smo pripravili sita velikosti 200 μm , 100 μm , 45 μm in dno in jih vsakega posamezno stehtali. Zložili smo jih od največjega zgoraj do dna spodaj. Natehtali smo približno 30 g vzorca in ga stresli na zgornje sito. Sita smo vpeli v stresalnik, vnesli parametre (Preglednica XIII) in začeli stresanje. Po končanem stresanju smo vsako sito posebej previdno stehtali, brez da bi samo sito preveč pretresali in s tem spremenili količino preostalega vzorca na situ. Pred naslednjo meritvijo smo sita po ustaljenem postopku očistili in razpihali preostanke vzorca. V_n – volumen vzorca pred zbijanjem

3.5.9. Nasipni in zbiti volumen/gostota

Nasipni in zbiti volumen sta parametra, ki ju določamo prahovom, zmesem in granulatom in sta pomembna faktorja, ko načrtujemo procese in naprave, ki jih bomo uporabljali za izdelavo neke farmacevtske oblike, saj sta le-ta parametra bistvena pri izbiri primernih volumnov opreme s katero bomo rokovali pri obdelavi vzorca. Nasipni volumen je parameter, ki ga dobimo, ko neko snov stresemo v merilno posodo brez, da bi nanj izvajali kakršenkoli fizikalni vpliv, ki bi utegnil povzročiti premik delcev. Pred tem je pomembno, da vzorec, ki ga proučujemo natančno stehtamo, saj potem s pomočjo odčitane volumna na merilnem valju in mase preračunamo tako volumen, ki ga zasede vzorec (podajamo v mL/g) kot tudi nasipno gostoto (podajamo v g/mL), ki ju izračunamo po spodnjih enačbah. Zbiti volumen pa določamo tako, da po odčitaniu nasipnega volumna merilni valj vpne v stresalno napravo, kjer z določeno amplitudo določen čas na vzorec izvajamo silo s katero zbijamo vzorec. Po tem zopet odčitamo volumen na valju in iz tega preračunamo zbiti volumen in zbito gostoto po spodnjih enačbah (5):

$$\rho_n = \frac{m}{V_n} \quad \text{Enačba 4: Enačba za preračun nasipne gostote [g/mL]}$$

$$V_n = \frac{V_o}{m} \quad \text{Enačba 5: Enačba za preračun nasipnega volumna [mL/g]}$$

$$\rho_{zb} = \frac{m}{V_{zb}} \quad \text{Enačba 6: Enačba za preračun zbite gostote [g/mL]}$$

$$V_{zb} = \frac{V_k}{m} \quad \text{Enačba 7: Enačba za preračun zbitega volumna [mL/g]}$$

V_n – volumen vzorca pred zbijanjem
 ρ_n - nasipna gostota
 m - masa
 V_k – končni volumen (zbiti)

V_{zb} - zbiti volumen vzorca
 ρ_T zbita gostota
 V_o – začetni volumen (nasipni)

Uporabljena naprava:

Nasipni/zbiti volumen – Erweka SVM222

Digitalna tehtnica Radwag 4500 PS

Parametri meritev:

Preglednica XIV: Parametri meritev zbitega volumna

Količina vzorca	50g
Število udarcev	1250

Potek dela:

Vzorec smo pred tehtanjem homogenizirali. Na list papirja smo natehtali 50 g vzorca in ga stresli v 250 mL valj (Preglednica XIV). Odčitali smo volumen vzorca. Po odčitaniu smo valj vpeli v napravo za zbijanje prahov, vnesli ustrezne parametre meritve (Preglednica XIV)). Po končanem zbijanju smo zopet odčitali volumen, ki ga zaseda vzorec in preračunali dobljene rezultate po zgoraj navedenih enačbah (glej *Enačba 4, Enačba 5, Enačba 6 in Enačba 7*).

3.5.10. Stisljivost in pretočnost

Pretočne lastnosti prahov opišemo s Carrovim indeksom in Hausner-jevimi razmerjem. Za pridobitev teh informacij ni potrebno izvajati dodatnih analiz, če izvajamo analizo za zbiti volumen vendar uporabimo že dobljene vrednosti za preračun po naslednjih enačbah:

$$CI = 100 \times \frac{\rho_{zb} - \rho_n}{\rho_{zb}}$$

Enačba 8: Enačba za preračun indeksa stisljivosti

$$H = \frac{\rho_{zb}}{\rho_n}$$

Enačba 9: Enačba za preračun Hausnerjevega razmerja

3.5.11. Pregled vzorcev z optičnim mikroskopom s polarizirano svetlobo

Svetlobni mikroskop s polarizirano svetlobo se rutinsko uporablja pri proučevanju materialov in geologiji za identifikacijo materialov na podlagi refrakcijskega faktorja in svetlobe. Za izvedbo mikroskopiranja s polarizirano svetlobo potrebujemo optični mikroskop z 2 dodatnima komponentama – za detekcijo je potrebna linearna svetloba za osvetlitev, zaradi česar potrebujemo dva polarizacijska filtra, ki ustvarjata polarizirano svetlobo za osvetlitev opazovanega delca in sekundarni polarizacijski filter, ki prepreči zaznavanje odbite svetlobe.

Določeni mikroskopi poleg klasičnega opazovanja omogočajo tudi določanje velikosti delcev s pomočjo računalniških orodij in ročnega označevanja, ter kasnejšo statistično obdelavo pridobljenih informacij (40, 41).

Uporabljena naprava:

Leica CTR 6000

Postopek dela:

Vzorec smo predhodno dobro homogenizirali in ga s konico spatule nanесли na objektno steklo, ter ga enakomerno porazdelili po delu stekla, da smo dobili čim manj skupkov in prekrivanja. Na vzorec smo kapnili 1 kapljico parafinskega olja in pokrili s krovnim stekelcem. Vzorec smo vstavili v mikroskop in nastavili polarizirano svetlobo ter 50-kratno povečavo. S pomočjo programa Clemex smo na vsaj 5 različnih vidnih poljih pregledali in označili delce ter jim določili velikosti.

3.5.12. Analiza vzorcev z Ramanskim spektrometrom

Ramanska spektroskopija je zelo uporabna za merjenje in zaznavanje nepolarnih vezi, funkcionalnih skupin in vezi, ki so zelo simetrične, vendar je manj občutljiva na polarne vezi in nesimetrične vezi. Pri Ramanski spektroskopiji je vzorec osvetljen z močno monokromatsko svetlobo, večinoma lasersko. Večina obsvetljene svetlobe je tudi odbita od vzorca z enako valovno dolžino kot vpadna svetloba; ta pojav imenujemo Raleigh-evo oziroma elastično sipanje. Le 10^{-6} - 10^{-8} vpadnih fotonov je odbitih z zamikom glede na valovno dolžino vstopne svetlobe; temu sipanju pravimo Ramansko sipanje oziroma neelastično sipanje. Razlika v valovni dolžini vpadne svetlobe in odbite svetlobe se imenuje Ramanski zamik in je enak molekulskega vibriranja znotraj vzorca. Ramanska analiza se lahko izvaja na tekočih, trdnih in plinastih vzorcih. Je primerna, neinvazivna metoda za določitev trdnega stanja in za kemijsko identifikacijo (npr. polimorfne oblike). Ramanska metoda je komplementarna infrardeči spektroskopiji, vendar sta različno občutljivi za določene funkcionalne skupine. Težava pri Ramanu pa se lahko pojavi zaradi fluorescence, ki jo oddajajo nečistote in del materiala, čemur se lahko izognemo z izbiro višjih valovnih dolžin. Ramanska spektroskopija je hitra in neinvazivna analitska metoda, ki se jo lahko izvaja medprocesno ali samostojno (ang. »in-line« in »offline«). Je primerna metoda tako za kemijske analize, pri katerih identificiramo in kvantificiramo aktivne substance in pomožne snovi, za

fizikalne analize kot so identifikacija in kvantifikacija trdnih oblik (polimorfov in solvatov) in kristaliničnosti ter za procesne analize, kjer spremljamo biološke ali kemijske reakcije, sinteze, kristalizacije, granularnost, mešanje, sušenje, liofilizacijo, ekstruzijo, enkapsuliranje in oblaganje. Vzorci pred meritvijo ne potrebujejo posebne obdelave in se jih lahko pomeri tudi skozi stene steklene vial.

Uporabljen naprava:

Renishaw InVia Reflex

Parametri meritev:

Preglednica XV: Parametri Ramanskih meritev

Določanje območja	
Tip uklonske mrežice	Statično (pri identifikaciji) Razširjeno (pri mapiranju)
Spektralno območje	Center = 800cm ⁻¹
Konfokalnost	standardna
Konfiguracija laserja	785nm
Konfiguracija uklonske mrežice	1200 I/mm (IR laser)
Zajem podatkov	
Čas osvetlitve	1 sekunda
Povečava	20x (pri identifikaciji) 5x (pri mapiranju)
Moč laserja	100 %
Metoda identifikacije	
Vrsta metode	Streamline aquisition
Pinhole	Izključen
Metoda mapiranja	
Vrsta metode	Pointmap
Pinhole	Vključen
Korak	10

Postopek merjenja:

Za konico spatule vzorca smukca smo prenesli na objektno steklo in ga s pomočjo spatule razporedili tako, da je bila zgornja površina čim bolj pritisnjena ob površino in ravna, zaradi lažje meritve. Vzorec smo namestili na mizico mikroskopa. V vidnem polju smo s pomočjo luči poiskali območje, ki smo ga želeli pomeriti. V programu WIRE smo nato kliknili ikono s

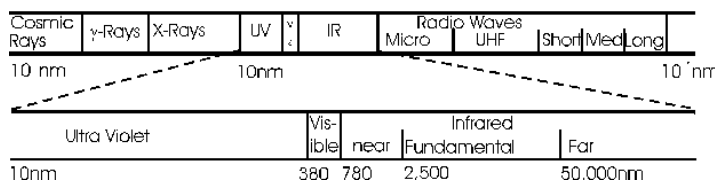
kamero za vizualni pregled vzorca, izbrali objektiv s primerno povečavo in sliko s pomočjo dvigovanja mizice izostrili. V programu smo nato določili parametre meritve, ki so zbrani v Preglednici XV in zagnali meritev. S pomočjo metode »Streamline acquisition« smo najprej pomerili vzorce smukca in jih identificirali ter primerjali s spektrom iz nabora spektrov v knjižnici. Po ustrezni identifikaciji smo pomerili vzorce pripravljenih zmesi in reference, s čimer smo lahko primerjali porazdelitev smukca in modelna učinkovina znotraj fizikalne zmesi. Zaradi težav z laserjem smo lahko pomerili samo dve pripravljene zmesi, zmes iz RLD in zmes, ki se je uporabljala v neustrezni registracijski seriji.

3.5.13. Analiza infrardečega spektra

Infrardeča spektroskopija je vrsta spektroskopije, ki za analizo vzorca uporablja svetlobo v infrardečem delu elektromagnetnega spektra s pomočjo katere lahko kvalitativno in kvantitativno proučimo vzorec. Infrardeča spektroskopija izkorišča dejstvo, da molekule absorbirajo določene frekvence, ki so značilne za njihovo strukturo. Te absorpcije so resonančne frekvence, t.i. frekvence absorbiranega sevanja, ki se ujemajo s prehodno energijo vezi ali skupine, ki vibrira. Infrardeči spekter vzorca se zabeleži s prehajanjem žarka infrardeče svetlobe skozi vzorec. Če je frekvenca IR enaka vibracijski frekvenci vezi, se pojavi absorpcija. Merjenje količine svetlobe, ki prehaja vzorec razkriva, koliko energije vzorec absorbira pri posamezni valovni dolžini. Takšno meritev je mogoče doseči s skeniranjem valovnih dolžin z monokromatorjem. Alternativno pa lahko poskeniramo celotno območje valovnih dolžin in s pomočjo Fourierove transformacije, ki nato generira rezultat absorbirane ali transmitirane svetlobe. Ta tehnika se navadno uporablja za analizo vzorcev s kovalentnimi vezmi. Pri vzorcih z nekaj IR aktivnimi vezmi in visoko stopnjo čistosti lahko dobimo enostavne spektre. Kompleksnejša sestava pa hkrati privede do večje absorbance in hkrati kompleksnejših spektrov.

Infrardeči spekter ponavadi delimo na 3 območja: bližnji (NIR), srednji (MIR) in oddaljeni (Slika 10), kar je mišljeno glede na frekvenco s katero je oddaljena od vidnega spektra. Bližnji IR spekter ponavadi zajema spekter z valovnim številom med $14000 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ (valovna dolžina $0,8 - 2,5 \text{ }\mu\text{m}$), srednji $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ($2,5 - 25 \text{ }\mu\text{m}$) in oddaljeni $400 - 10 \text{ cm}^{-1}$ ($25 -$

1000 μm). Za pretvorbo valovnih števil v valovno dolžino IR naprave za splošno laboratorijsko uporabo uporabljajo princip Fourierjeve transformacije (FT-IR).



Slika 10: Elektromagnetni spekter

Poznani sta dve tehniki snemanja spektrov, transmisijska in refleksijska. Pri transmisijski tehniki gre za prehod svetlobe skozi vzorec pri kateri se meri zmanjšanje intenzitete svetlobe, ki vzorec preide in se uporablja predvsem za plinaste in tekoče vzorce, če pa merimo v trdnem, moramo vzorec homogeno zmešati s KBr in stisniti v tabletko. Refleksijska tehnika je metoda, pri kateri se del svetlobe absorbira in del odbije in jo delimo na dve tehniki: ATR (oslabljena popolna odbojnost) in DR (razpršena difuzna odbojnost) (42).

3.5.13.1. Analiza IR spektra v srednjem območju – MID-IR

Infrardeči spekter v srednjem območju je kot že zgoraj opisano metoda za merjenje absorpcije elektromagnetnega sevanja v območju valovnem med 4000 in 400 cm^{-1} (kar ustreza valovni dolžini 2,5 - 25 μm). Razen, če ni v monografiji ali drugem potrjenem postopku drugače določeno, se za analizo spektrov uporablja območje od 3800 - 650 cm^{-1} (kar ustreza valovni dolžini 2,6 - 15 μm), da se zagotovi skladnost z monografijo za IR absorpcijo. IR v srednjem območju se uporablja predvsem za kvalitativno analizo trdnih, tekočih in plinastih vzorcev, lahko pa jo uporabimo tudi za kvantitativno določitev. Metoda snemanja IR spektra v srednjem IR območju je hkrati tudi farmakopejska metoda identifikacije za smukec, kjer je opredeljena kot 1. metoda identifikacije. Predpis predlaga izdelavo diska z dodatkom KBr, primerja pa se vrhove pri $3677 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$, $1018 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ in $669 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ (6).

Uporabljen naprava:

ThermoFisher Nexus Nicolet 20 STS Smart iTX

Postopek merjenja:

Meritev smo izvajali tako, da smo najprej pomerili ozadje, nato pa smo na površino za vzorec nanесли dovolj vzorca, da smo prekrili celotno področje, na katerem naprava meri spekter. Z vijakom pod katerim je vpeta monolitna diamantna konica smo zatesnili vzorec in s

programom EZ Omnic začeli meritev. Med meritvijo posameznih vzorcev smo površino za vzorec in konico dobro očistili s pomočjo etanola. Po identifikaciji vzorcev smukca smo posneli spektre tudi referenčnemu originatorskem zdravilu in pripravljenim zmesem.

3.5.13.2. Analiza spektra v bližnjem območju - NIR

Snemanje spektrov v bližnjem IR območju uporablja območje $12\ 800\ \text{cm}^{-1} - 4000\ \text{cm}^{-1}$ (0,78 – 2,5 μm). NIR vezi so veliko šibkejše od osnovnih vibracij v srednjem območju iz katerih izvirajo. Ker je absorpcija v NIR nizka, lahko vpadna svetloba prodre do nekaj milimetrov globoko v vzorec. Za razliko od ostalih, pa je steklo v tem delu spektra relativno transparentno, zaradi česar lahko meritve izvajamo direktno in-situ s čimer se razlikuje od ostalih meritev in se lahko uporablja tako medprocesno kot tudi samostojno (in-line in offline). NIR spektroskopija ima širok nabor uporabe: pri kemijskih analizah ga uporabljamo za identifikacijo različnih zdravilnih učinkovin, pomožnih snovi in kemijskih materialov; kvalifikacijo aktivnih učinkovin, ekscipientov, velikost odmerkov in »batch-to-batch« primerjave. Glede na rezultate, ki jih želimo, je odvisno katero metodo izberemo. Za kvalitativno določitev vzorca oziroma identifikacijo uporabimo refleksijsko metodo, za kvantitativno določitev vzorca pa uporabimo transmisijsko metodo.

Uporabljen naprava: Bruker MPA FT-NIR Series

Postopek merjenja:

Pred začetkom meritev smo izvedli PQ test (kvalifikacijo izvedbe). Za snemanje identifikacijskih spektrov smo uporabili refleksijsko tehniko, pri kateri predpriprava vzorca ni potrebna. Vzorce smukcev, referenc in zmesi smo natresli v vialo in zagnali program OPUSLab. Z ikono LAB se nam je odprlo okno v katerem smo izbrali refleksijsko metodo MPA_Sphere macrosample. Po vnosu vzorcev smo najprej pomerili ozadje in nato še spektre smukcev, zmesi, zmesi referenčnih originatorskih zdravil in zmes iz neuspešne registracijske serije.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. Utemeljitev izbire metod in eksperimentalnega dela

Fizikalno-kemijske lastnosti surovin so pri razvoju novega generičnega zdravila temeljne lastnosti, ki vplivajo na laboratorijske in proizvodne procese izdelave, načina shranjevanja in kar je najpomembnejše, pogojuje kakovost končnih farmacevtskih oblik. Smukec je do danes veljal za eno najbolj inertnih pomožnih snovi, zato tudi tolikšen prispevek na različnih področjih uporabe, tudi v farmaciji. Kot pomožna farmacevtska snov jo zaradi svoje fizikalno-kemijske inertnosti uporabljajo v večini procesov izdelave trdnih farmacevtskih oblik. Pri razvoju novega generičnega zdravila, kjer je smukec vstopal kot polnilo se je pokazalo, da ima tudi smukec lahko vpliv na sproščanje učinkovine iz končne farmacevtske oblike, zato smo določili nabor fizikalno-kemijskih metod, ki bi lahko pokazale katere so tiste lastnosti, ki vplivajo na sproščanje dobro topne modelne učinkovine. Smukci, ki smo jih uporabili so navedeni v Preglednici XVI.

Preglednica XVI: Oznake in vrste vzorcev

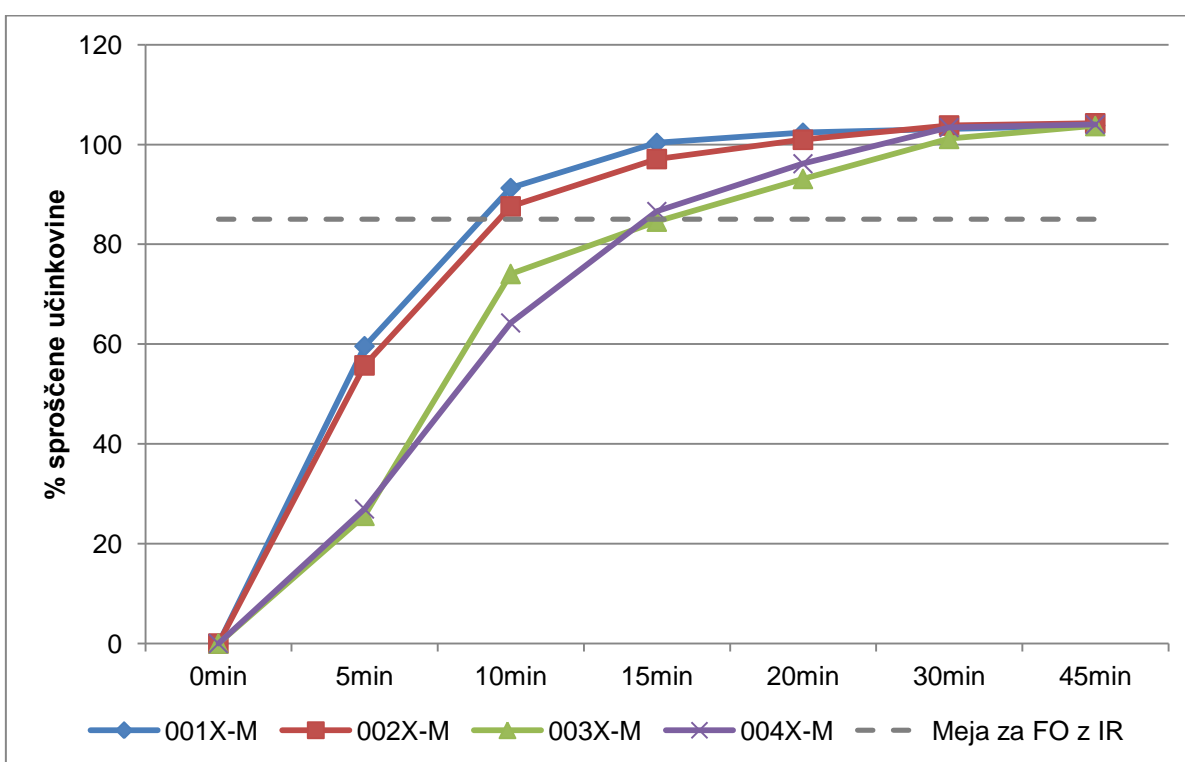
Kontrolna številka	Proizvajalec	Vrsta
PFJ1097O	Imifabi	Talc 3355
PFJ1244O	Imifabi	Talc 3355
PFJ1290O	Imifabi	Talc 3355
PFK1178P	Imifabi	Talc 3355 Dense
PFK1114P	Imifabi	Talc 3355 Dense
PFK1010P	Imifabi	Talc 3355 Dense
S289/3	Luzenac	Luzenac Pharma
1500667	Mondo	Microtalc Pharma 30
1500409	Mondo	Microtalc Pharma 50

V preglednici XVII so navedene zmesi, ki smo jih pripravili s štirimi različnimi smukci, ki so se po fizikalno-kemijskih parametrih najbolj razlikovali in modelno učinkovino. Modelna učinkovina, ki smo jo uporabili, je pripadala isti seriji, s čimer smo se izognili morebitnim razlikam v fizikalno-kemijskih lastnostih učinkovine, ki bi tudi lahko vplivale na sproščanje iz končne farmacevtske oblike.

