

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JASMINA JEZNIK

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM
FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JASMINA JEZNIK

**VALIDACIJA METOD ZA DOLOČANJE VODE IN
VODNE AKTIVNOSTI V VITAMINSKIH TABLETAH**

**VALIDATION OF METHODS FOR DETERMINATION
OF WATER AND WATER ACTIVITY IN VITAMIN
TABLETS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM
FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala v farmacevtski družbi Lek d.d., Ljubljana, v RCS na Oddelku za Analitsko podporo v Ljubljani pod mentorstvom izr. prof. dr. Janeza Ilaša in somentorstvom dr. Emily Anne Hutton.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem svojemu mentorju izr. prof. dr. Janezu Ilašu za strokovno pomoč, nasvete in sodelovanje pri nastajanju magistrskega dela. Za vso podporo, strokovnost in dostopnost pri izvajanju eksperimentalnega dela se zahvaljujem dr. Emily Anne Hutton. Zahvaljujem se tudi Leku d.d., Ljubljana, ki mi je omogočil opravljanje praktičnega dela magistrske naloge v RCS na Oddelku za Analitsko podporo v Ljubljani. Zahvalila bi se tudi mojemu fantu Klemenu za vso spodbudo in motivacijo. Zahvala gre tudi mojim najbližjim, ki so mi tekom študija pomagali in me podpirali.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Janeza Ilaša in somentorstvom dr. Emily Anne Hutton.

Jasmina Jeznik

Predsednik komisije: prof. dr. Stanko Srčič

Član komisije: asist. dr. Matjaž Ravnikar

VSEBINA

VSEBINA.....	I
POVZETEK	III
ABSTRACT	III
SEZNAM OKRAJŠAV.....	IV
1. UVOD	1
1.1. VALIDACIJE.....	1
1.2. KARL FISCHER.....	4
1.3. VODNA AKTIVNOST	9
2. NAMEN DELA.....	16
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1. MATERIALI IN OPREMA	17
3.1.1. Materiali	17
3.1.2. Oprema.....	17
3.2. PREVERJANE KARAKTERISTIKE.....	18
3.3. METODE.....	21
3.3.1. Analiza vzorcev pri določanju vode s KF titratorjem	21
3.3.1.1. Standardizacija na vodo.....	21
3.3.1.2. Določanje vode v vzorcu	22
3.3.1.3. Priprava vzorcev	22
3.3.2. Razvoj metode	24
3.3.2.1. Ključne odločitve pri razvoju metode	24
3.3.2.2. Izvedba razvoja metode.....	25
3.3.2.3. Test ustreznosti po Ph. Eur. 8.0.....	26
3.3.2.4. Izvedba testa ustreznosti.....	26
3.3.3. Validacija metode za določanje vode s KF titratorjem	27
3.3.3.1. Osnove izvedbe validacije.....	27

3.3.3.2. Izvedba validacije.....	29
3.3.4. Analiza vzorcev pri določanju a_w	31
3.3.4.1. Priprava vzorcev.....	31
3.3.4.2. Določanje a_w v vzorcu.....	32
3.3.4.3. Določanje vode z analizo IPS v vzorcih.....	32
3.3.5. Validacija metode za določanje a_w	32
3.3.5.1. Osnove izvedbe validacije.....	32
3.3.5.2. Izvedba validacije.....	33
4. REZULTATI.....	36
4.1. DOLOČANJE VODE S KF TITRATORJEM.....	36
4.1.1. Razvoj metode	36
4.1.2. Test ustreznosti	37
4.1.3. Validacija	39
4.2. DOLOČANJE a_w	42
5. RAZPRAVA	49
5.1. DOLOČANJE VODE S KF TITRATORJEM.....	49
5.1.1. Razvoj metode	49
5.1.2. Test ustreznosti	51
5.1.3. Validacija	51
5.2. DOLOČANJE a_w	54
6. SKLEP.....	59
7. LITERATURA.....	61

POVZETEK

Da zagotovimo ustreznost rezultatov pridobljenih z analizo, je potrebno metodo validirati. Najpomembnejše pri validaciji je, da pridobljeni rezultati ustrezajo postavljenim kriterijem. V primeru, da primerna analizna metoda še ne obstaja, pa jo je potrebno predhodno tudi razviti. Pri validaciji se preverjajo naslednje karakteristike: točnost, natančnost, specifičnost in selektivnost, meja detekcije, meja kvantifikacije, linearnost, območje ter robustnost, za katero se priporoča, da se oceni že tekom razvoja metode. Od namena uporabe in obsega validacije pa je odvisno katere od zgornjih karakteristik je potrebno preveriti.

Validirali smo metodo za določevanje vsebnosti vode v vitaminskih tabletah s Karl Fischer titracijskim sistemom, ki smo jo na novo razvili ter preverili s testom ustreznosti in metodo za določanje vodne aktivnosti v vitaminskih tabletah s pomočjo Aqualab 4TE instrumenta.

Vsi preučevani parametri, tako pri določevanju vsebnosti vode, kot tudi pri vodni aktivnosti so znotraj postavljenih kriterijev, tako da