Preglednica XVII: Sestava pripravljenih zmesi

ZMES	Kontrolna številka smukca	Proizvajalec in vrsta smukca	Opombe
001X-M	PFJ1290O	Imifabi Talc 3355	»ustrezen smukec«
002X-M	PFK1114P	Imifabi Talc 3355 Dense	»ustrezen smukec«
003X-M	S289/13	Luzenac, Luzenac Pharma	»neustrezen smukec«
004X-M	1500409	Mondo, Microtalc Pharma 50	»neustrezen smukec«

4.2. Testi sproščanja



Slika 11: Profili sproščanja modelne zdravilne učinkovine iz kapsul s pripravljenimi zmesmi.

Iz profilov na Sliki 11 je razvidno, da dajeta obe zmesi s smukcema proizvajalca Imifabi (001X-M in 002X-M) ustrezno hitro sproščanje modelne dobro topne učinkovine. Oba profila namreč dosejata WHO mejo za sproščanje modelne učinkovine 85% pri 15. minuti sproščanja. Vzorec 003X-M je v 5. in 10. minuti prepočasen in tudi v 15. minuti ne dosega predpisane meje. Smukec proizvajalca Mondo, ki vstopa v vzorec 004X-M in v 10. minuti izkazuje še počasnejše sproščanje

od ostalih vzorcev. Vzorec je sicer dosegel predpisano mejo 85% sproščene učinkovine v 15 minutah, vendar je pri samem profilu sproščanja vidna drugačna kinetika sproščanja, glede na vzorca 001X-M in 002X-M, zato tudi ni ustrezna izbira smukca za to vrsto formulacije z modelno učinkovino. S prepočasnim sproščanjem v prvih 10. minutah bi lahko povzročil prenizko količino sproščene učinkovine tudi v 15. minuti. Kot najbolj primeren smukec se je izkazal smukec proizvajalca Imifabi, velikostnega razreda Talc 3355.

4.3. Analiza velikostne porazdelitve delcev - PSD

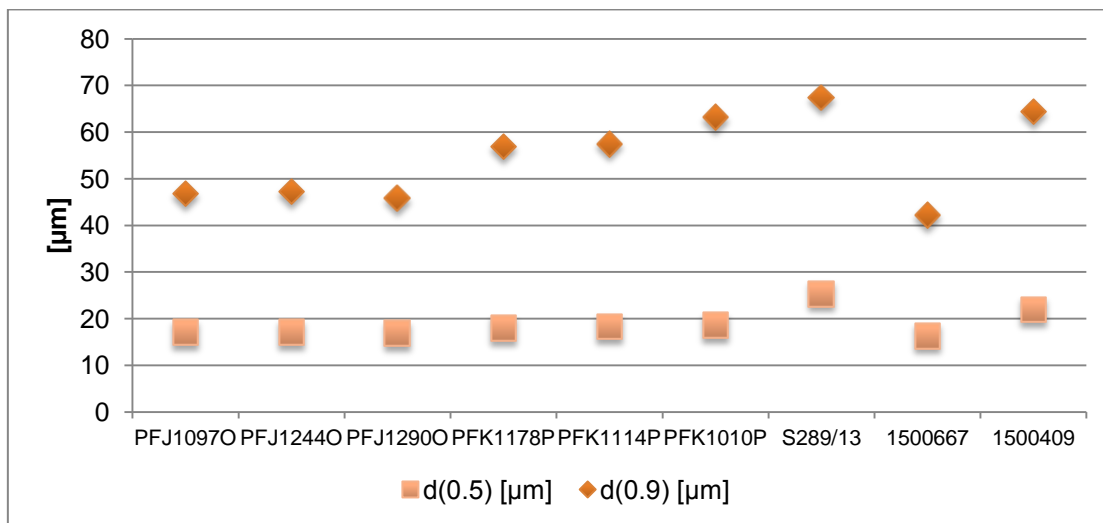
Prva in v večini primerov pomembna lastnost materialov je velikost. Z meritvami PSD različnih smukcev smo to želeli potrditi. V Preglednici XVIII so zbrani podatki testiranja velikosti delcev s pomočjo sipanja laserske svetlobe v vodnem mediju.

Preglednica XVIII: Rezultati PSD analiz smukcev

Serijska številka	Proizvajalec	Vrsta smukca	D [3,2] [μm]	d (0,1) [μm]	d (0,5) [μm]	d (0,9) [μm]
PFJ1097O	Imifabi	Talc 3355	9,667	4,19	17,06	46,87
PFJ1244O			9,558	4,16	17,03	47,27
PFJ1290O			9,502	4,17	16,83	45,80
PFK1178P		Talc 3355Dense	9,622	4,04	17,98	56,83
PFK1114P			9,684	4,08	18,28	57,48
PFK1010P			9,987	4,09	18,56	63,17
S289/13	Luzenac	Luzenac Pharma	13,705	6,11	25,27	67,32
1500667	Mondo	Microtalc Pharma 30	9,679	4,47	16,32	42,15
1500409		Microtalc Pharma 50	11,762	5,19	21,96	64,39

Na grafu (Slika 12) so prikazane vrednosti d(0,5) in d(0,9) PSD analiz vzorcev smukca. Vzorci kažejo različno velikost, kar je pričakovano za tiste vzorce, ki spadajo po specifikaciji v različne velikostne razrede. Manjša razlika je opazna pri vzorcih Imifabi Talc 3355 Dense, kjer sta vzorca PFK1178P in PFK1114P zelo primerljiva, vzorec PFK1010P pa ima rahlo višjo vrednost d(0,9). Zanimivost, ki se je pokazala je, da imajo skoraj vsi smukci zelo podobno povprečno vrednost D[3,2] (Preglednica XVIII), razen vzorcev S289/13 proizvajalca Luzenac in 1500409 proizvajalca Mondo. Z obema smo pripravili zmesi za kapsuliranje in z njimi preverili sproščanje iz farmacevtske oblike. Pri obeh se je pokazalo, da nista primerna za pripravo zmesi z modelno učinkovino, saj upočasnita sproščanje. Pri parametru d(0,5)

opazimo manj razlik med vzorci različnih velikostnih razredov, opazna je le razlika pri vzorcih S289/13 in 1504009, ki spadata v višji velikostni razred.



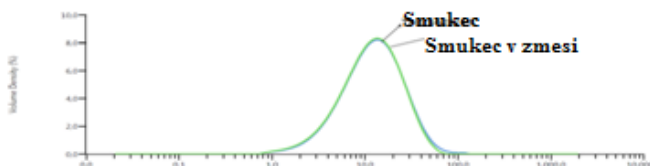
Slika 12: Velikosti delcev različnih vzorcev smukca

Za primerjavo smo pomerili velikost delcev smukca v referenčnih originatorskih zdravilih. Rezultati meritev (Preglednica XIX) so pokazali, da so delci smukca v referenčnem zdravilu v istem velikostnem razredu kot vzorci smukca proizvajalca Imifabi, s čimer lahko potrdimo, da so smukci proizvajalca Imifabi primernejši za pripravo zmesi z modelno učinkovino.

Preglednica XIX: Rezultati analize PSD referenčnih originatorskih zdravil

Oznaka vzorca/serijska številka	D [3,2] [μm]	d (0,1) [μm]	d (0,5) [μm]	d (0,9) [μm]
13K0008P	11,689	5,280	21,418	55,416
12H0006P	11,960	5,380	22,120	56,012

Na Sliki 13 je prikaz meritev samostojnega vzorca smukca in vzorca zmesi z istim smukcem. S tem smo želeli dokazati, da se pri direktni aplikaciji zmesi v celico aparature Malvern modelna učinkovina med mešanjem popolnoma raztopi in ne vpliva na meritev velikosti delcev smukca. To je razvidno iz krivulj posameznih meritev, ki sta popolnoma prekriti. Ujemanje krivulj ne bi bilo popolno, če bi bila učinkovina še prisotna.



Slika 13: Primerjava rezultatov meritev PSD samostojno za smukec in zmes

Iz rezultatov PSD in testov sproščanja modelne učinkovine zato slepamo, da velikost delcev smukca v veliki meri vpliva na sproščanje modelne učinkovine iz farmacevtske oblike. Pomembna kriterija sta parameter $d(0,9)$ in $d(0,5)$. Pokazalo se je tudi ujemanje med povprečno velikostjo delcev ($D[3,2]$) pri vzorcih, ki so dali neustrezno sproščanje, vendar ni dovolj diskriminatoren parameter za ločevanje med vzorci, ki imajo manjše razlike v vrednostih $D[3,2]$. Metoda PSD je z določanjem parametrov $d(0,5)$ in $d(0,9)$ dovolj diskriminatorna, da razlikuje med različnimi vzorci smukca, ki dajejo ustrezno ali neustrezno sproščanje modelne učinkovine iz končne farmacevtske oblike. Zaključimo lahko, da je porazdelitev velikosti delcev kritični parameter materiala.

4.4. Merjenje specifične površine z metodo BET

Preglednica XX prikazuje podatke merjenja specifične površine različnih vzorcev smukca. Za primerjavo smo pomerili tudi specifično površino smukca izoliranega iz originatorskega zdravila in zmesi, ki smo jo uporabili v neuspešni razvojni seriji (TEH 2) (Preglednica XXI).

Preglednica XX: Rezultati merjenja specifične površine na vzorcih smukca

	Vrsta smukca	Proizvajalec	Paralela			Povprečje [m ² /g]	SD	RSD [%]
			Celica 1	Celica 2	Celica 3			
			[m ² /g]					
PFJ1097O	Talc 3355	Imifabi	2,2858	2,4868	2,3089	2,36	0,11	4,66
PFJ1244O			2,3625	2,3582	2,4514	2,39	0,05	2,09
PFJ1290O			2,5095	2,4820	2,6322	2,54	0,08	3,15
PFK1178P	Talc 3355Dense		2,8097	2,8240	2,8408	2,82	0,02	0,71
PFK1114P			2,7312	2,7716	2,99592	2,82	0,12	4,26
PFK1010P			2,7604	2,7023	2,8970	2,79	0,10	3,58
S289/13	Luzenac Pharma	Luzenac	3,0939	3,1495	3,2354	3,16	0,07	2,22
1500667	Microtalc Pharma 30	Mondo	4,9508	4,9804	4,9184	4,95	0,03	0,61
1500409	Microtalc Pharma 50		4,4461	4,3340	4,5995	4,46	0,13	2,91

Preglednica XXI: Primerjalni rezultati specifične površine izoliranega smukca RLD in smukca ustrezne serije

	BET [m ² /g]	RSD [%]	Komentar
12H0006P	1,9	4,21	Izoliran smukec RLD formulacije
TEH 2	3,68	1,63	Smukec iz neuspešne serije; Luzenac, mikroniziran

Rezultati v Preglednici XX kažejo, da imajo smukci proizvajalcev Luzenac in Mondo višjo specifično površino. Dva od teh smukcev smo uporabili tudi v testih sproščanja modelne učinkovine (S289/13 in 1500409), kjer se je izkazalo, da zaradi neustreznosti velikosti delcev kot tudi tudi specifične površine, ne dajeta ustreznega profila sproščanja, saj ne dosežeta predpisa WHO pri 15 minutah. Smukci, ki so dali neustrezno sproščanje modelne učinkovine izkazujejo večjo specifično površino, kot tisti z ustreznim sproščanjem. Pri testiranju specifične površine vzorca zmesi, ki smo jo uporabili v neustrezni seriji (Preglednica XXI) je razvidno, da ima smukec prav tako višjo specifično površino od primerjalnega originatorskega zdravila. Vzorca z ustreznim sproščanjem vsebujeta smukce s specifično površino pod $3 \text{ m}^2/\text{g}$, smukca z neustreznim sproščanjem pa imata specifično površino nad to mejo. Smukec iz RLD ima v primerjavi z ostalimi smukci najmanjšo specifično površino, zato lahko potrdimo, da je specifična površina eden izmed kritičnih parametrov, ki vplivajo na sproščanje modelne učinkovine. Razlagamo si tako, da večjo površino kot jo ima smukec, večja je stična površina smukca z modelno učinkovino. S tem je hitrost sproščanja učinkovine počasnejša, zaradi omejenega dostopa medija za raztapljanje do delca učinkovine.

Metoda BET je dovolj natančna za razlikovanje med smukci različnih velikostnih razredov kot tudi med smukci znotraj istega in zato tudi primerna, za razlikovanje med smukci, ki so razlog za ustrezno ali neustrezno sproščanje učinkovine.

4.5. Merjenje izgube vlage pri sušenju – IPS

Preglednica XXII prikazuje rezultate izgube mase vzorcev smukca, ko smo jih izpostavili kontinuiranem procesu sušenja pri temperaturi 105°C . Izguba mase vzorca nam prikaže izgube fizikalno vezane vode v vzorcih, s čimer smo želeli ovrednotiti razlike med smukci posameznih proizvajalcev in za primerjavo med samimi serijami istega proizvajalca. Iz rezultatov je razvidno, da so si vzorci glede vsebnosti vode enakovredni, odstopa le smukec 1500409, ki ima skoraj dvakratno vsebnost vlage glede na preostale vzorce. Ta smukec je tudi vstopal v zmes 004X-M, ki smo jo nato ovrednotili na testih sproščanja in ni pokazal zadovoljivega sproščanja. Prav tako smo pri sejalnih analizah istega vzorca opazili odklon v eni izmed frakcij. Razlog za tak odklon glede na ostale vzorce je verjetno v neprimernem shranjevanju vzorca, vendar glede na to, da je smukec ne-higroskopen je majhna verjetnost, da

bi iz okolja nase vezal vlago. Še vedno pa ne moremo zaključiti, da je vsebnost vlage faktor, ki bi lahko vplival na sproščanje, saj so si ostali vzorci, ki so vstopali v zmesi za kapsuliranje in so pokazali različne vplive pri testih sproščanja (PFJ1290O, PFK1114P, S289/13), med seboj zelo podobni.

Preglednica XXII: Vsebnost vlage v vzorcih smukca

Serijska številka	Vrsta smukca	IPS [%]
PFJ1097O	Talc 3355	0,08
PFJ1244O		0,07
PFJ1290O		0,07
PFK1178P	Talc 3355Dense	0,07
PFK1114P		0,07
PFK1010P		0,09
S289/13	Luzenac Pharma	0,08
1500667	Microtalc Pharma 30	0,07
1500409	Microtalc Pharma 50	0,13

4.6. Pregled vzorcev z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM)

Metoda vizualnega pregleda morfologije delcev je bila zaradi zmožnosti velikih povečav in dobre ločljivosti dobra izbira, saj smo želeli predvsem pridobiti podatke o obliki delcev smukca. Metodo smo uporabili tudi za prikaz razlik med posameznimi serijami različnih proizvajalcev. Slike 37, 38 in 39 prikazujejo morfologijo smukcev proizvajalca Imifabi znotraj istega velikostnega razreda »Talc 3355 Dense« pri 500-kratni povečavi. Med njimi ni vidnih razlik, vsi imajo namreč zelo podobno plastovito obliko delcev, prav tako ni pri nobenem opaziti skupkov. Slike 40, 41 in 42 prav tako prikazujejo smukce proizvajalca Imifabi v velikostnem razredu »Talc 3355«. Tudi med temi vzorci ni opaziti razlik in tudi če jih primerjamo s smukci velikostnega razreda Talc 3355 so si po obliki zelo podobni. Sliki 43 in 44 sta smukca proizvajalca Mondo, velikostnih razredov Microtalc Pharma 30 in Microtalc Pharma 50, pri katerih lahko za razliko od vzorcev proizvajalca Imifabi opazimo dosti bolj sferično obliko delcev z manj plastoviti strukturami. V obeh vzorcih se pojavijo tudi večji sferični delci. Smukec na sliki 45 je velikostnega razreda Luzenac Pharma, proizvajalca Luzenac (Imerys), ki je po obliki nekje med smukci proizvajalca Imifabi in smukcema

proizvajalca Mondo, saj so delci precej sferični, vendar so bolj vidne zasnove ploskev, pojavijo pa se tudi izrazito ploščati delci. Posneli smo tudi sliko same učinkovine (Slika 47). Delci učinkovine so nepravilnih oblik, med njimi smo opazili tudi delce z izrazito paličasto strukturo. Slika 48 prikazuje zmes, kjer so vidni posamezni delci učinkovine in posamezni delci smukca. Delec učinkovine je v primerjavi z delci smukca veliko bolj enoten, ni vidne lamelarnosti, vidimo pa lahko večje mejne ploskve.

Lamelarnost smukca namreč določa obliko in velikost delcev smukca, ter posledično specifično površino, ki sta dva kritična kriterija, ki vplivata na sproščanje modelne učinkovine.

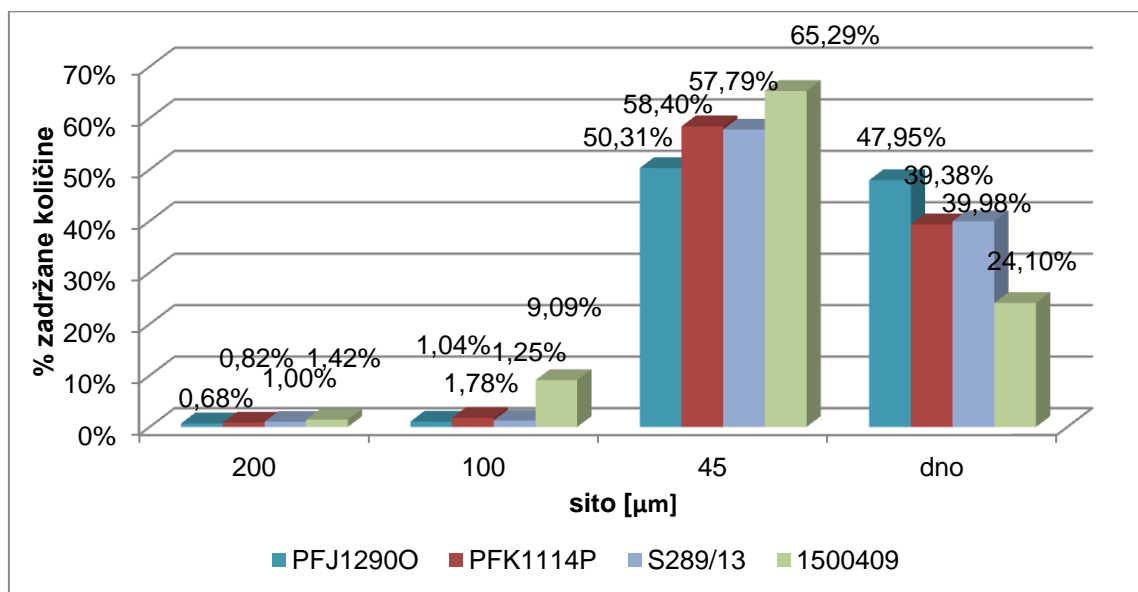
Na podlagi tega smo zaključili, da oblika delcev v tem primeru posredno vpliva na sproščanje dobro topne modelne učinkovine. Lamelarnost smukca, ki določa obliko delcev hkrati vpliva tudi na njihovo velikost, kar pa smo dokazali, da je kritični parameter materiala. Metoda SEM nam sicer dobro prikaže samo obliko delcev, ne moremo pa z njo kvantitativno določiti lastnosti, ki vplivajo na sproščanje modelne učinkovine.

4.7. Sejalna analiza

Sejalna analiza je poleg meritev velikosti delcev s pomočjo sipanja laserske svetlobe opredelile razred oziroma finost materiala z izvajanjem meritev v suhih pogojih. Sliki 14 in 15 prikazujeta mase zaostankov prahu na posameznem situ. Slika 14 prikazuje smukce, ki smo jih uporabili za pripravo zmesi z modelno učinkovino. Razvidno je, da ima vzorec 1500409, ki vstopa v zmes 004X-M večji zaostanek na situ 100 μm , kar je verjetno posledica aglomeracije. Razlika v frakcijah je rahlo opazna na situ 45 μm pri smukcih PFJ1097O, PFJ1244O in PFJ1290O (Preglednica XXIII), ki vsi pripadajo istemu velikostnemu razredu. Smukec PFJ1244O ima od ostalih vzorcev razreda Talc 3355 to frakcijo manjšo.

Preglednica XXIII: Povzetek rezultatov sejalne analize smukcev

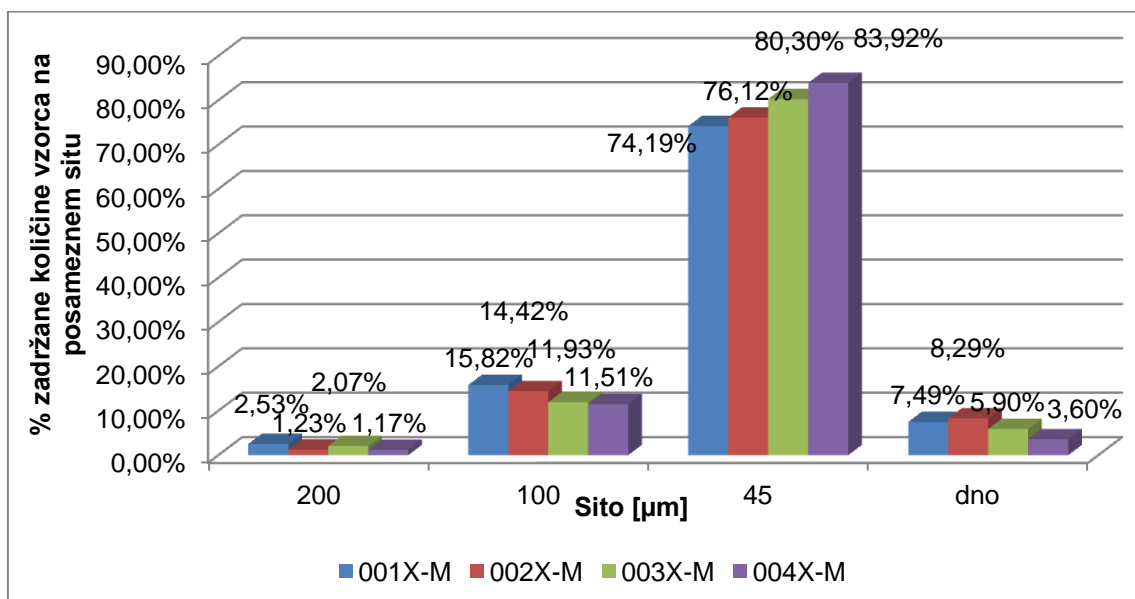
			Zaostanek na sitih [%]			
Vzorec	Velikost sit		200µm	100 µm	45 µm	dno
Imifabi	PFK1178P	Talc 3355Dense	0,46	1,56	58,95	38,80
	PFK1114P		0,82	1,78	58,40	39,38
	PFK1010P		0,64	1,41	60,54	37,31
	PFJ1097O	Talc 3355	0,80	0,92	52,99	45,02
	PFJ1290O		0,68	1,04	50,31	47,95
	PFJ1244O		0,94	1,08	46,75	51,37
Luzenac	S289/13	Luzenac Pharma	1,00	1,25	57,79	39,98
Mondo	1500667	Microtalc Pharma 30	1,48	1,85	75,57	20,98
	1500409	Microtalc Pharma 50	1,42	9,09	65,29	24,10



Slika 14: Zaostanki vzorcev smukca na posameznih sitih po končani sejalni analizi

Sejalna analiza pripravljenih zmesi je pokazala, da smukec in učinkovina tvorita neke vrste skupke, saj je viden porast mase na sitih 100 µm in 45 µm (modelna učinkovina ima $d(0,9)=73 \mu\text{m}$). Predvsem je potrebno poudariti, da je razlika v zaostali zmesi pri vzorcu 001X-M, ki vsebuje »ustrezen smukec« (PFJ1290O) in vzorcem 004X-M (1500409), ki vsebuje »neustrezen smukec«. Vzorec 001X-M ima na dnu večjo frakcijo kot vzorec 004X-M, kar je posledica nižjega velikostnega razreda glede na PSD meritve, v katerem se smukec iz 001X-M nahaja. Prav iz tega razloga ima vzorec 001X-M tudi manjšo frakcijo na situ 45 µm od ostalih

zmesi, saj vsebuje smukec z $d(0,9)=45,8 \mu\text{m}$, zaradi česar večina prostega smukca to sito preide. Kot prost smukec so mišljeni predvsem delci, ki ne vstopajo v interakcijo z učinkovino. Frakcija zmesi 001X-M, ki smo jo določili na situ 100 μm (Slika 15) prikazuje predvsem skupke, ki sta jih tvorila modelna učinkovina in smukec, saj so posamezni delci učinkovine in smukca premajhni, da bi se zadržali na situ te velikosti. Podobno, vendar malo manjšo frakcijo smo opazili na situ 100 μm pri vzorcu 002X-M, ki je prav tako pokazala ustrezno sproščanje modelne učinkovine. Tudi pri tem vzorcu smo uporabili smukec, ki glede na PSD analizo vsebuje delce z $d(0,9)=57,48 \mu\text{m}$, kar pomeni, da je zaostanek na tem situ posledica tvorbe agregatov med učinkovino in smukcem. Prosti smukec in prosta učinkovina iz tega vzorca sta sito 100 μm prešla. Pri vzorcu 004X-M smo na tem situ opazili manjšo frakcijo, s čimer predvidevamo, da sta smukec in učinkovina tvorila ali majše in bolj kompaktne delce ali pa sta po celotnem vzorcu bolj homogeno porazdeljena in tvorita manj skupkov (domnevo smo kasneje preverjali s pomočjo Ramanskega spektrometra, poglavje 4.10.). Iz dobljenih rezultatov (Preglednica XXIII in Slika 15) smo zaključili, da so »ustrezni« smukci z modelno učinkovino tvorili več skupkov večjih od 100 μm od »neustreznih«. Sejalna analiza nam sicer pokaže razlike med vzorci, vendar je v primerjavi z metodo PSD premalo natančna za opredelitev velikosti smukca, ki vpliva na sproščanje modelne učinkovine iz FO.



Slika 15: Zaostanki zmesi na posameznih sitih pri sejalni analizi

4.8. Nasipni in zbiti volumen

Preglednica XXIV: Rezultati testov nasipnega in zbitega volumna smukcev s preračuni (HR – Hausnerjevo razmerje, CI – Carrov indeks)

	Vrsta smukca	Nasipni volumen (ml/g)	Nasipna gostota (g/ml)	Zbiti volumen (ml/g)	Zbita gostota (g/ml)	HR	CI
PFJ1097O	Talc 3355	1,89	0,5	1,06	0,94	1,88	45,7
PFJ1244O		1,86	0,54	1,00	1,00	1,85	46,2
PFJ1290O		1,88	0,53	1,02	0,98	1,85	45,7
PFK1178P	Talc 3355Dense	1,76	0,57	0,96	1,04	1,82	45,5
PFK1114P		1,68	0,6	0,98	1,02	1,70	41,7
PFK1010P		1,76	0,57	0,96	1,04	1,82	45,5
S289/13	Luzenac Pharma	2,19	0,46	1,24	0,81	1,76	43,4
1500667	Microtalc Pharma 30	2,2	0,46	1,12	0,89	1,93	49,1
1500409	Microtalc Pharma 50	2,12	0,47	1,16	0,86	1,83	45,3

Smukci proizvajalcev Luzenac in Mondo izkazujejo večji nasipni volumen kot ostali, čeprav bi pri vzorcu 1500667 glede na njegovo velikost delcev pričakovali drugače. Smukci in zmesi so tudi slabo pretočni, kar je razvidno iz Hausnerjevega razmerja. Izboljšanje pretočnih lastnosti je opazno v zmesi, ko so interakcije med delci smukca manjše, ker so v interakciji z modelno učinkovino (Preglednica XXV). Iz Preglednice XXV je razvidno, da so si zmesi, z izjemo 001X-M zelo podobne tako po nasipnem, kot tudi zbitem volumnu, imajo tudi zelo podobno pretočnost in stisljivost. Zmes 001X-M ima nižji nasipni in zbiti volumen od ostalih vzorcev in boljšo pretočnost, vendar izkazuje slabšo stisljivost delcev. Čeprav se je izkazalo, da imajo smukci z nižjim nasipnim volumnom boljše rezultate pri testih sproščanja, ne moremo zaključiti, da sta nasipni in zbiti volumen kritična parametra materiala.

Preglednica XXV: Rezultati testov nasipnega in zbitega volumna zmesi

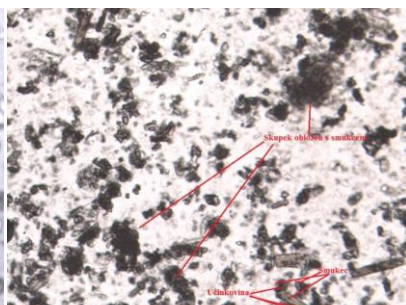
	Nasipni volumen (ml/g)	Nasipna gostota (g/ml)	Zbiti volumen (ml/g)	Zbita gostota (g/ml)	Hausnerjevo razmerje (pretočnost)	Carrov indeks (Stisljivost [%])
001X-M	1,54	0,63	1,24	0,8	1,27	21,5
002X-M	1,98	0,51	1,42	0,7	1,37	28,3
003X-M	2	0,5	1,51	0,66	1,32	24,5
004X-M	2	0,5	1,47	0,68	1,36	26,5

4.9. Pregled vzorcev z optičnim mikroskopom s polarizirano svetlobo

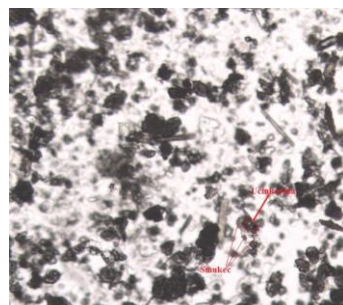
Metodo opazovanja delcev s svetlobnim mikroskopom smo izbrali z namenom, da še dodatno ovrednotimo obliko in velikost delcev in preverimo morebitno agregacijo med delci smukca. Zaradi mineralne sestave smukca smo s pomočjo polarizirane svetlobe tudi lažje razlikovali med delci smukca in modelne učinkovine. Pomerili smo vzorce smukca in vzorce zmesi. Določeno število delcev ali agregatov smo označili, ter tako določili njihovo velikost. Pri samih smukcih ni bilo opaziti velikih razlik med posameznimi vzorci. Pri tej metodi so bolj vidni večji delci smukca, kar ni nujno, da izraža dejansko stanje, saj pride do prekrivanja in nalaganja delcev pod krovnim stekelom, kar lahko poda lažen občutek o dejanski velikosti delca oziroma agregata. Pri opazovanju zmesi pa se je metoda izkazala kot zelo primerna za opazovanje agregatov, ki jih tvorita modelna učinkovina in smukec, saj je smukec po obsevanju s polarizirano svetlobo zaradi svoje mineralne sestave na sliki viden kot prosojen delec. Učinkovina je za razliko vidna kot črn delec, paličaste strukture, ki so značilne le za učinkovino in jih ne najdemo pri smukcu pa so vidne kot prosojen delec (Slika 20). To nam je bilo v veliko pomoč pri opazovanju zmesi. Na sliki 16 vidimo kako nekaj delcev smukca obloži delec učinkovine, pri tem pa ima učinkovina še vedno proste ploskve, pri katerih voda oziroma medij za raztapljanje pride do delca in ga začne raztapljati. V zmesi 002X-M (Slika 17) je vidnih malo več skupkov in manj prostega smukca, kar pa je pri zmesih 003X-M (Slika 18) in 004X-M (Slika 19) še bolj opazno, kjer so skupki tudi večji in je razvidno, da je njihova površina prekrita z manjšimi delci smukca, kar bi potencialno lahko bila ovira za dostop medija do delca učinkovine. Za primerjavo smo vzeli referenco 13K0008P (Slika 21). Referenca ima malo vidnih skupkov in več prostega smukca ter učinkovine. Slike vzorcev smukca se nahajajo v poglavju Priloga. S primerjanjem slik zmesi in rezultatov testov sproščanja smo zaključili, da sproščanje ustreza predpisom, ko smukec in učinkovina tvorita čim manj skupkov in ko je stična površina med njima čim manjša.



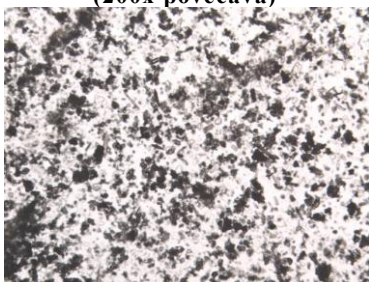
Slika 16: Pregled delcev in agregatov v zmesi 001X-M (200x povečava)



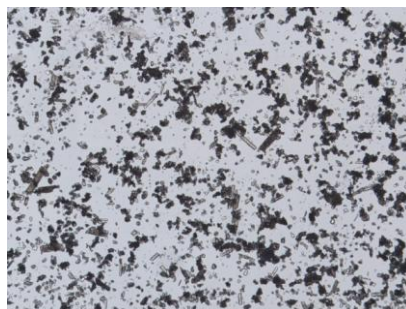
Slika 17: Skupki v zmesi 002X-M (povečana slika 50x povečava)



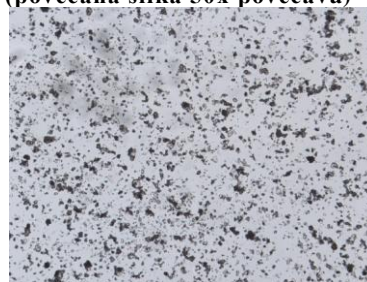
Slika 18: Skupki v zmesi 003X-M (povečana slika 50x povečava)



Slika 19: Pregled delcev in agregatov v zmesi 004X-M (50x povečava)



Slika 20: Pregled delcev učinkovine (50x povečava)



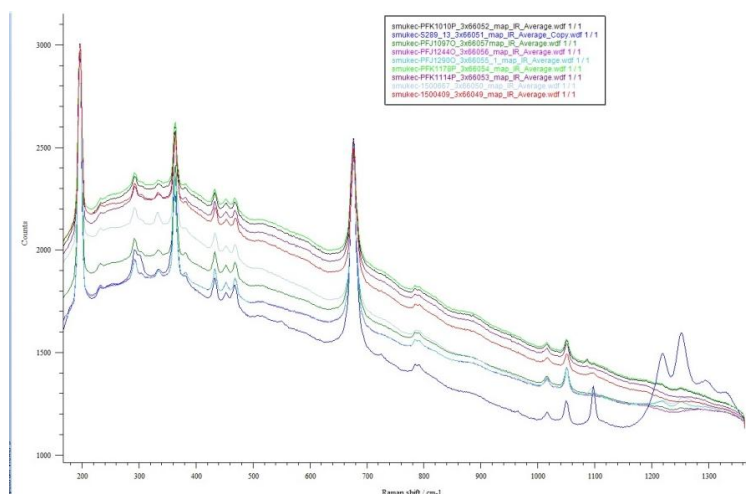
Slika 21: Referenca 13K0008P (50x povečava)

4.10. Analiza vzorcev z Ramanskim spektrofotometrom

Z Ramanskim spektrofotometrom smo pomerili vzorce smukcev in jih kvalitativno okarakterizirali ter primerjali z referenčnimi spektri v knjižnici spektrov (programa Spectral ID, del programske opreme naprave)(Slika 59). Referenčni spektri so predhodno posneti spektri standardov različnih učinkovin in materialov, ki nam služijo za primerjavo in kvalitativno določitev posnetih spektrov preiskovanega materiala. Z isto metodo smo pomerili modelno učinkovino. S primerjavo spektrov učinkovine in spektrov smukca smo določili vrednosti signalov, ki so značilni za posamezna vzorca. Zanimala nas je tudi porazdelitev delcev smukca in zdravilne učinkovine v zmesi. Iskali smo razlike z metodo »Map image acquisition« oziroma pridobivanje slike s skeniranjem vzorca s preslikavo (mapiranje), ki nam je glede na predhodno določene vrednosti signalov smukca in modelne učinkovine izrisala sliko, kako sta smukec in modelna učinkovina porazdeljena po preiskovanem območju.

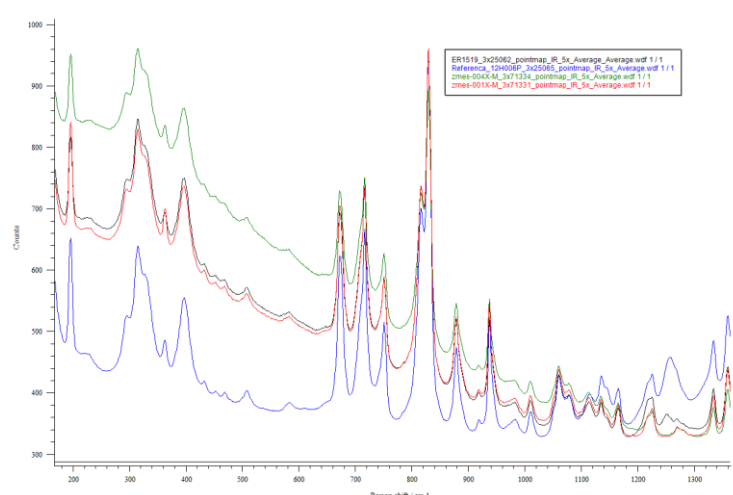
Slika 22 prikazuje ramanske spektre različnih vzorcev smukca. Spektre smo primerjali z referenčnimi spektri smukca v knjižnici spektrov. V področju $0 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ so vidni vsi osnovni vrhovi značilni za smukec. Razlika se pojavi pri smukcu 289/13, ki ima signal pri 1100 cm^{-1} močnejši, pojavil pa se je tudi dodaten četvorni vrh v območju $1200-1350 \text{ cm}^{-1}$. Vrhova pri 1220 cm^{-1} in 1255 cm^{-1} sta pokazala ujemanje z referenčnim spektrom smukca,

vendar z veliko večjo intenziteto (Slika 59). Ostala dva signala (pri 1295 cm^{-1} in 1325 cm^{-1} imata neznan izvor.



Slika 22: Primerjalni Ramanski spektri različnih smukcev

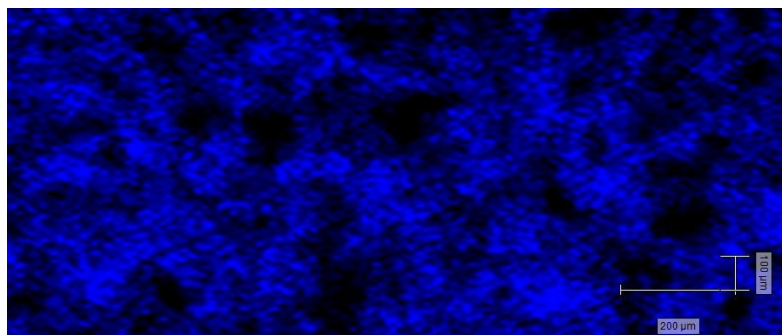
Pri kvalitativni primerjavi zmesi z zmesjo referenčnega zdravila (Slika 23) je vidno popolno ujemanje vrhov, le kvantitavno je opazna razlika glede na intenziteto posameznih signalov, predvsem v območju 1200 cm^{-1} do 1400 cm^{-1} .



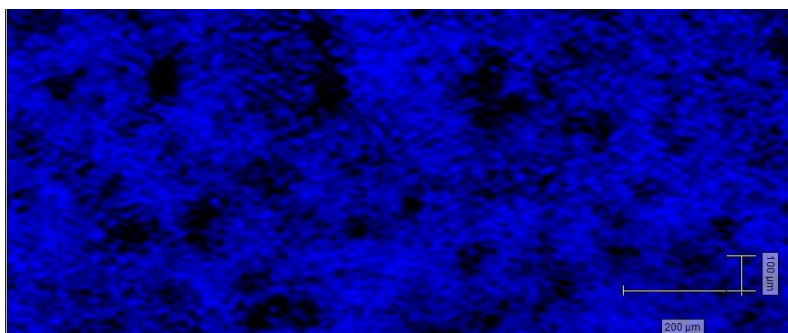
Slika 23: Ramanski spekter smukca S289/13 proizvajalca Luzenac, reference 12H006P in zmesi 001X-X in 004X-M

Najbolj informativni pa so bili rezultati metode »Map image acquisition« in t.i. točkovnega mapiranja vzorcev (ang. »Pointmap«), s katerimi smo opazovali porazdelitev delcev smukca z delci učinkovine. S sočasno uporabo metode »pinhole« (uporaba dodatnega nastavka, ki se vstavi v pot žarka in izboljša profil laserskega žarka) je naprava pomerila okvirno 30000 točk na označenem področju vzorca in glede na nihanje vzorca pridobila podatek ali se na mestu

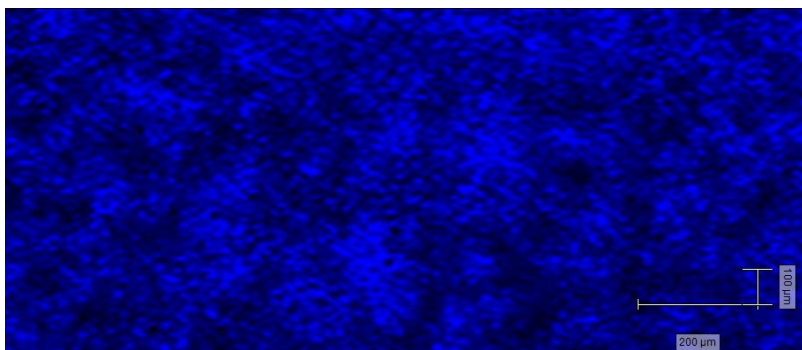
nahaja smukec ali modelna učinkovina. Z metodo smo analizirali zmes 001X-M, ki je vsebovala »ustrezni« smukec in 004X-M, ki je bila pripravljena z »neustreznim« smukcem ter zmes neustrezne razvojne serije TEH 2. Primerjali smo predvsem jakost signala smukca na področju, kjer je zaznano več učinkovine, ker se signala smukca in učinkovine namreč pojavita na celotnem področju, zato smo s pomočjo signal - bazna linija (ang.»signal to base line«) primerjali razmerje njunih intenzitet.



Slika 24: Pointmap zmesi 001X-M (črno=smukec, modro=učinkovina)



Slika 25: Pointmap zmesi 004X-M (črno=smukec, modro=učinkovina)



Slika 26: Pointmap zmesi TEH 2 (črno=smukec, modro=učinkovina)

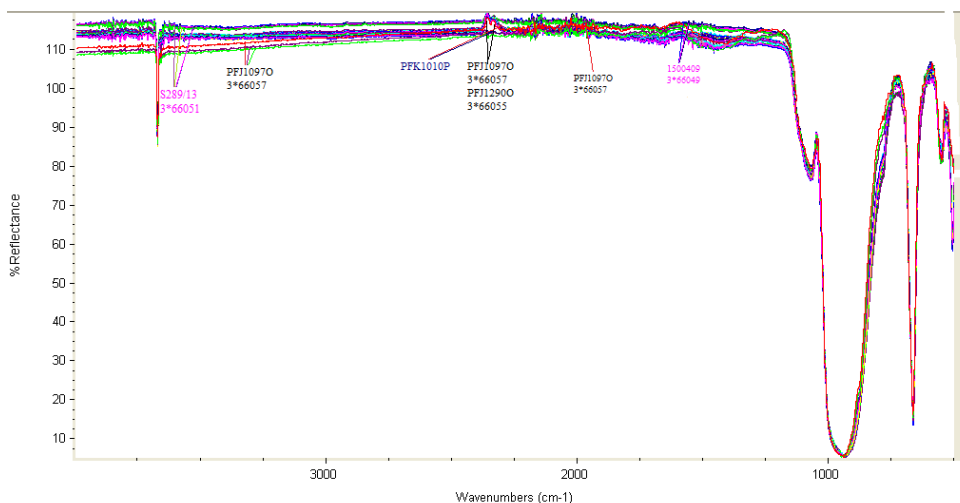
Na zgornjih slikah (24, 25, 26) so prikazani posneti signali analiziranih vzorcev zmesi. Signala smo določevali pri 198 cm^{-1} za smukec in pri 830 cm^{-1} za učinkovino. Ti dve vrednosti smo določili iz spektrov učinkovine in smukca, ki smo jih pomerili predhodno z metodo »Stream

line acquisition« (kvalitativna določitev). V programu smo nato na samem spektru označili vrh pri določeni vrednosti in izvedli ukaz naj se primerja vrednost razmerja signal-bazna linija enega in drugega med seboj, s čimer smo dobili relativno vrednost jakosti signala smukca proti modelni učinkovini. Pri zmesi 001X-M je opaznih več črnih področij, ki prikazujejo delce smukca, medtem ko modra področja prikazujejo področja z učinkovino. Pri tem vzorcu se vidi, da sta področji med sabo manj pokriti in da je znotraj modrega področja malo črnih, kar pomeni, da smukec ne prekriva v veliki meri učinkovine. Pri vzorcu 004X-M pa je črnih področij manj in je zato več drobnih črnih področij (smukec) porazdeljenih po modrem področju, kjer se nahaja učinkovina. Če primerjamo ta dva vzorca med seboj lahko zaključimo, da sta smukec in učinkovina veliko bolj v stiku pri vzorcu 004X-M (sproščanje učinkovine je bilo prepočasno), kar lahko potencialno vpliva na počasnejše sproščanje učinkovine zaradi preprečevanja dostopa medija do delcev učinkovine. Se je pa podobna slika pokazala tudi pri vzorcu zmesi iz neuspešne razvojne serije TEH 2, ki je dala prepočasno raztapljanje (Slika 26), s čimer lahko potrdimo, da je pri zmesih, ki imajo več smukca in učinkovine v interakciji večja možnost za neustrezno sproščanje učinkovine iz farmacevtske oblike.

4.11. Analiza infrardečega spektra

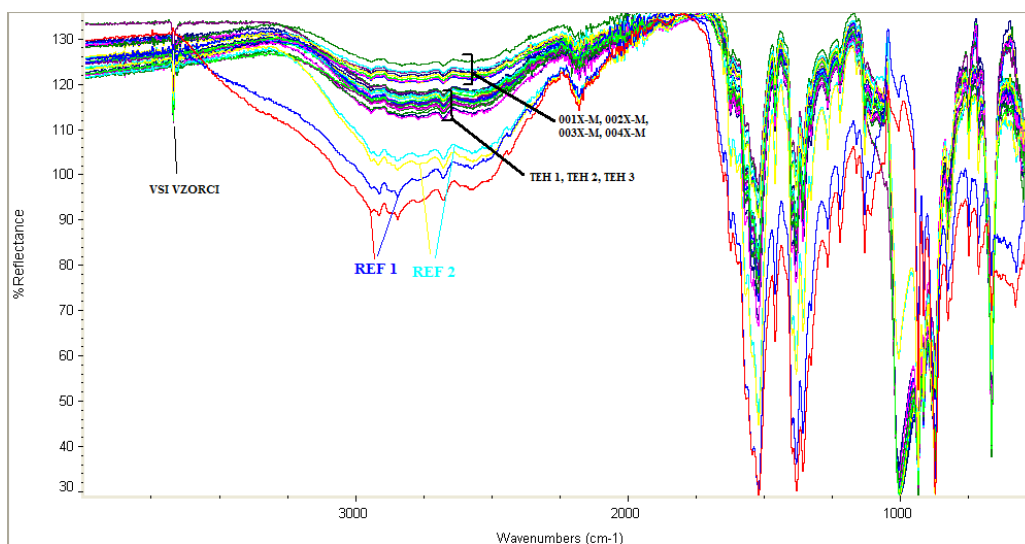
4.11.1. Analiza MID – IR spektra

S pomočjo MID-IR smo iskali kvalitativne razlike med vzorci. Na posnetih spektrih vzorcev smo primerjali vrhove pri $3677 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$, $1018 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ in $669 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$, ki so reprezentativni vrhovi za smukec. Slika 60 v prilogi prikazuje spekter modelne učinkovine in Slika 28 prikazuje spektre pripravljenih zmesi (001X-M, 002X-M, 003X-M, 004X-M), zmesi iz referenčnih originatorskih zdravil in spekter zmesi iz interne tehnične serije (TEH 1, TEH 2 in TEH 3). Pri analizi MID-IR spektrov vzorcev smukca (Slika 27) nismo opazili nobenih kvalitativnih razlik med različnimi vzorci smukca. Pojavijo se le razlike v intenziteti signalov pri posameznih vzorcih, kar bi lahko nakazovalo na različno velikost delcev. Vzorci so si po kemijski sestavi preveč podobni, da bi jih lahko razlikovali z metodo MID-IR.



- PFJ10970 1
- PFJ10970 2
- PFJ10970 3
- PFJ12440 1
- PFJ12440 2
- PFJ12440 3
- PFJ12900 1
- PFJ12900 2
- PFJ12900 3
- PFK1178P 1
- PFK1178P 2
- PFK1178P 3
- PFK1114P 1
- PFK1114P 2
- PFK1114P 3
- PFK1010P 1
- PFK1010P 2
- PFK1010P 3
- 1500667 1
- 1500667 2
- 1500667 3

Slika 27: MID-IR spekter vseh smukcev



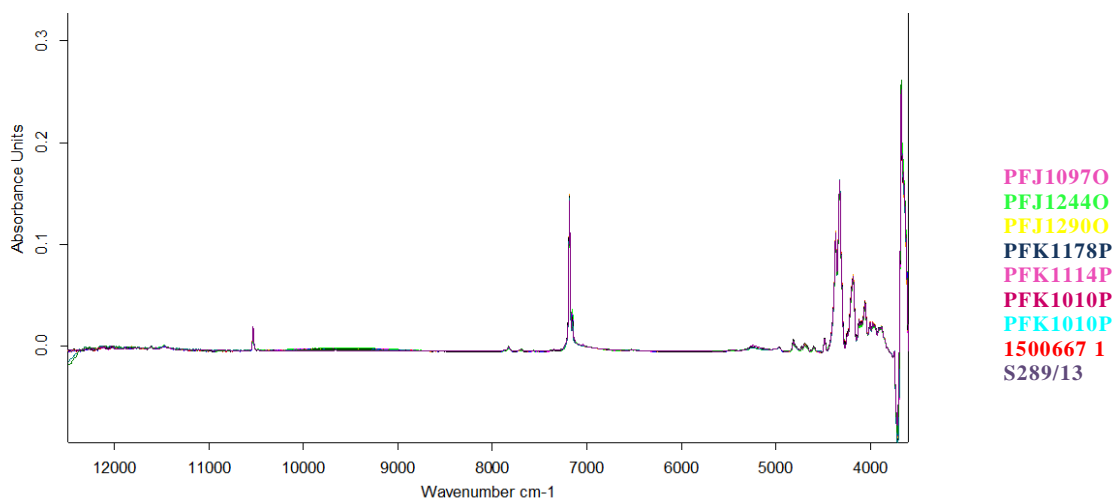
- Zmes 001X-M
- Zmes 001X-M
- Zmes 001X-M
- Zmes 002X-M
- Zmes 002X-M
- Zmes 002X-M
- Zmes 003X-M
- Zmes 003X-M
- Zmes 003X-M
- Zmes 004X-M
- Zmes 004X-M
- Zmes 004X-M
- REF 1
- REF 1
- REF 2
- REF 2
- Zmes TEH 1
- Zmes TEH 1
- Zmes TEH 1
- Zmes TEH 2
- Zmes TEH 2
- Zmes TEH 2
- Zmes TEH 3
- Zmes TEH 3
- Zmes TEH 3

Slika 28: Primerjalni MID-IR spekter pripravljenih zmesi, RLD zmesi in TEH 2

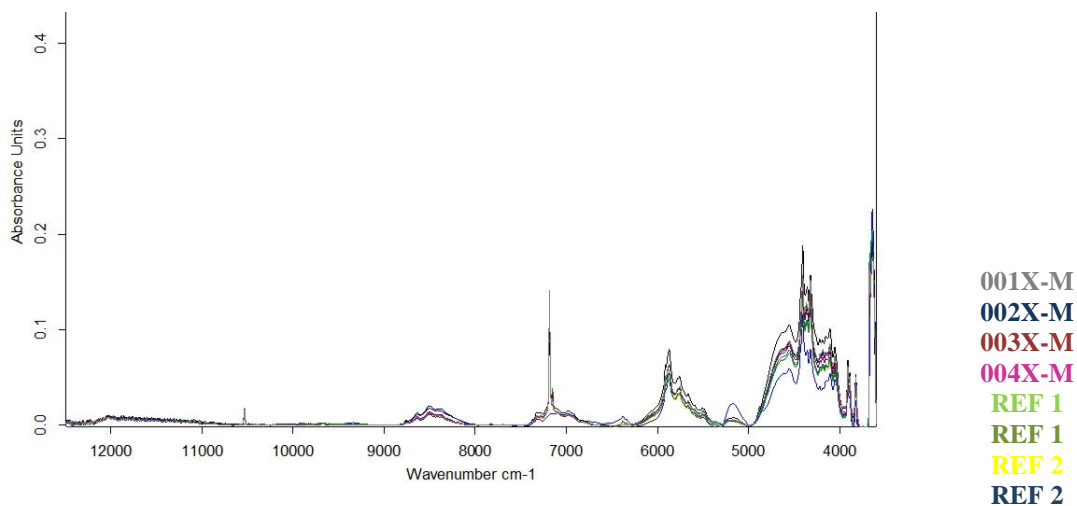
4.11.2. Analiza spektra NIR

Meritve v NIR delu spektra smo izvajali z namenom iskanja kvalitativnih razlik med vzorci smukca. Tudi v tem primeru nismo zasledili nobenih kvalitativnih razlik med vzorci smukca (Slika 29). Spektri smukcev se popolnoma prekrivajo. Opazna je razlika v intenziteti signala pri 7100 cm^{-1} , kar je posledica različnih velikosti delcev (večji delci, večji signal). Razlike v intenziteti smo opazili tudi pri pomejenih vzorcih zmesi. Moder signal originatorskega zdravila na Slika 30 prikazuje nižjo intenziteto v območju med 4000 cm^{-1} in 5000 cm^{-1} , kar bi

lahko nakazovalo na drugačno granuliranost materiala. Posamezni NIR spektri smukcev in ostalih vzorcev se nahajajo v poglavju 7.1 Razširjeni podatki testiranja.



Slika 29: Primerjalni NIR spekter vseh vzorcev smukca



Slika 30: NIR spekter pripravljenih zmesi (001X-M, 002X-M, 003X-M in 004X-M) ter zmesi referenčnih originatorskih zdravil

Za razliko od višjih intenzitet posameznih signalov metoda ni pokazala nobenih sprememb med posameznimi vzorci. Vzorci so si po kemijski sestavi preveč podobni, da bi jih lahko razlikovali z metodo NIR.

5. ZAKLJUČEK

Smuček, ki z modelno učinkovino vstopa v končno farmacevtsko obliko kot polnilo lahko bistveno vpliva na sproščanje učinkovine. V okviru magistrske naloge smo vrednotili različne fizikalno-kemijske lastnosti smukca, ki bi lahko vplivale na hitrost sproščanja dobro topne učinkovine. Ugotovili smo:

1. Z metodo merjenja velikosti delcev s pomočjo laserske difrakcije smo dokazali vpliv velikosti delcev smukca na sproščanje dobro topne modelne učinkovine.
2. Specifična površina smukca, ki smo jo določili z BET analizo, vpliva na sproščanje modelne učinkovine.
3. Vsebnost vlage v smukcih različnih proizvajalcev v našem primeru ni pokazala vpliva na sproščanje učinkovine iz proučevanih zmesi.
4. Oblika delcev smukca posredno vpliva na sproščanje dobro topne modelne učinkovine. Lamelnost smukca namreč določa obliko in velikost delcev smukca, ter posledično specifično površino, ki sta dva kritična kriterija, ki vplivata na sproščanje modelne učinkovine.
5. Smukci z nižjim nasipnim volumnom so izkazovali boljše lastnosti pri vplivu na sproščanje modelne učinkovine.
6. Pri opazovanju zmesi z različnimi smukci z optičnim mikroskopom s polarizirano svetlobo smo pri zmesih, ki so dale hitro sproščanje učinkovine opazili manj skupkov smukca in modelne učinkovine.
7. Vzorci, ki dajo ustrezno hitro sproščanje učinkovine imajo manj interakcij med delci smukca in modelne učinkovine. To smo dokazali z zmesjo, ki je vsebovale »ustrezen« smuček (001X-M). Pri »mapiranju« površine vzorca z Ramanskim spektrometrom smo opazili več področij, kjer učinkovina in smuček nista bila v stiku. Zmes z »neustreznim« smukcem (004X-M) je imela smuček in modelno učinkovino bolj enakomerno porazdeljeno.
8. Različni vzorci smukca z različnim poreklom ne izkazujejo kvalitativnih razlik v IR spektrih.

Za konec smo kot kritične parametre smukca, ki vplivajo na sproščanje dobro topne modelne učinkovine opredelili naslednje parametre in jim določili meje:

Preglednica XXVI: Kritični parametri smukca

PARAMETER	MEJE
PSD	$30 \mu\text{m} < d(0,9) < 50 \mu\text{m}$
	$d(0,5) < 18 \mu\text{m}$
BET	$SSA < 3 \text{ m}^2/\text{g}$
Najbolj primeren proizvajalec glede na dobljene rezultate za dotično modelno učinkovino	Imifabi, Talc 3355

Najpomembnejši fizikalno-kemijski lastnosti smukca, ki vplivata na sproščanje dobro topne modelne učinkovine sta se izkazali velikost in specifična površina delcev. V nadaljevanju bi bilo smiselno ovrednotiti še dodatne vzorce smukca drugih proizvajalcev, ker smo bili tokrat omejeni le na tri proizvajalce, ki so se odzvali in bili pripravljene sodelovati. Z razširjeno PCA analizo NIR rezultatov bi bilo smiselno preveriti sipanje rezultatov med posameznimi vzorci smukca. Smiselno bi se bilo tudi osredotočiti na testiranje smukcev s pomočjo inverzne plinske kromatografije in s tem dodatno okarakterizirati površinske lastnosti smukca, ki bi lahko vplivale na interakcijo z delci modelne učinkovine.

6. VIRI

- (1) Rowe C R, Sheskey Paul J., Owen C. Sian: Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5. Izdaja. Pharmaceutical Press, London, UK, 2006; 767-769
- (2) TALC AND PYROPHYLLITE GROUP – 2:1 Phyllosilicate.
<http://mineral.eng.usm.my/web%20halaman%20mineral/Talc%20and%20pyrophyllite.pdf> (Datum dostopa: 16.7.2016)
- (3) Balard H, Dodds A J, Calvet R, Comard M P. Inverse gas chromatography study of the surface properties of talc impregnated with different acidic and basic polymers. Powder Technol 2002; 128: 262-267
- (4) Mierczynska-Vasilev A, Beattie A D. The effect of impurities and cleavage characteristics on talc hydrophobicity and polymer adsorption. Int J Min Process 2013; 118: 34-42
- (5) USP – ameriška farmakopeja, 39 NF 34
- (6) European Pharmacopoeia, 8th edition, 8.8., 2016
- (7) Merck index (Datum dostopa: 24.7.2016)
- (8) <http://webmineral.com/data/Talc.shtml#.V-lssfmLSM8> (Datum dostopa: 24.7.2016)
- (9) Medicines complete.
<https://www.medicinescomplete.com> (Datum dostopa: 24.7.2016)
- (10) Gruner J W: Zeitschrift für Kristallographie, The crystal structures of talc and pyrophyllite, Locality: Harford County, Maryland, USA; 88 (1934): 412-419
- (11) <http://www.cir-safety.org/sites/default/files/talc032013rep.pdf> (Datum dostopa: 24.7.2016)
- (12) Zazenski R, Ashton W H, Briggs D, Chudkowski M, Kelse J W, MacEachern L, McCarthy E F, Nordhauser M A, Roddy M T, Teetsel N M, Wells A B, Gettings S D: Talc: occurrence, characterization and consumer applications, Regul Toxicol Pharm 1995; 21:218-229.
- (13) Mindat.
www.mindat.org/min3875.html (Datum dostopa: 24.7.2016)

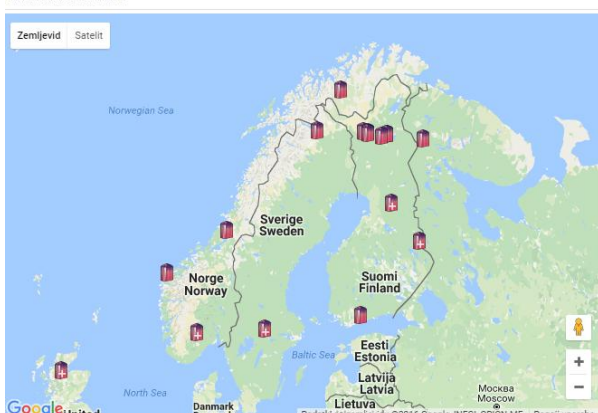
- (14) Chemical product property
http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB5853119.html.
 (Datum dostopa: 7.8.2016)
- (15) Eurotalc.
<http://www.eurotalc.eu/what-talc> (Datum dostopa: 24.7.2016)
- (16) Jadhav N R*, Paradkar A R, Salunkhe N H, Karade R S, Mane G G. Talc: A versatile pharmaceutical excipient. Bharati Vidyapeeth College of pharmacy, Kolhapur, Maharashtra, India. World J Pharm Sci, 2013; 6: 4639-4660. ISSN 2278-4357.
www.wjpps.com/download/article/1386002938.pdf (Datum dostopa: 24.7.2016)
- (17) Minerals.
<http://www.minerals.net/mineral/talc.aspx> (Datum dostopa: 24.7.2016)
- (18) Simandle G J, Paradis S P: Carbonate-hosted talc. Industrial Minerals, British Columbia Mineral Deposits Profiles Doc., Ministry of Energy and Mines, Kanada, 1999: 3: 1-6.
- (19) British geological survey (BGS)
<http://www.bgs.ac.uk/search/home.html?q=talc&qSearchBtn=Search> (Datum dostopa: 7.8.2016)
- (20) O'Driscoll M: The structure of the talc supply market, 3rd China Liaoning International Magnesia materials exposition, 2008, Shenyang, Kitajska
- (21) PubChem
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16211421#section=Top> (Datum dostopa: 7.8.2016)
- (22) Area reports, International, Europe and Central Eurasia Yearbook 2008. US Department of the interior US Geological survey, Washington, 2010: 3: 292.
https://books.google.si/books?id=8URgMdQnIikC&pg=SA12-PA6&lpg=SA12-PA6&dq=occurrence+of+talc+mondo&source=bl&ots=2tN5FrpR_C&sig=07joGqsPh5y3iY9QiA5EokCCkMA&hl=sl&sa=X&ved=0ahUKewiPtYfhra_OAhXF0xQKHSKKDzA4ChDoAQgtMAE#v=onepage&q=talc&f=false (Datum dostopa: 7.8.2016)
- (23) EPA-USA Environmental Protection agency, Talc processing
<https://www3.epa.gov/ttn/chief/ap42/ch11/final/c11s26.pdf> (Datum dostopa: 7.8.2016)

- (24) Kogel J E, Trivedi N C, Barker J M, Krukowski S T: Industrial Minerals and Rocks, Commodities, Markets and uses; Littleton - Society for Mining, Metallurgy, and Exploration, 2006; 7: 971 – 985
https://books.google.si/books?id=zNicdkuulE4C&pg=PA975&lpg=PA975&dq=occurrence+of+talc+mondo&source=bl&ots=Nju8y0B8z9&sig=cuWuNW-8lmEwBpmGFuALj7PzCUg&hl=sl&sa=X&ved=0ahUKEwigm73Rra_OAhVHtRQKHSIIDV0Q6AEIQDAE#v=onepage&q=occurrence%20of%20talc%20mondo&f=false (Datum dostopa: 15.8.2016)
- (25) Electronic Medicines compendium – eMC
<https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/13237> (Datum dostopa: 15.8.2016)
- (26) International Pharmacopoeia, Fifth edition, 2015.
<http://apps.who.int/phint/en/p/docf/> (Datum dostopa: 15.8.2016)
- (27) PubChem, modelna učinkovina
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (Datum dostopa: 15.8.2016)
- (28) WHO BCS klasifikacija modelne učinkovine in testi sproščanja
http://www.gmp-compliance.org/guidemgr/files/WHO_TRS_937_ANNEX8.PDF
(Datum dostopa: 15.8.2016)
- (29) FDA smernice za teste sproščanja farmcevtskih oblik s takojšnjim sproščanjem,
<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm070237.pdf> (Datum dostopa: 16.8.2016)
- (30) EMA smernice za preiskovanje bioekvivalence
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf (Datum dostopa: 16.8.2016)
- (31) Particle Sciences, In vitro dissolution testing for solid oral dosage forms;
<http://www.particlesciences.com/news/technical-briefs/2010/in-vitro-dissolution-testing-for-solid-oral-dosage-forms.html> (Datum dostopa: 16.8.2016)
- (32) A guidebook to particle size analysis, Horiba.
https://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/eMag/PSA/Guidebook/pdf/PSA_Guidebook.pdf (Datum dostopa: 8.9.2016)
- (33) Particle analytical.
<http://particle.dk/> (Datum dostopa: 8.9.2016)

- (34) <http://www.particletechlabs.com/b-e-t-specific-surface-area> (Datum dostopa: 8.9.2016)
- (35) <http://www.chemistrylearning.com/adsorption-isotherm/> (Datum dostopa: 8.9.2016)
- (36) SEM 1928 – 1965.
<http://www-g.eng.cam.ac.uk/125/achievements/mcmullan/mcm.htm> (Datum dostopa: 10.9.2016)
- (37) Abudayyeh H A. Synthesis and analysis of ZnO Nanowires. Birzeit University, Palestine. A Bachelor senior project thesis, 2012, page 64. Research gate: https://www.researchgate.net/publication/263849645_Synthesis_and_Analysis_of_Zn_O_Nanowires/figures?lo=1 (Datum dostopa: 10.9.2016)
- (38) Vernon-Parry K D: Scanning electron microscopy: an introduction, Centre for electronic material UMIST, Elsevier, Vol. 13, 4: 2000;
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096112900080006X> (Datum dostopa: 10.9.2016)
- (39) Zhou W, Apkarian R, Wang Z L, Joy D: Scanning Microscopy for Nanotechnology, 1. Izdaja, Springer Science & Business Media, New York, ZDA, 2007; 1 – 12.
<https://books.google.si/books?id=i3XGkx1dc0UC&pg=PR5&lpg=PR5&dq=isbn+978-0-387-33325-0&source=bl&ots=W6U0NSgvkD&sig=Yeo5exBylRMex1LRWHOHut7SK5g&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwifyqfWu4TPAhXEuBoKHbBmDEYQ6AEIJzAC#v=onepage&q=isbn%20978-0-387-33325-0&f=false> (Datum dostopa: 10.09.2016)
- (40) <http://www.biologyreference.com/La-Ma/Light-Microscopy.html> (Datum dostopa: 10.09.2016)
- (41) <http://www.leica-microsystems.com/products/light-microscopes/details/product/leica-dm4-p/> (Datum dostopa: 10.09.2016)
- (42) <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/Spectrpy/InfraRed/infrared.htm> (Datum dostopa: 15.09.2016)
- (43) PCA analiza.
<http://vlado.fmf.uni-lj.si/vlado/podstat/Mva/PCA.pdf> (Datum dostopa: 15.9.2016)

7. PRILOGA

7.1. PRILOGE K UVODU



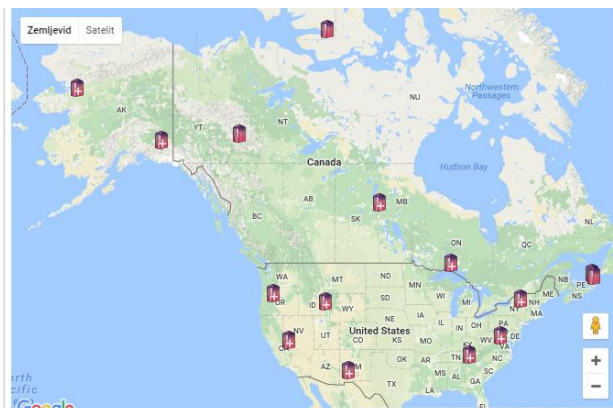
Slika 31: Pojavnost smukca v S Evropi (13)



Slika 32: Pojavnost smukca v Evropi (13)



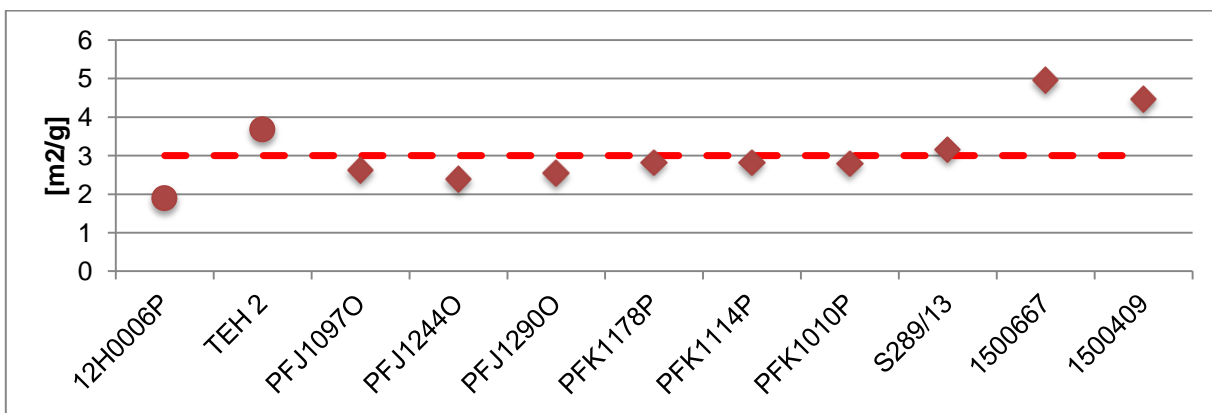
Slika 33: Pojavnost smukca na Kitajskem (13)



Slika 34: Pojavnost smukca v S Ameriki (13)

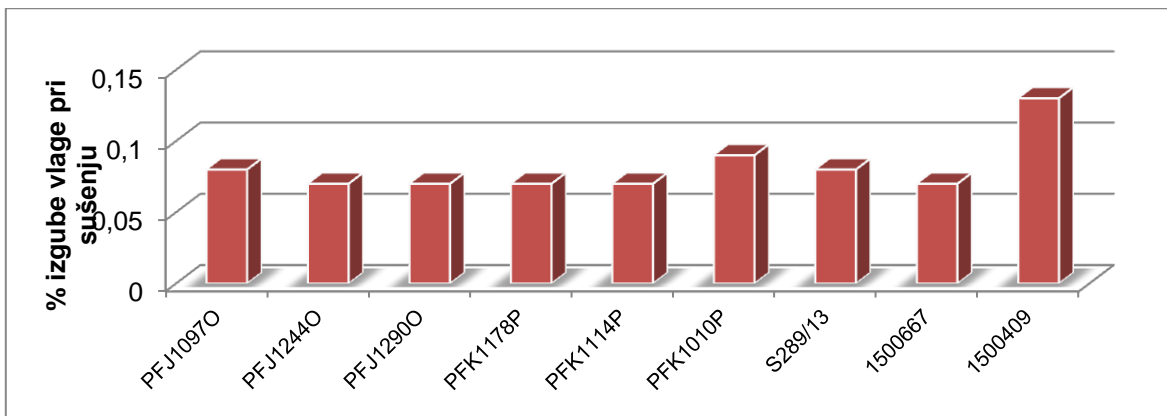
7.2. RAZŠIRJENI PODATKI TESTIRANJ

7.2.1. Merjenje specifične površine z metodo BET



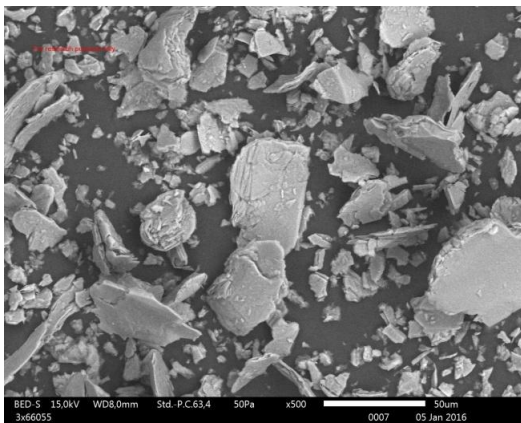
Slika 35: Primerjalni graf specifičnih površin smukca različnih vzorcev smukca

7.2.2. Merjenje izgube vlage pri sušenju - IPS

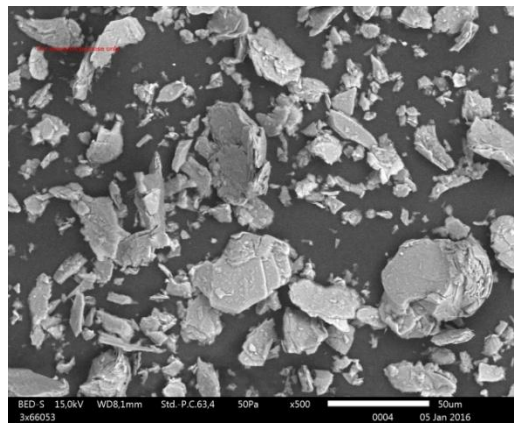


Slika 36: Grafični prikaz izgube vlage pri izpostavitvi vzorcev smukca sušenju

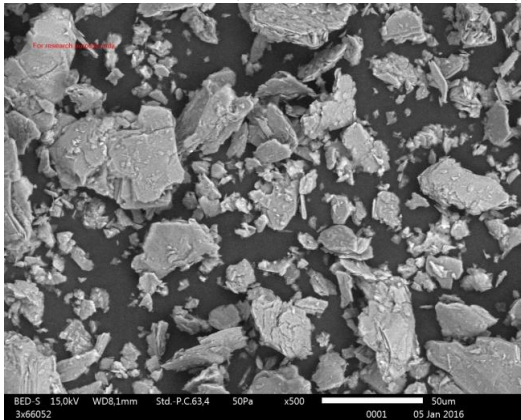
Pregled vzorcev z vrstičnim elektronskim mikroskopom - SEM



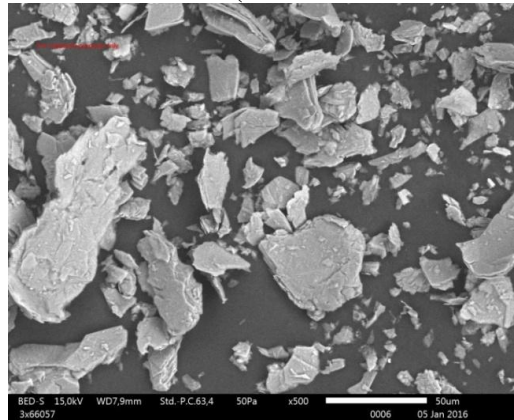
Slika 37: PFK1178P (Imifabi Talc 3355 Dense)



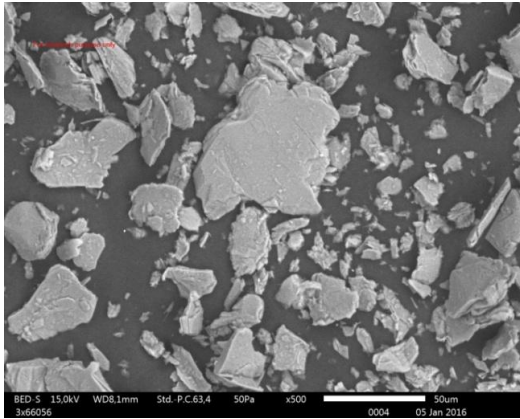
Slika 38: PFK1114P (Imifabi Talc 3355 Dense)



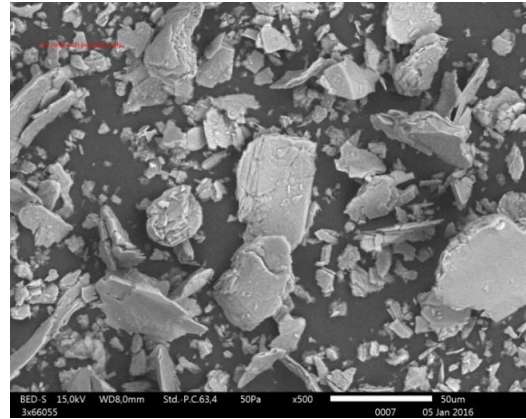
Slika 39: PFK1010P (Imifabi Talc 3355 Dense)



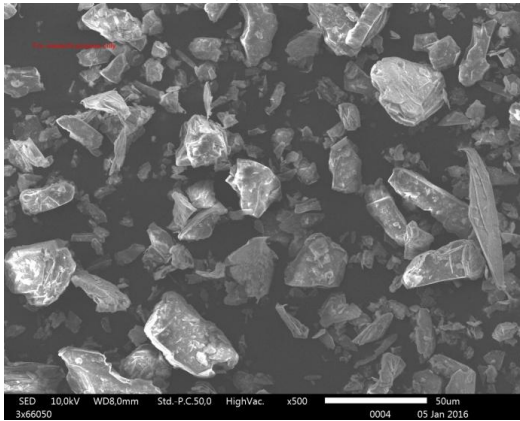
Slika 40: PFJ10970 (Imifabi Talc 3355)



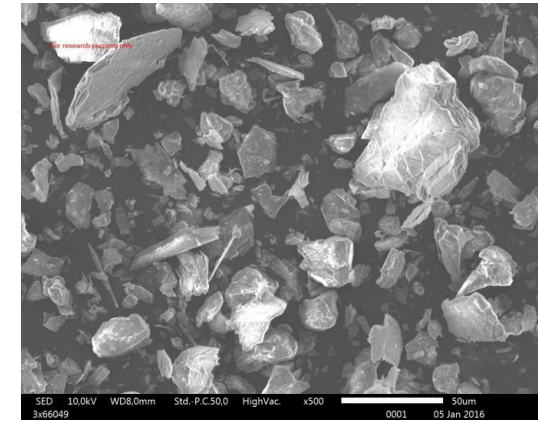
Slika 41:PFJ12440 (Imifabi Talc 3355)



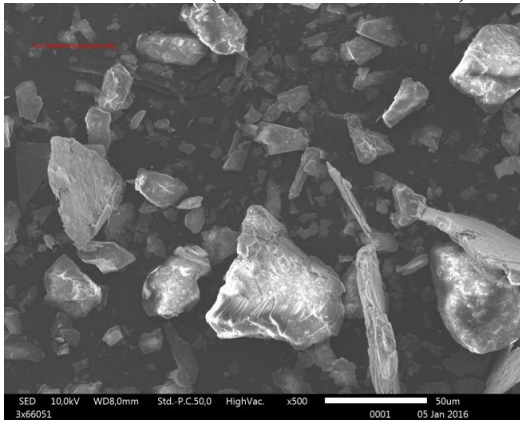
Slika 42:P PFJ12900 (Imifabi Talc 3355)



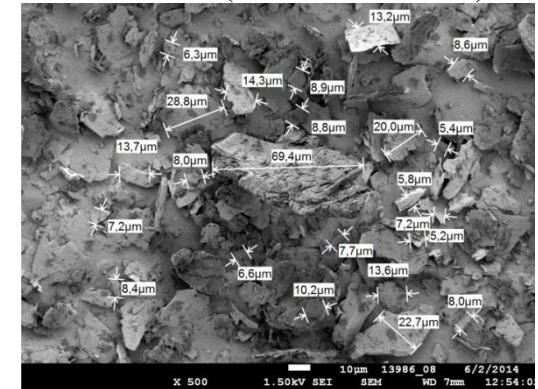
Slika 43: 1500667 (Microtalc Pharma 30)



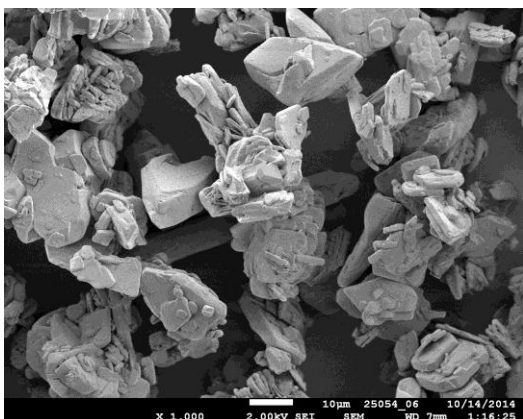
Slika 44: 1500409 (Microtalc Pharma 50)



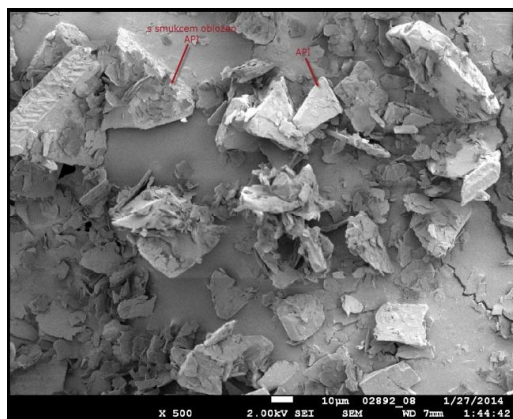
Slika 45: S289/13 (Luzenac, Luzenac Pharma)



Slika 46: Luzenac, Intalc 60 LA Pharma

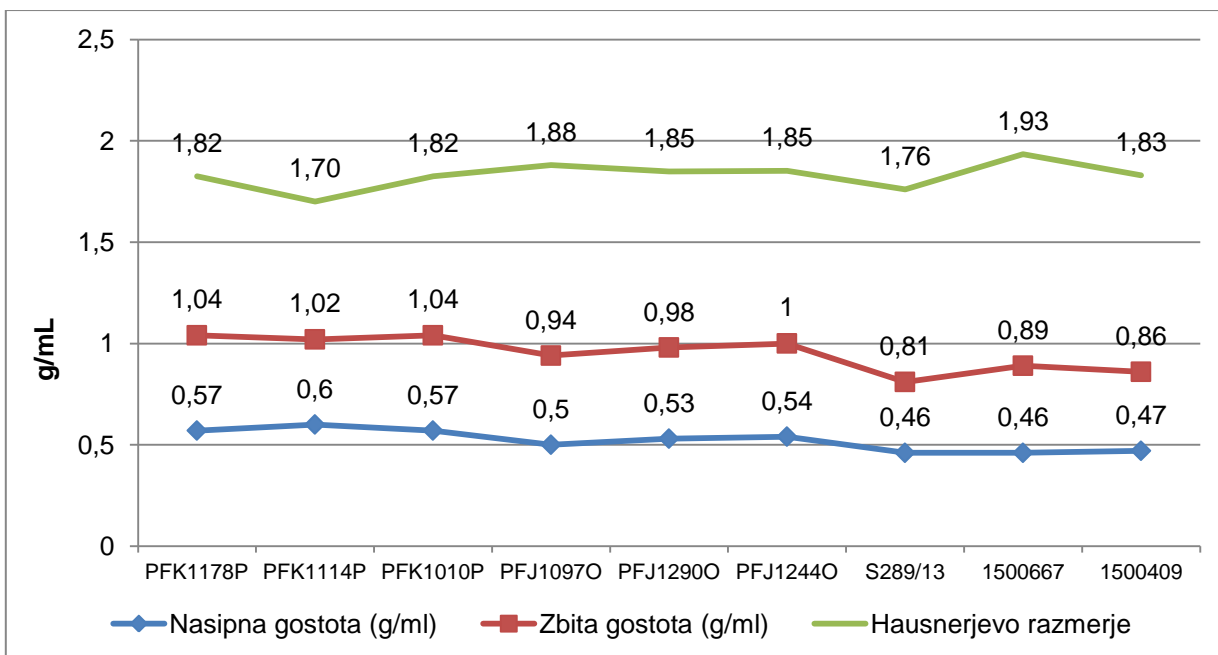


Slika 47: Modelna učinkovina



Slika 48: Modelna učinkovina obložena s smukcem

7.2.3. Sejalna analiza



Slika 49: Nasipne in zbite gostote smukcev

Preglednica XXVII: Povzetek rezultatov sejalnih analiz zmesi

Vzorec	Velikost sit	Zaostanek na sitih [%]			
		200µm	100 µm	45 µm	dno
001X-M	3*71331	2,53	15,82	74,19	7,49
002X-M	3*71332	1,23	14,42	76,12	8,29
003X-M	3*71333	2,07	11,93	80,30	5,90
004X-M	3*71334	1,17	11,51	83,92	3,60

Preglednica XXVIII: Rezultati sejalnih analiz smukcev

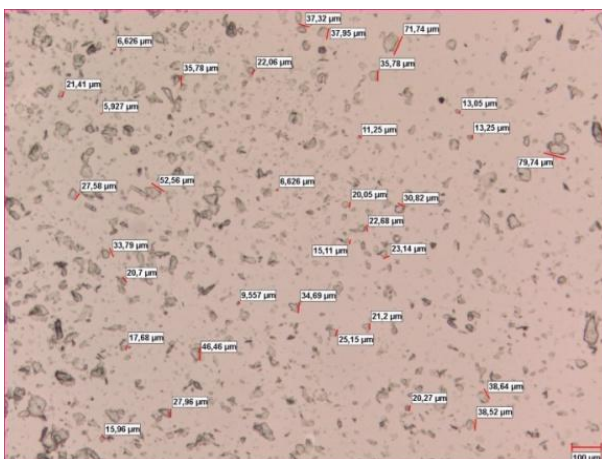
količina vzorca:				50,13
VZOREC:	3*66054			
SITO	TARA	BRUTO	NETO	delež ostanka
200	248,76	248,99	0,23	0,46%
100	241,76	242,54	0,78	1,56%
45	234,38	263,93	29,55	58,95%
dno	247,11	266,56	19,45	38,80%
skupaj	972,01	1022,02	50,01	99,76%
količina vzorca:				50,03
VZOREC:	3*66053			
SITO	TARA	BRUTO	NETO	delež ostanka
200	248,74	249,15	0,41	0,82%
100	241,69	242,58	0,89	1,78%
45	234,38	263,6	29,22	58,40%
dno	247,11	266,81	19,70	39,38%
skupaj	971,92	1022,14	50,22	100,38%
količina vzorca:				50,23
VZOREC:	3*66052			
SITO	TARA	BRUTO	NETO	delež ostanka
200	248,77	249,09	0,32	0,64%
100	241,75	242,46	0,71	1,41%
45	234,4	264,81	30,41	60,54%
dno	247,15	265,89	18,74	37,31%
skupaj	972,07	1022,25	50,18	99,90%
količina vzorca:				50,01
VZOREC:	3*66057			
SITO	TARA	BRUTO	NETO	delež ostanka
200	248,74	249,14	0,40	0,80%
100	241,76	242,22	0,46	0,92%
45	234,42	260,95	26,53	52,99%
dno	247,16	269,7	22,54	45,02%
skupaj	972,08	1022,01	49,93	99,72%
količina vzorca:				50,07
VZOREC:	3*66055			
SITO	TARA	BRUTO	NETO	delež ostanka
200	248,8	249,14	0,34	0,68%
100	241,75	242,27	0,52	1,04%
45	234,43	259,62	25,19	50,31%
dno	247,12	271,13	24,01	47,95%
skupaj	972,1	1022,16	50,06	99,98%
količina vzorca:				50,22
VZOREC:	3*66056			
SITO	TARA	BRUTO	NETO	delež ostanka
200	248,77	249,24	0,47	0,94%
100	241,74	242,28	0,54	1,08%
45	234,38	257,86	23,48	46,75%
dno	247,12	272,92	25,80	51,37%

skupaj	972,01	1022,3	50,29	100,14%
količina vzorca:				50,22
VZOREC:	3*66051			
SITO	TARA	BRUTO	NETO	delež ostanka
200	248,72	249,22	0,50	1,00%
100	241,72	242,35	0,63	1,25%
45	234,37	263,39	29,02	57,79%
dno	247,12	267,2	20,08	39,98%
skupaj	971,93	1022,16	50,23	100,02%
količina vzorca:				50,15
VZOREC:	3*66050			
SITO	TARA	BRUTO	NETO	delež ostanka
200	248,75	249,49	0,74	1,48%
100	241,71	242,64	0,93	1,85%
45	234,39	272,29	37,90	75,57%
dno	247,15	257,67	10,52	20,98%
skupaj	972	1022,09	50,09	99,88%
količina vzorca:				50,05
VZOREC:	3*66049			
SITO	TARA	BRUTO	NETO	delež ostanka
200	248,68	249,39	0,71	1,42%
100	241,65	246,2	4,55	9,09%
45	234,3	266,98	32,68	65,29%
dno	247,1	259,16	12,06	24,10%
skupaj	971,73	1021,73	50,00	99,90%

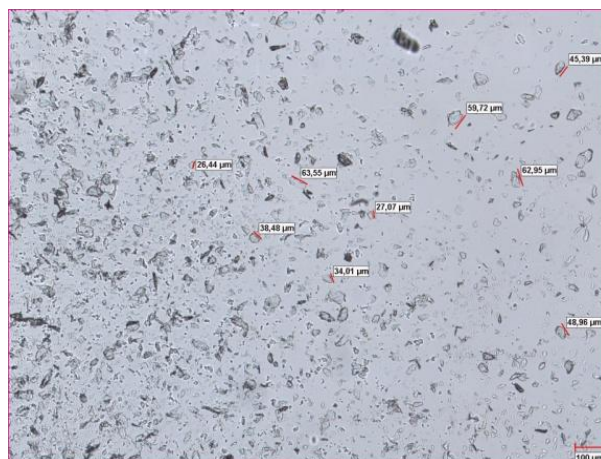
Preglednica XXIX: Rezultati sejalnih analiz pripravljenih zmesi

količina vzorca:				30,03
VZOREC:	001X-M			
SITO	TARA	BRUTO	NETO	delež ostanka
200	239,13	239,89	0,76	2,53%
100	228,36	233,11	4,75	15,82%
45	257,86	280,14	22,28	74,19%
dno	352,5	354,75	2,25	7,49%
skupaj	1077,85	1107,89	30,04	100,03%
količina vzorca:				30,03
VZOREC:	002X-M			
SITO	TARA	BRUTO	NETO	delež ostanka
200	239,17	239,54	0,37	1,23%
100	228,4	232,73	4,33	14,42%
45	257,83	280,69	22,86	76,12%
dno	352,45	354,94	2,49	8,29%
skupaj	1077,85	1107,9	30,05	100,07%
količina vzorca:				30
VZOREC:	003X-M			
SITO	TARA	BRUTO	NETO	delež ostanka
200	239,22	239,84	0,62	2,07%
100	228,45	232,03	3,58	11,93%
45	257,91	282	24,09	80,30%
dno	352,48	354,25	1,77	5,90%
skupaj	1078,06	1108,12	30,06	100,20%
količina vzorca:				29,97
VZOREC:	004X-M			
SITO	TARA	BRUTO	NETO	delež ostanka
200	239,27	239,62	0,35	1,17%
100	228,44	231,89	3,45	11,51%
45	257,85	283	25,15	83,92%
dno	352,44	353,52	1,08	3,60%
skupaj	1078	1108,03	30,03	100,20%

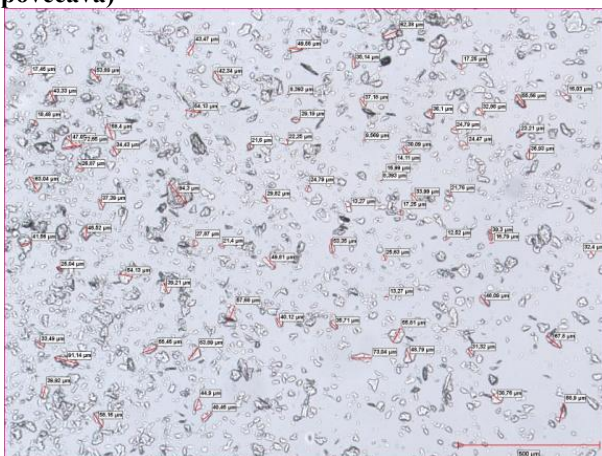
7.2.4. Pregled vzorcev z optičnim mikroskopom s polarizirano svetlobo



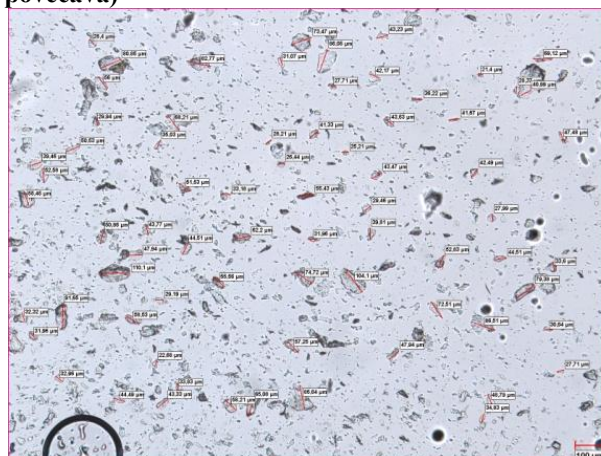
Slika 50: PFJ12440, Imifabi, Talc 3355 (50x povečava)



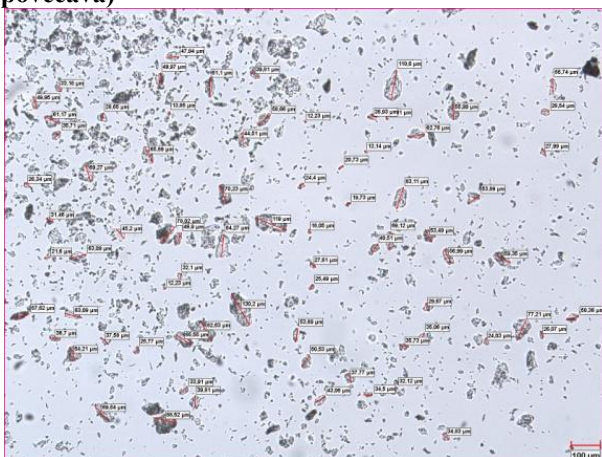
Slika 51: PFJ10970, Imifabi, Talc 3355 (50x povečava)



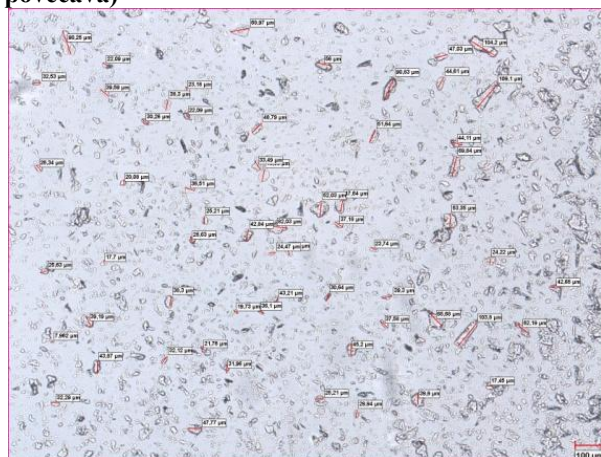
Slika 52: PFJ12900, Imifabi Talc 3355 (50x povečava)



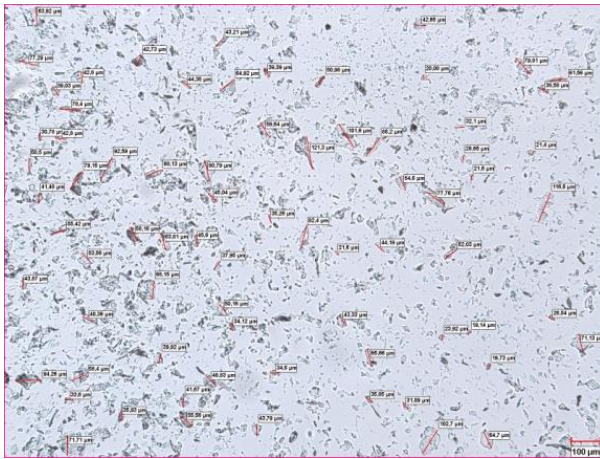
Slika 53: PFK1010P, Imifabi Talc 3355 Dense (50x povečava)



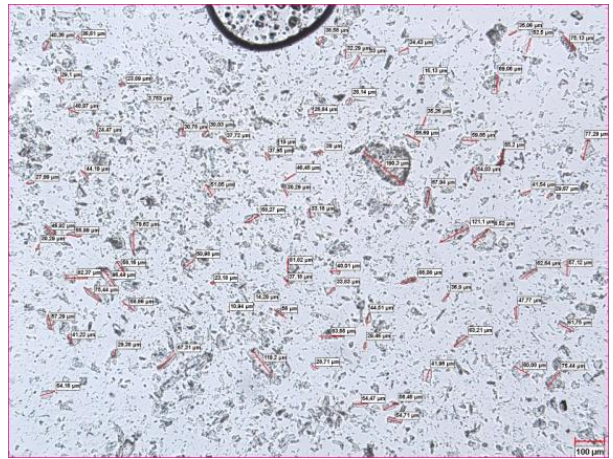
Slika 54: PFK1114P, Imifabi Talc 3355 Dense (50x povečava)



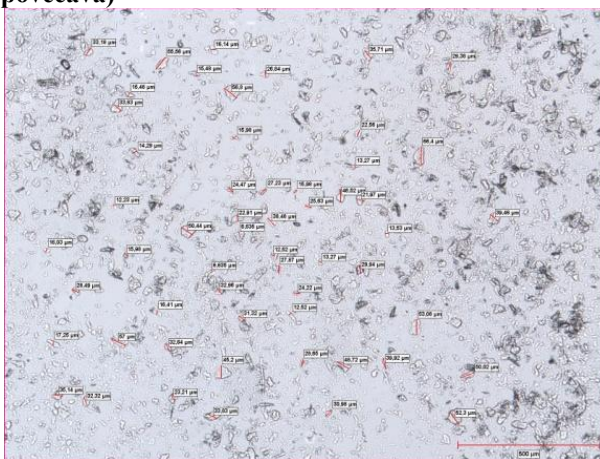
Slika 55: PFK1178P, Imifabi Talc 3355 Dense (50x povečava)



Slika 56: S289/13, Luzenac, Luzenac Pharma (50x povečava)

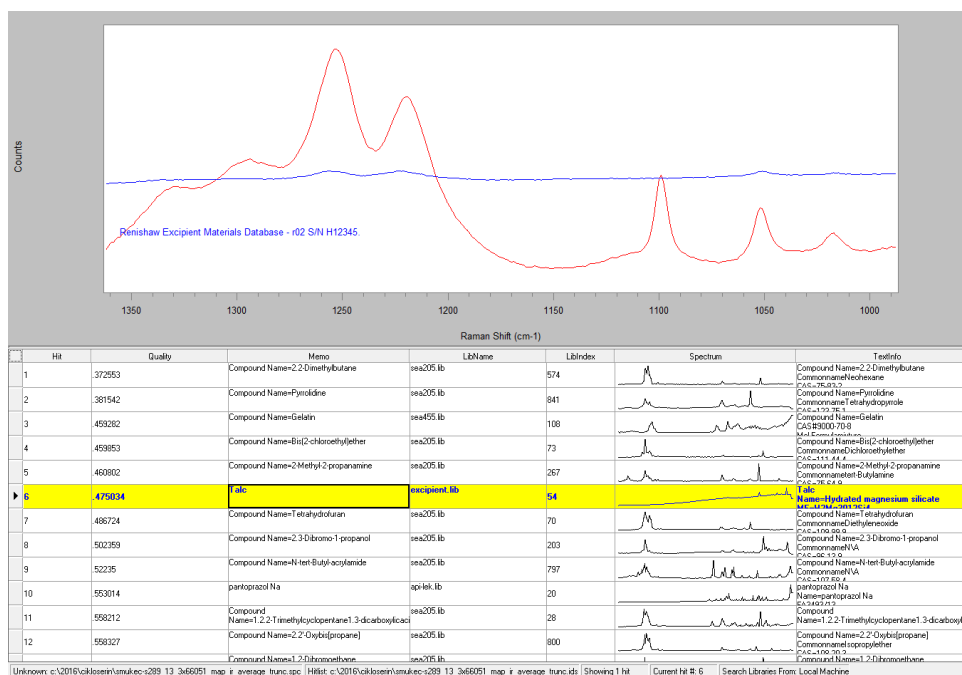


Slika 57: 1500409, Mondo, Microtalc Pharma 50 (50x povečava)



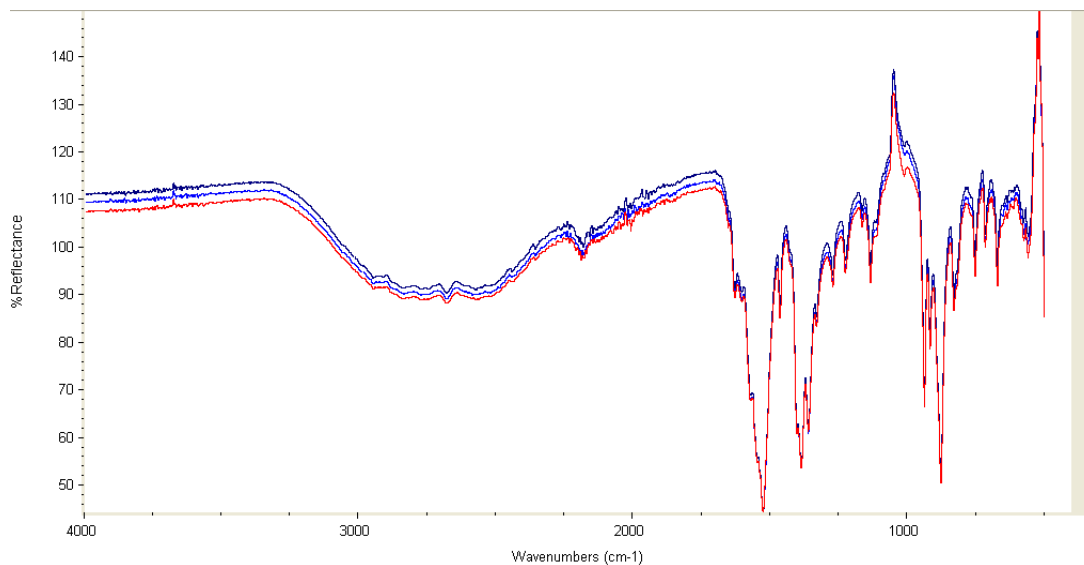
Slika 58: 1500667, Mondo, Microtalc 30 (50x povečava)

7.2.5. Analiza vzorcev z Ramanskim spektrometrom



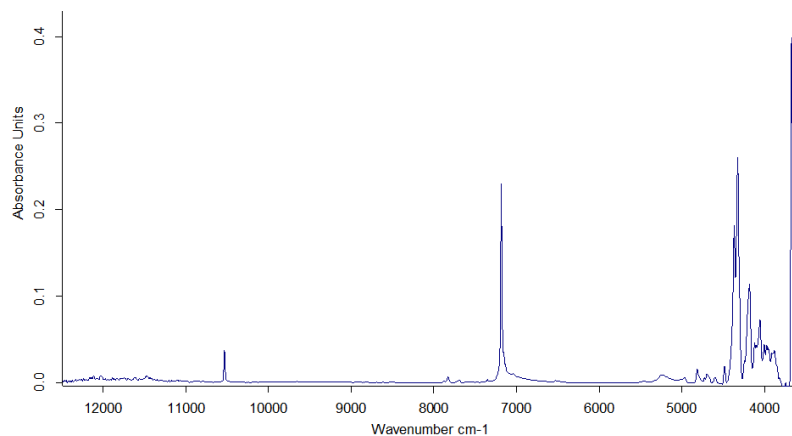
Slika 59: Ramanski spekter smukca S289/13 (rdeč) v območju 1200 - 1350 cm^{-1} primerjan z referenčnim spektrom smukca (moder) iz knjižnice spektrov (programska oprema Spectral ID)

7.2.6. Analiza MID spektrov

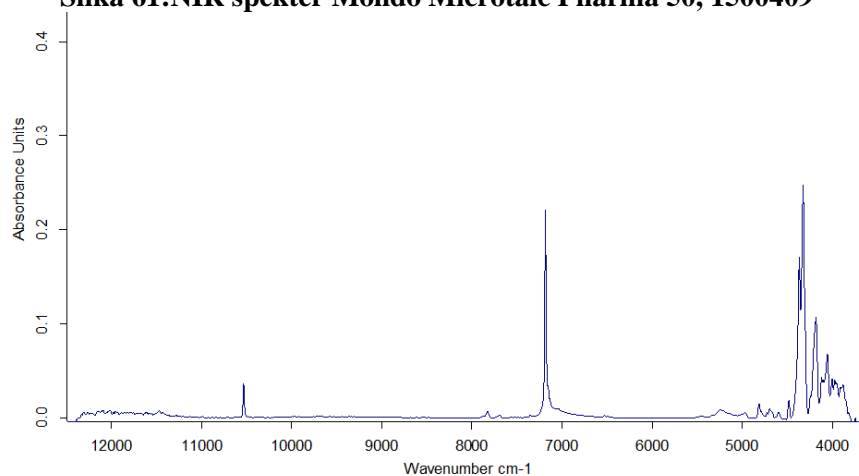


Slika 60: MID-IR spekter modelne učinkovine

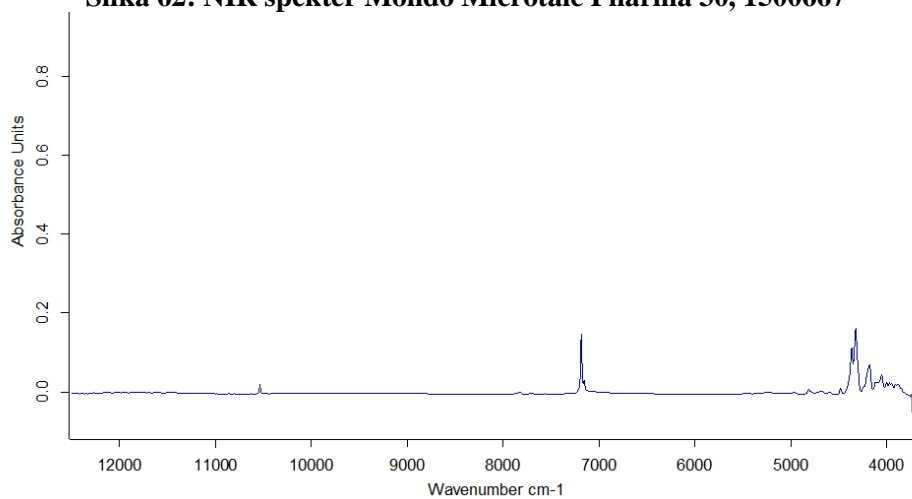
7.2.7. Analiza NIR spektrov



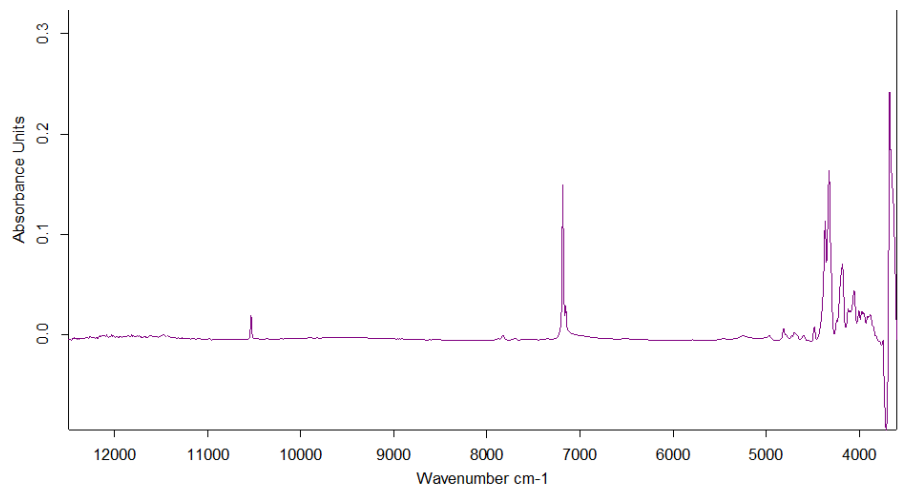
Slika 61: NIR spekter Mondo Microtalc Pharma 50, 1500409



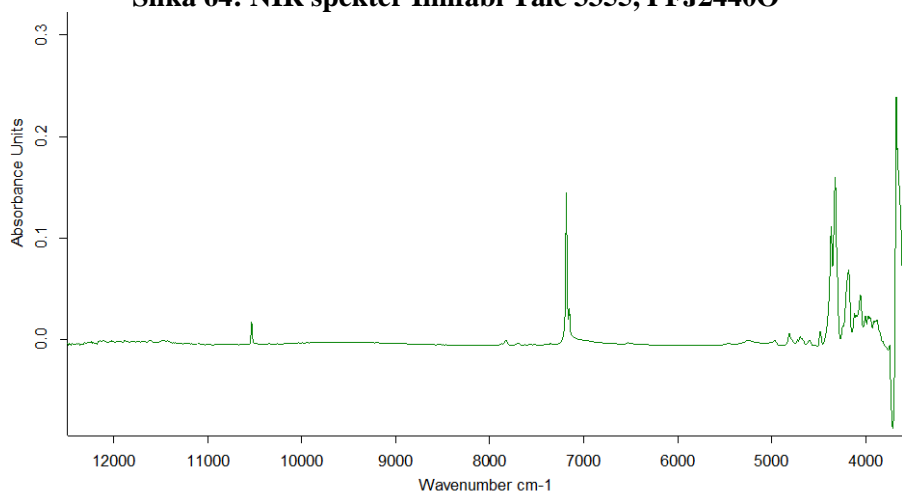
Slika 62: NIR spekter Mondo Microtalc Pharma 30, 1500667



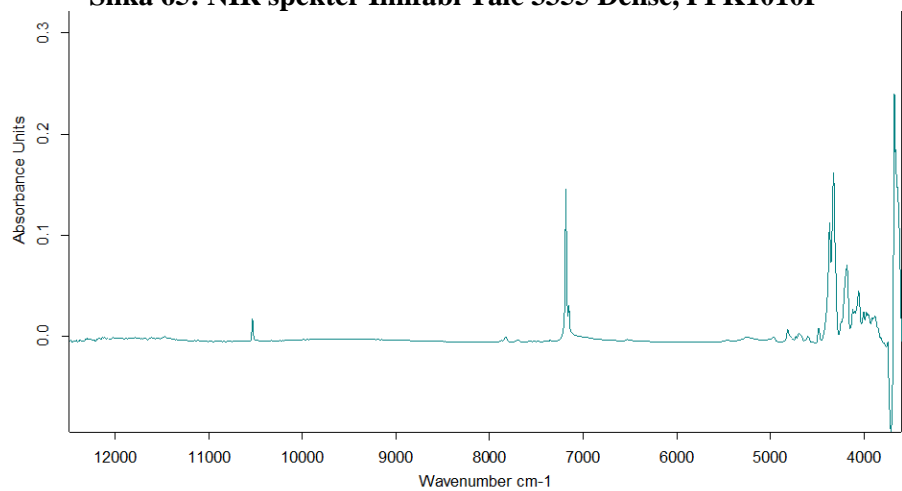
Slika 63: NIR spekter Imifabi Talc 3355, PFJ12900



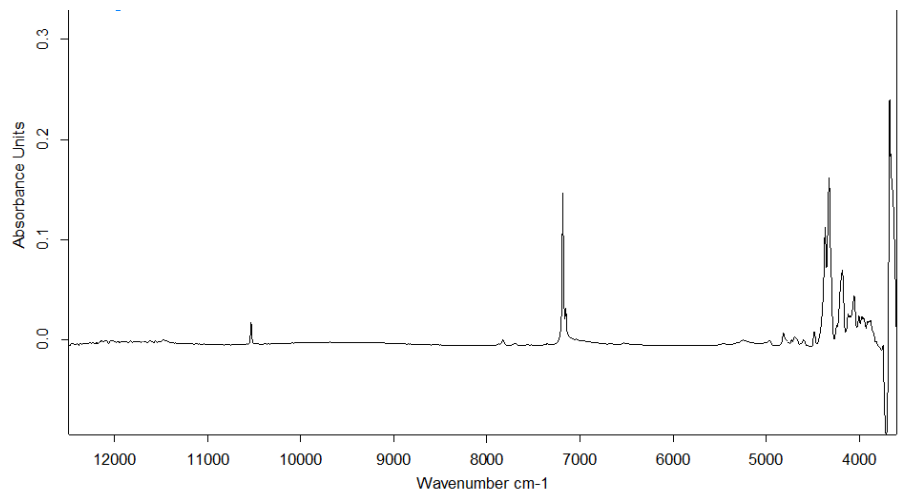
Slika 64: NIR spekter Imifabi Talc 3355, PFJ2440O



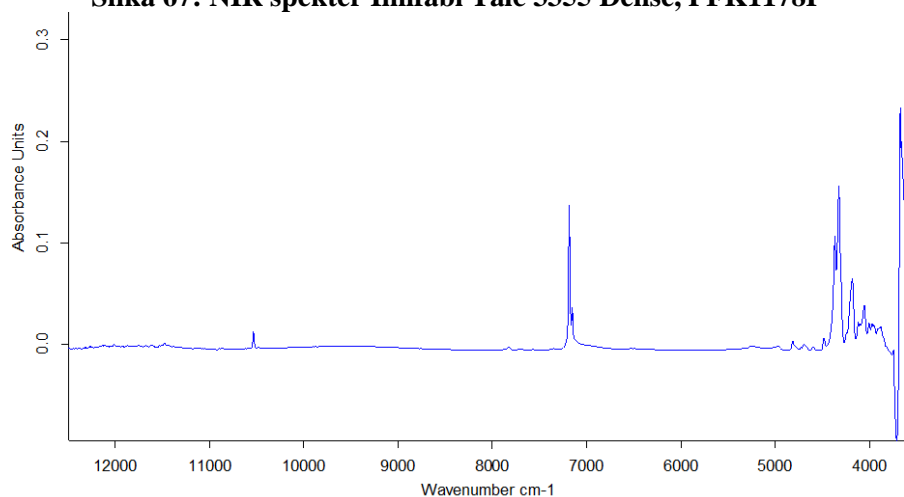
Slika 65: NIR spekter Imifabi Talc 3355 Dense, PFK1010P



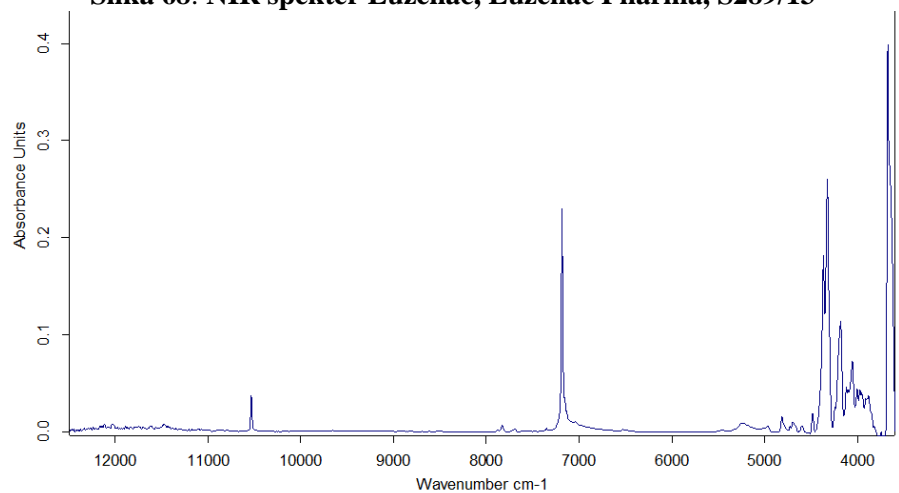
Slika 66: NIR spekter Imifabi Talc 3355 Dense, PFK1114P



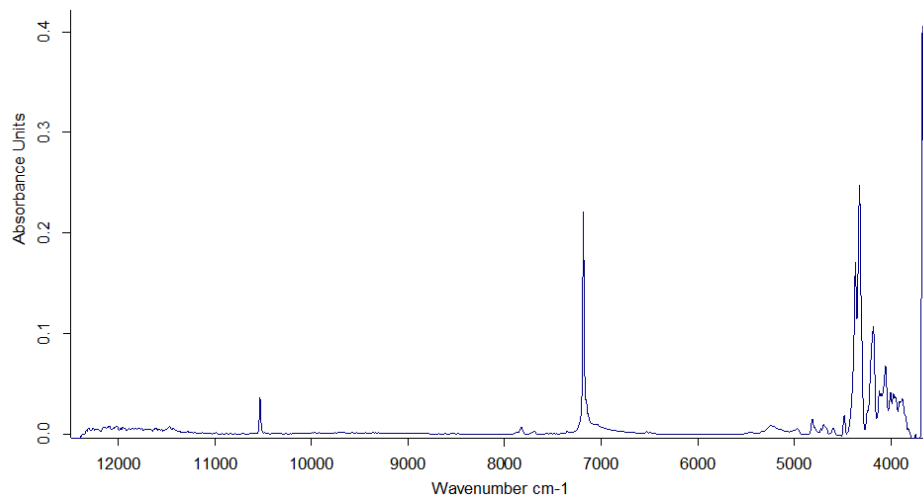
Slika 67: NIR spekter Imifabi Talc 3355 Dense, PFK1178P



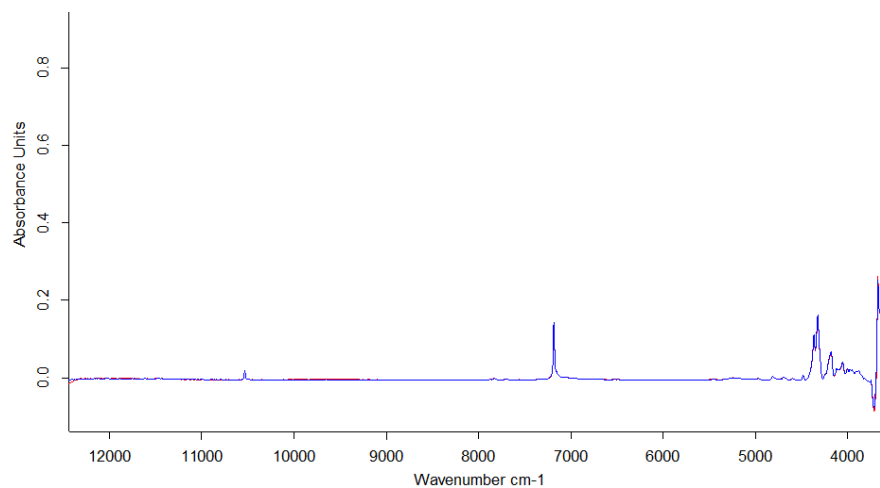
Slika 68: NIR spekter Luzenac, Luzenac Pharma, S289/13



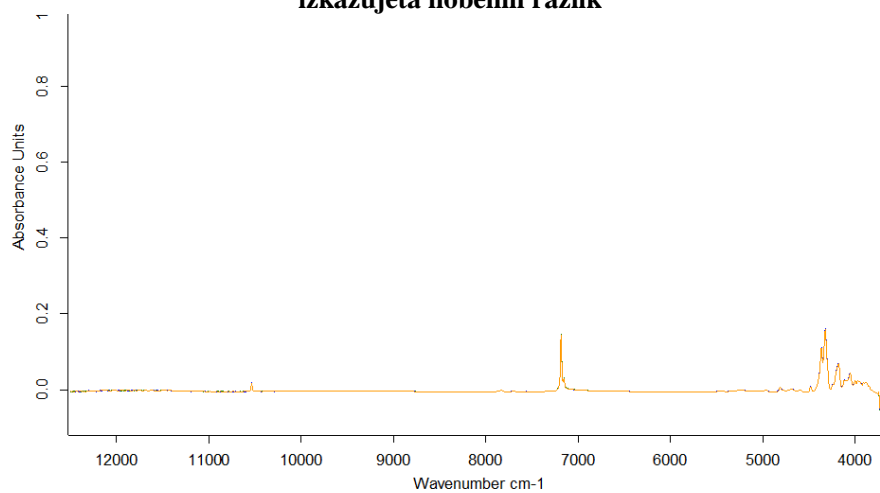
Slika 69: NIR spekter Mondo, Microtalc Pharma 50, 1500409



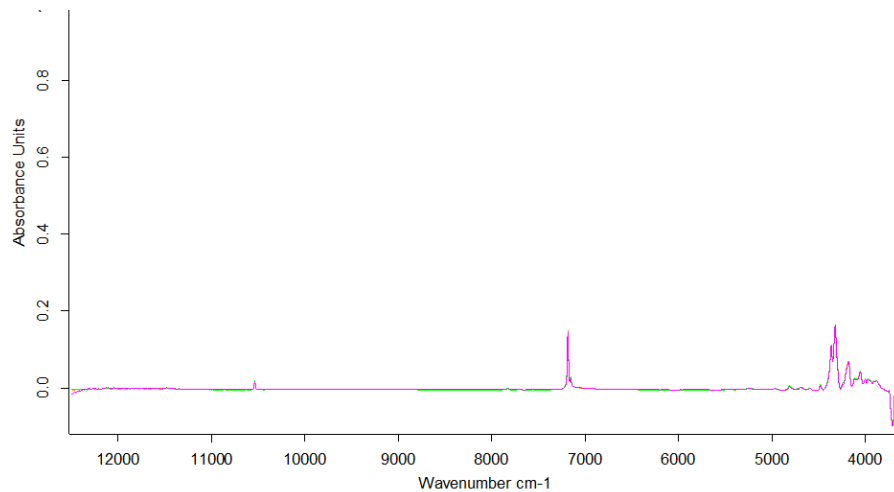
Slika 70: NIR spekter Mondo, Microtalc Pharma 30, 1500667



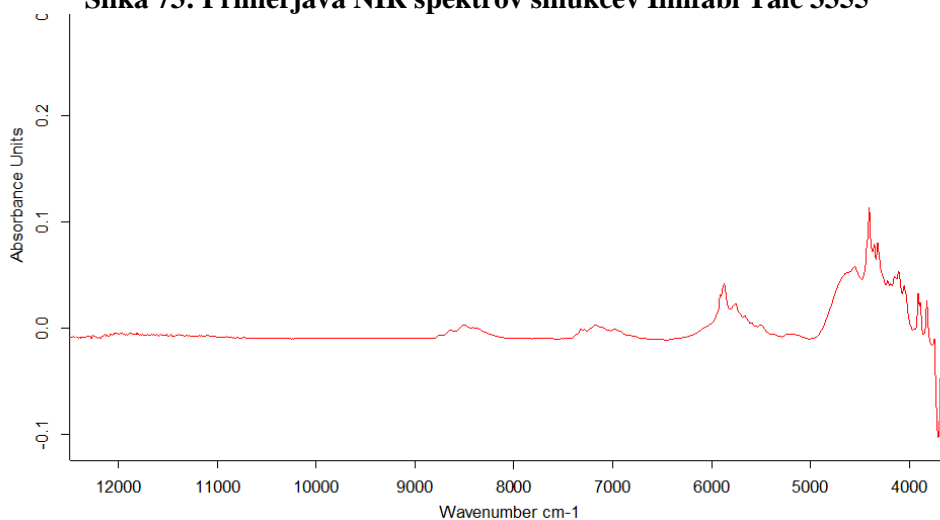
Slika 71: Primerjava NIR spektrov smukcev Microtalc Pharma 30 in Microtalc Pharma 50, ne izkazujeta nobenih razlik



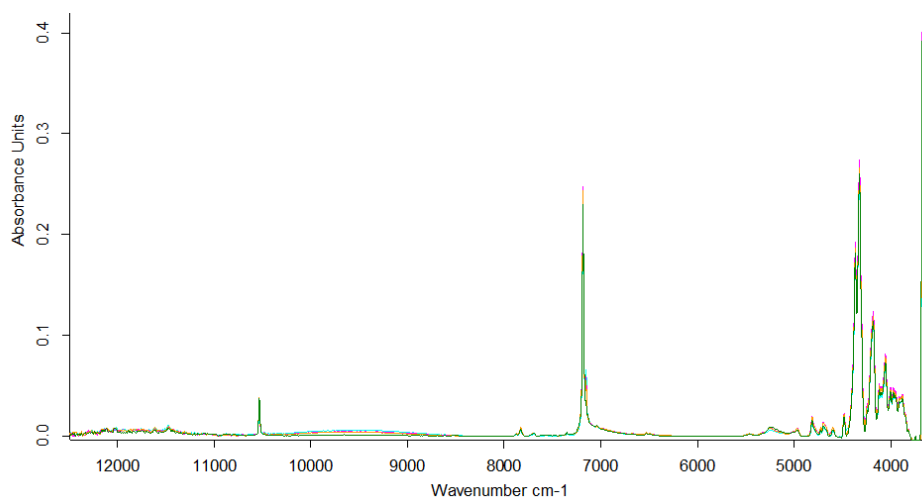
Slika 72: Primerjava NIR spektrov Imifabi Talc 3355 Dense



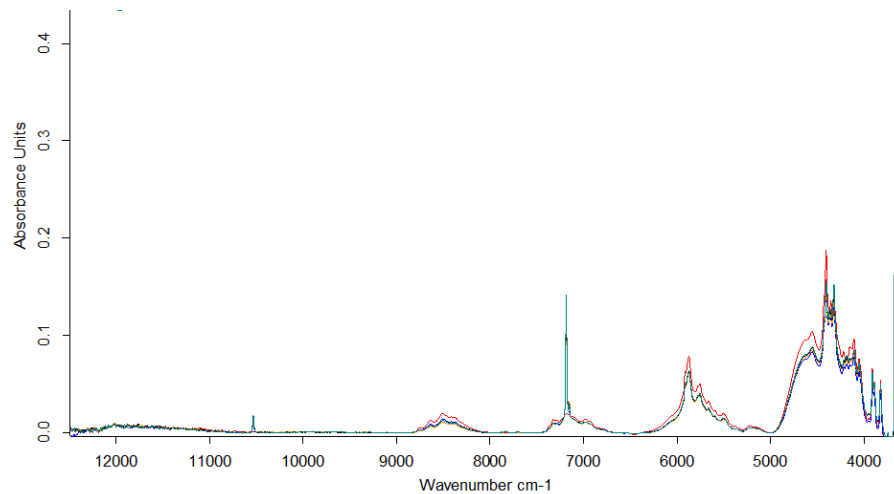
Slika 73: Primerjava NIR spektrov smukcev Imifabi Talc 3355



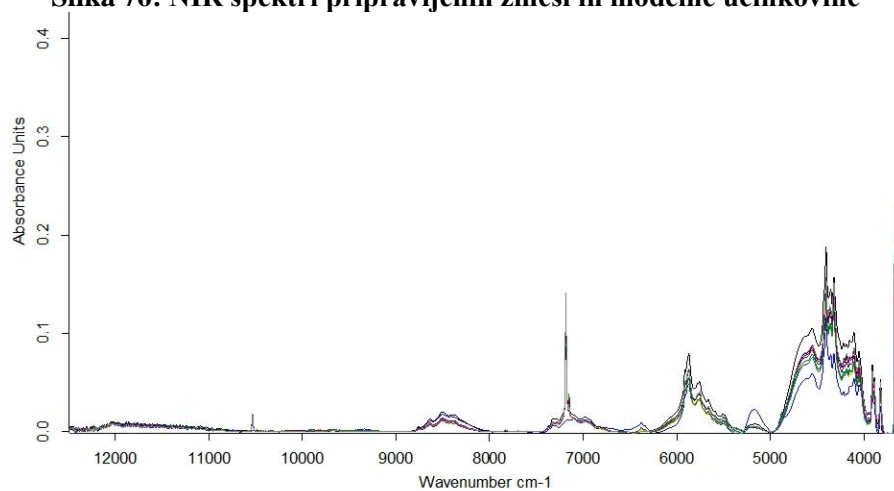
Slika 74: NIR spekter modelne učinkovine



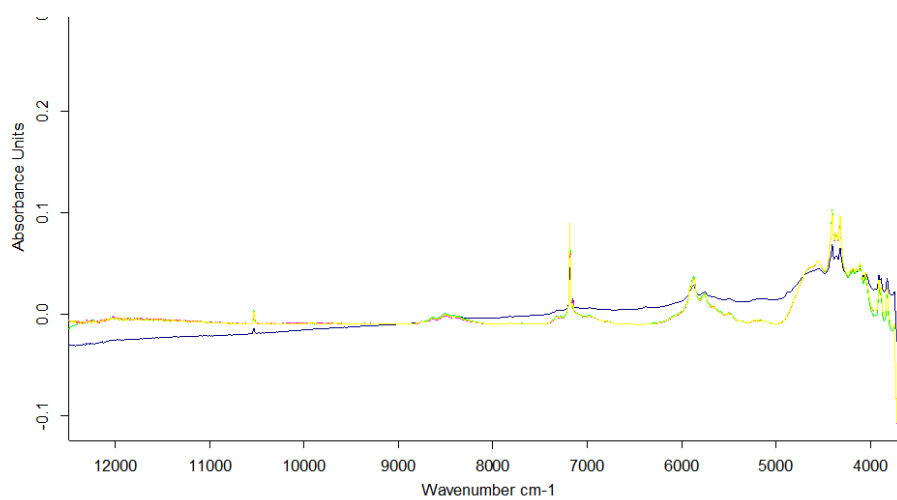
Slika 75: NIR spekter smukcev, ki so vstopali v pripravljene zmesi (PFJ12900, PFK1114P, 1500409 in S289/13)



Slika 76: NIR spektri pripravljenih zmesi in modelne učinkovine

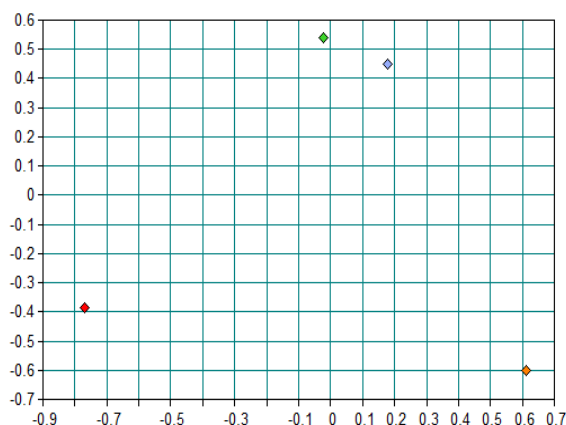


Slika 77: NIR spektri pripravljenih zmesi in zmesi referenčnih originatorskih zdravil

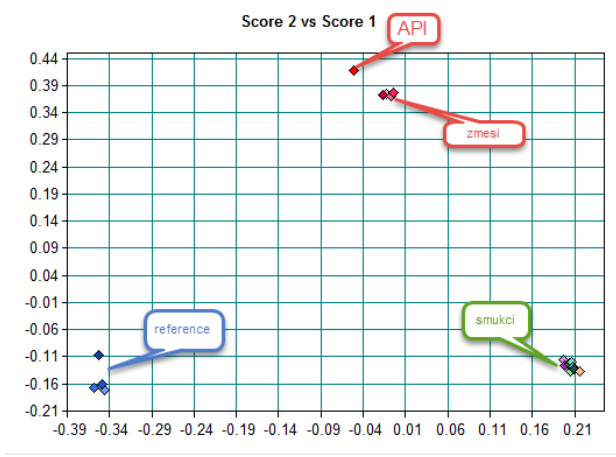


Slika 78: NIR spektri pripravljenih zmesi in RLD 12H0006P (modro)

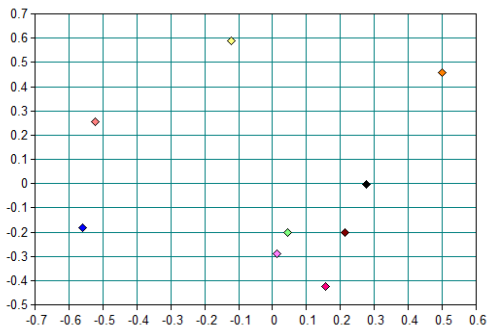
7.2.8. PCA analiza



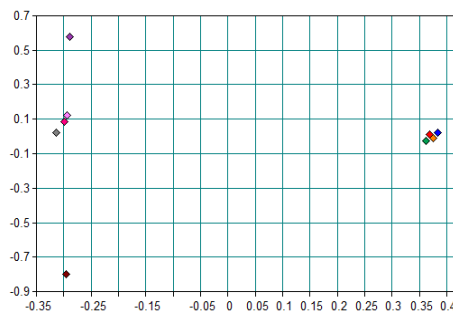
Slika 79: Informativna PCA analiza smukcev, s katerimi smo pripravili zmesi 001X-M, 002X-M, 003X-M in 004X-M



Slika 80: Informativna PCA analiza vseh vzorcev



Slika 81: Informativna PCA analiza vzorcev smukca



Slika 82: Informativna PCA analiza pripravljenih zmesi (desno) in zmesi RLD (levo)

7.2.9. Preverjanje ustreznosti kromatografskega sistema in umeritvene premice

Preglednica XXX: Preverjanje ustreznosti kromatografskega sistema 1

Test ustreznosti kromatografskega sistema	
Koncentracija	Površina signala
0,153 mg/mL	240,7
	247,433
	244,555
AVG	244,229
SD	3,378293
RSD	1,4

Preglednica XXXI: Rezultati umeritvene premice 1

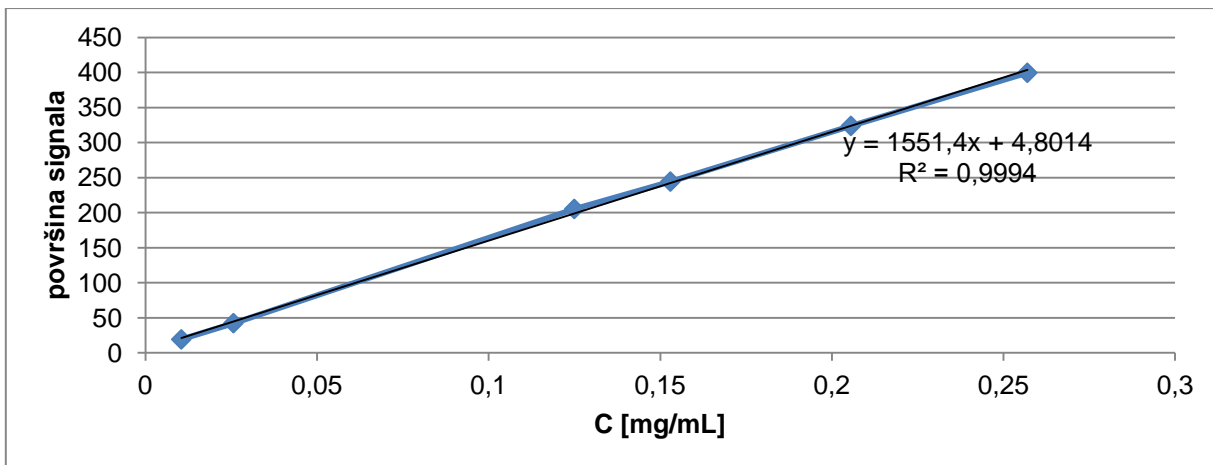
Koncentracija [mg/mL]	Površina signala
0,0105	19,059
0,0257	42,227
0,125	205,194
0,153	244,229
0,2056	323,710
0,257	399,498

Preglednica XXXII: Preverjanje ustreznosti HPLC sistema 2

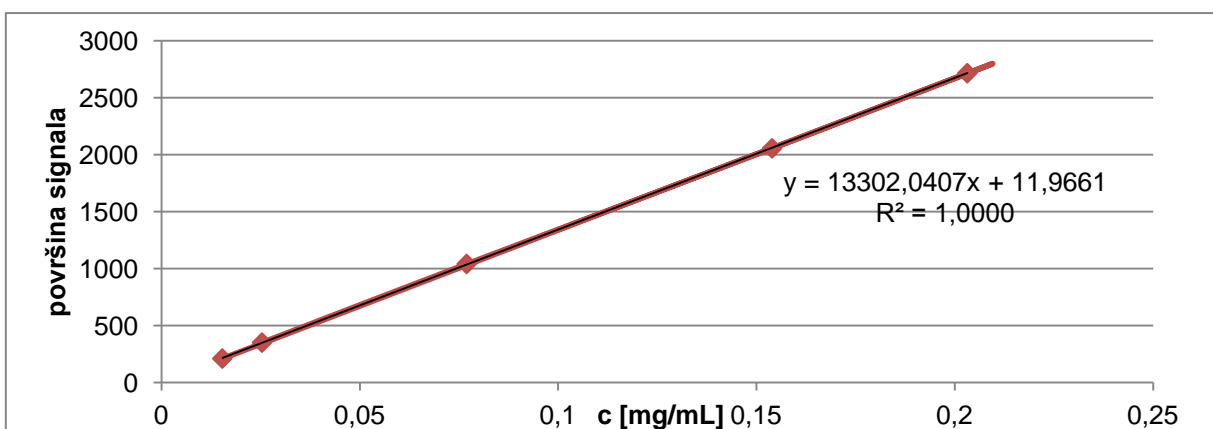
Test ustreznosti kromatografskega sistema	
Koncentracija [mg/mL]	Površina signala [mAU*s]
0,254	3276,3
	3216,1
	3226,2
	3219,9
AVG	3234,625
SD	28,09382
RSD	0,87

Preglednica XXXIII: Rezultati umeritvene premice 2

Koncentracija [mg/mL]	Površina signala [mAU*s]
0,0254	351,9
0,077	1042
0,154	2056,6
0,2032	2715,8
0,0154	212
0,0254	351,9



Slika 83: Umeritvena premica 1



Slika 84: Umeritvena premica 2

7.2.10. HPLC meritve

Preglednica XXXIV: »Raw data« rezultati HPLC analiz disolucijskih vzorcev

Številka viala	Vzorec	Čas vzorčenja [min]	Površina peaka	c (iz umeritvene premice) [mg/ml]	c [%]
1	001-XM	5	1516,8	0,113128048	45,251
2	001-XM	5	2057,7	0,153790982	61,516
3	001-XM	5	2102,5	0,157158886	62,864
4	001-XM	5	2048,9	0,153129429	61,252
5	001-XM	5	2361,7	0,176644618	70,658
6	001-XM	5	2019,3	0,150904207	60,362
7	002X-M	5	1607,1	0,11991648	47,967
8	002X-M	5	1734,9	0,129524029	51,810
9	001-XM	10	2884,4	0,215939341	86,376
10	001-XM	10	2958,9	0,221539985	88,616
11	001-XM	10	3336,4	0,249919089	99,968
12	001-XM	10	2855	0,213729154	85,492
13	001-XM	10	3324,8	0,249047043	99,619
14	001-XM	10	3149	0,235831026	94,332
15	002X-M	10	2721,3	0,203678064	81,471
16	002X-M	10	2702,2	0,202242194	80,897
17	001-XM	15	3372,2	0,252610406	101,044
18	001-XM	15	3346,1	0,250648301	100,259
19	001-XM	15	3434,3	0,257278862	102,912
20	001-XM	15	3208,2	0,24028147	96,113
21	001-XM	15	3468,3	0,259834861	103,934
22	001-XM	15	3506,2	0,262684048	105,074
23	002X-M	15	3204	0,239965729	95,986
24	002X-M	15	3031,5	0,226997794	90,799
25	001-XM	20	3457	0,258985368	103,594
26	001-XM	20	3433,1	0,257188651	102,875
27	001-XM	20	3446,5	0,258196015	103,278
28	001-XM	20	3411	0,255527252	102,211
29	001-XM	20	3467,6	0,259782238	103,913
30	001-XM	20	3531,4	0,264578494	105,831
31	002X-M	20	3379,5	0,253159194	101,264
32	002X-M	20	3230	0,241920317	96,768
33	001-XM	30	3486,5	0,261203072	104,481
34	001-XM	30	3524,5	0,264059777	105,624
35	001-XM	30	3484,1	0,261022649	104,409
36	001-XM	30	3358	0,2515429	100,617
37	001-XM	30	3484,6	0,261060237	104,424
38	001-XM	30	3552,8	0,26618727	106,475

39	002X-M	30	3480,9	0,260782084	104,313
40	002X-M	30	3441,9	0,257850203	103,140
41	001-XM	45	3555,2	0,266367693	106,547
42	001-XM	45	3529,8	0,264458212	105,783
43	001-XM	45	3467,5	0,25977472	103,910
44	001-XM	45	3448,4	0,25833885	103,336
45	001-XM	45	3491,9	0,261609025	104,644
46	001-XM	45	3546,5	0,265713659	106,285
47	002X-M	45	3439,5	0,25766978	103,068
48	002X-M	45	3433,3	0,257203686	102,881
49	002X-M	5	1861,8	0,139063918	55,626
50	002X-M	5	1798,5	0,13430525	53,722
51	002X-M	5	2571,3	0,192401599	76,961
52	002X-M	5	1746,1	0,130366005	52,146
53	003X-M	5	841,2	0,062338849	24,936
54	003X-M	5	536,7	0,039447624	15,779
55	003X-M	5	730,1	0,053986747	21,595
56	003X-M	5	792,9	0,058707827	23,483
57	002X-M	10	3288,4	0,246310621	98,524
58	002X-M	10	2733,9	0,204625287	81,850
59	002X-M	10	3420,5	0,256241428	102,497
60	002X-M	10	2881,4	0,215713811	86,286
61	003X-M	10	2078,9	0,155384722	62,154
62	003X-M	10	2343,5	0,175276407	70,111
63	003X-M	10	2060,1	0,153971405	61,589
64	003X-M	10	2410,1	0,180283158	72,113
65	002X-M	15	3476,4	0,26044379	104,178
66	002X-M	15	3119,9	0,233643391	93,457
67	002X-M	15	3556,9	0,266495493	106,598
68	002X-M	15	3274,5	0,245265668	98,106
69	003X-M	15	2586,6	0,193551798	77,421
70	003X-M	15	2899,3	0,21705947	86,824
71	003X-M	15	2615,3	0,195709362	78,284
72	003X-M	15	2909,3	0,217811234	87,124
73	002X-M	20	3519,7	0,26369893	105,480
74	002X-M	20	3307,4	0,247738973	99,096
75	002X-M	20	3565,6	0,267149528	106,860
76	002X-M	20	3440,5	0,257744956	103,098
77	003X-M	20	2960,1	0,221630197	88,652
78	003X-M	20	3125,2	0,234041826	93,617
79	003X-M	20	2908,1	0,217721022	87,088
80	003X-M	20	3181,3	0,238259224	95,304
81	002X-M	30	3582,3	0,268404975	107,362

82	002X-M	30	3444,5	0,258045662	103,218
83	002X-M	30	3586,4	0,268713198	107,485
84	002X-M	30	3483,6	0,260985061	104,394
85	003X-M	30	3268,9	0,24484468	97,938
86	003X-M	30	3372,2	0,252610406	101,044
87	003X-M	30	3292,9	0,246648915	98,660
88	003X-M	30	3492,7	0,261669166	104,668
89	002X-M	45	3596,3	0,269457445	107,783
90	002X-M	45	3438,5	0,257594604	103,038
91	002X-M	45	3677,9	0,275591842	110,237
92	002X-M	45	3522	0,263871836	105,549
93	003X-M	45	3398,6	0,254595064	101,838
94	003X-M	45	3473,3	0,260210743	104,084
95	003X-M	45	3485,4	0,261120378	104,448
96	003X-M	45	3500	0,262217954	104,887
97	003X-M	5	979,7	0,072750785	29,100
98	003X-M	5	1362,9	0,101558395	40,623
99	004X-M	5	1061,1	0,078870147	31,548
100	004X-M	5	985,6	0,073194326	29,278
101	004X-M	5	1010,4	0,075058701	30,023
102	004X-M	5	678,3	0,050092607	20,037
103	004X-M	5	643,3	0,047461432	18,985
104	004X-M	5	1138,5	0,084688803	33,876
105	003X-M	10	2460	0,184034462	73,614
106	003X-M	10	2508,1	0,187650448	75,060
107	004X-M	10	2312,2	0,172923385	69,169
108	004X-M	10	1666,3	0,124366925	49,747
109	004X-M	10	2583,4	0,193311234	77,324
110	004X-M	10	2173,1	0,162466342	64,987
111	004X-M	10	2087,2	0,156008687	62,403
112	004X-M	10	2226,7	0,166495799	66,598
113	003X-M	15	3102,3	0,232320286	92,928
114	003X-M	15	3037,6	0,227456371	90,983
115	004X-M	15	2754,5	0,206173922	82,470
116	004X-M	15	3233,2	0,242160881	96,864
117	004X-M	15	3134,5	0,234740967	93,896
118	004X-M	15	2868	0,214706447	85,883
119	004X-M	15	2733,1	0,204565146	81,826
120	004X-M	15	2838	0,212451154	84,980
121	003X-M	20	3362,6	0,251888712	100,755
122	003X-M	20	3341,2	0,250279936	100,112
123	004X-M	20	3107,1	0,232681133	93,072
124	004X-M	20	3402,9	0,254918322	101,967

125	004X-M	20	3402,8	0,254910805	101,964
126	004X-M	20	3224,4	0,241499329	96,600
127	004X-M	20	3168,9	0,237327037	94,931
128	004X-M	20	3187,6	0,238732836	95,493
129	003X-M	30	3521,4	0,26382673	105,531
130	003X-M	30	3552,4	0,266157199	106,463
131	004X-M	30	3440,2	0,257722403	103,089
132	004X-M	30	3528,9	0,264390553	105,756
133	004X-M	30	3574	0,26778101	107,112
134	004X-M	30	3485,7	0,261142931	104,457
135	004X-M	30	3502,8	0,262428448	104,971
136	004X-M	30	3426,7	0,256707522	102,683
137	003X-M	45	3593,9	0,269277022	107,711
138	003X-M	45	3568,5	0,26736754	106,947
139	004X-M	45	3560,3	0,266751093	106,700
140	004X-M	45	3485,6	0,261135414	104,454
141	004X-M	45	3584,9	0,268600434	107,440
142	004X-M	45	3457,5	0,259022956	103,609
143	004X-M	45	3492,9	0,261684202	104,674
144	004X-M	45	3495,3	0,261864625	104,746

7.2.11. Testi sproščanja modelne učinkovine iz pripravljenih zmesi

Preglednica XXXV: Rezultati testov sproščanja za vzorec 001X-M

001X-M						
	5min	10min	15min	20min	30min	45min
1	1516,8	2884,4	3372,2	3457	3486,5	3555,2
2	2057,7	2958,9	3346,1	3433,1	3524,5	3529,8
3	2102,5	3336,4	3434,3	3446,5	3484,1	3467,5
4	2048,9	2855	3208,2	3411	3358	3448,4
5	2361,7	3324,8	3468,3	3467,6	3484,6	3491,9
6	2019,3	3149	3506,2	3531,4	3552,8	3546,5
AVG	2017,82	3084,75	3389,22	3457,77	3481,75	3506,55
c [mg/mL]	0,151	0,231	0,254	0,259	0,261	0,263
c [%]***	59,59	91,29	100,34	102,37	103,09	103,82
SD	275,32	216,26	106,67	41,09	66,67	43,87
RSD	13,64	7,01	3,15	1,19	1,91	1,25

Preglednica XXXVI: Rezultati testov sproščanja za vzorec 002X-M

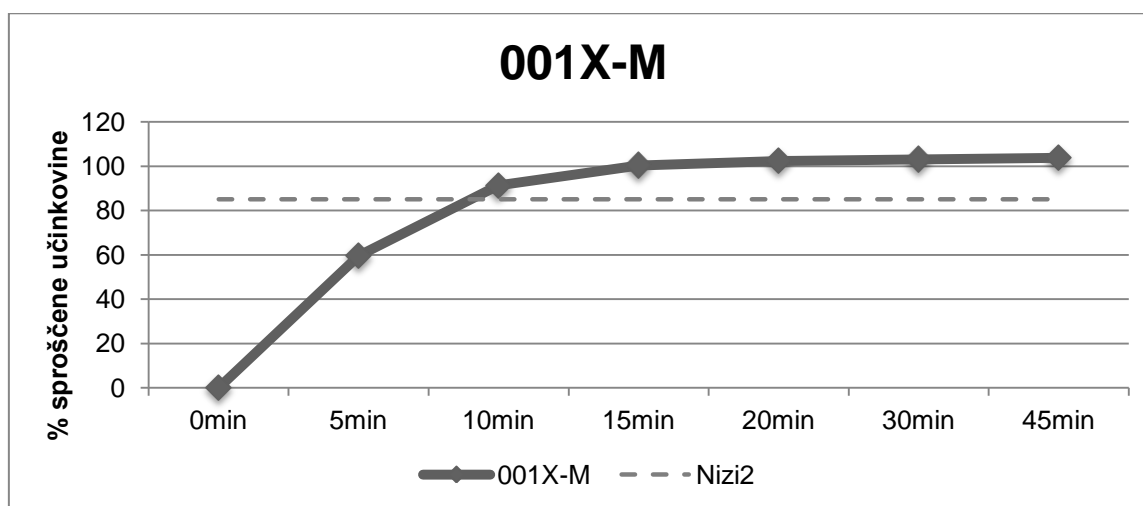
002X-M						
	5min	10min	15min	20min	30min	45min
1	1607,1	2721,3	3204	3379,5	3480,9	3439,5
2	1734,9	2702,2	3031,5	3230	3441,9	3433,3
3	1861,8	3288,4	3476,4	3519,7	3582,3	3596,3
4	1798,5	2733,9	3119,9	3307,4	3444,5	3438,5
5	2571,3	3420,5	3556,9	3565,6	3586,4	3677,9
6	1746,1	2881,4	3274,5	3440,5	3483,6	3522
AVG	1886,62	2957,95	3277,20	3407,12	3503,27	3517,92
c [mg/mL]	0,141	0,221	0,245	0,255	0,262	0,264
c [%]***	55,75	87,61	97,11	100,97	103,83	104,27
SD	345,85	316,42	204,15	127,27	65,21	101,36
RSD	18,33	10,70	6,23	3,74	1,86	2,88

Preglednica XXXVII: Rezultati testov sproščanja za vzorec 003X-M

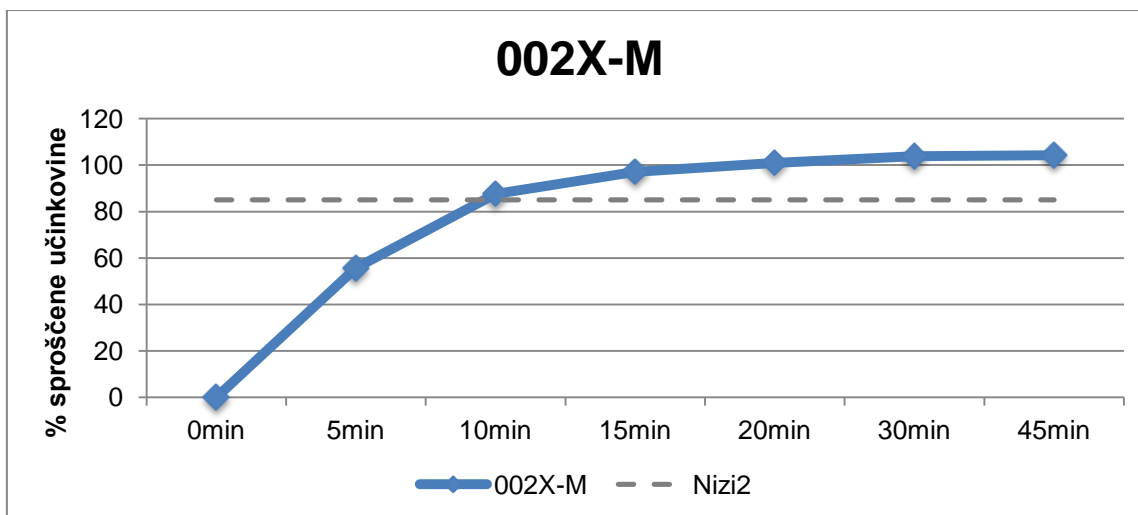
003X-M						
	5min	10min	15min	20min	30min	45min
1	841,2	2078,9	2586,6	2960,1	3268,9	3398,6
2	536,7	2343,5	2899,3	3125,2	3372,2	3473,3
3	730,1	2060,1	2615,3	2908,1	3292,9	3485,4
4	792,9	2410,1	2909,3	3181,3	3492,7	3500
5	979,7	3102,3	3102,3	3362,6	3521,4	3593,9
6	1362,9	3037,6	3037,6	3341,2	3552,4	3568,5
AVG	873,92	2505,42	2858,40	3146,42	3416,75	3503,28
c [mg/mL]	0,065	0,187	0,214	0,236	0,256	0,262
c [%]***	25,61	74,08	84,57	93,12	101,16	103,73
SD	280,12	459,35	213,93	188,60	121,90	70,22
RSD	32,05	18,33	7,48	5,99	3,57	2,00

Preglednica XXXVIII: Rezultati testov sproščanja za vzorec 004X-M

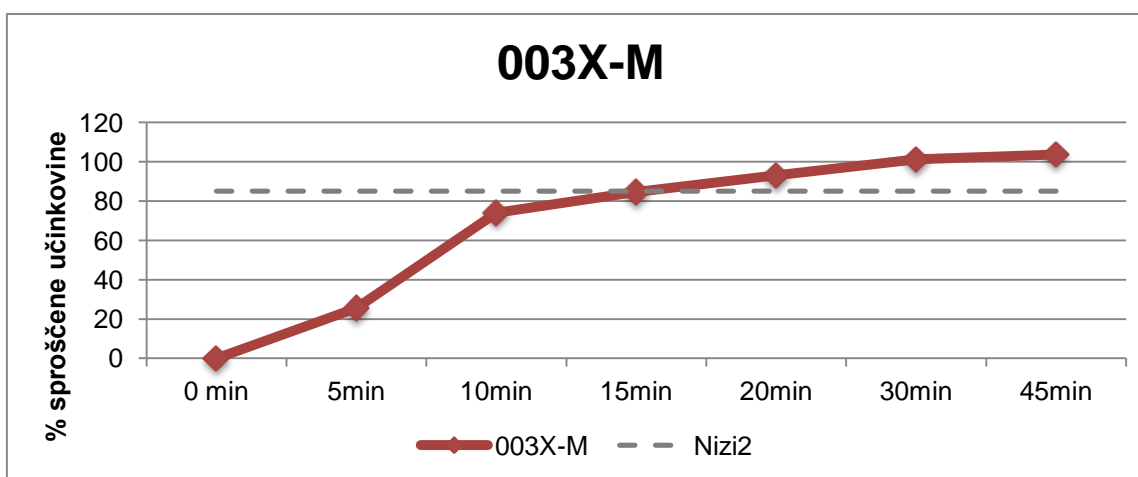
004X-M						
	5min	10min	15min	20min	30min	45min
1	1061,1	2312,2	2754,5	3107,1	3440,2	3560,3
2	985,6	1666,3	3233,2	3402,9	3528,9	3485,6
3	1010,4	2583,4	3134,5	3402,8	3574	3584,9
4	678,3	2173,1	2868	3224,4	3485,7	3457,5
5	643,3	2087,2	2733,1	3168,9	3502,8	3492,9
6	1138,5	2226,7	2838	3187,6	3426,7	3495,3
AVG	919,53	2174,82	2926,88	3248,95	3493,05	3512,75
c [mg/mL]	0,068	0,163	0,219	0,243	0,262	0,263
c [%]***	26,96	64,26	86,60	96,17	103,42	104,01
SD	207,42	301,59	207,64	125,11	55,10	48,90
RSD	22,56	13,87	7,09	3,85	1,58	1,39



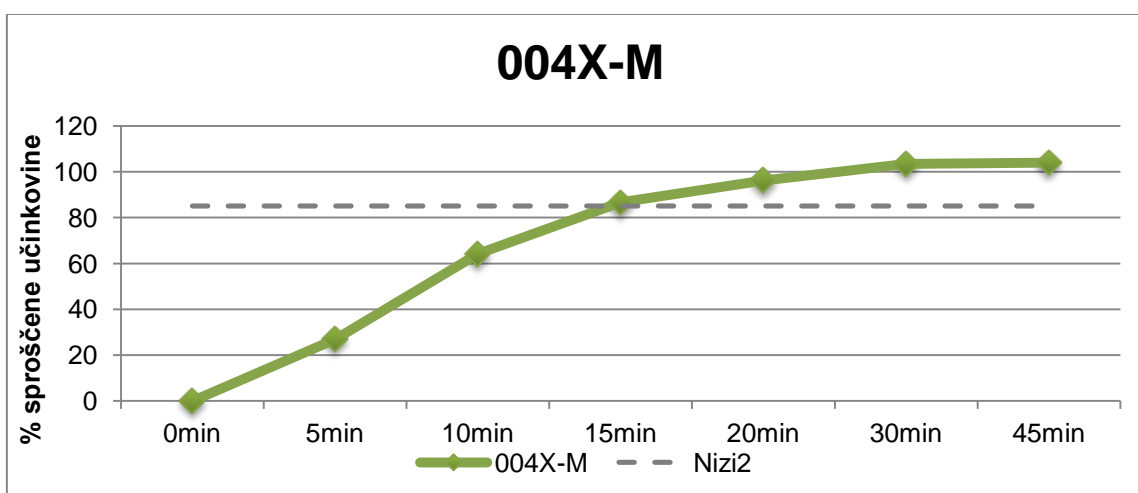
Slika 85: Profil sproščanja za zmes 001X-M (0,05M K-fosfatni pufer, pH = 6,8)



Slika 86: Profil sproščanja za zmes 002X-M (0,05M K-fosfatni pufer, pH = 6,8)



Slika 87: Profil sproščanja za zmes 003X-M (0,05M K-fosfatni pufer, pH = 6,8)



Slika 88: Profil sproščanja za zmes 004X-M (0,05M K-fosfatni pufer, pH = 6,8)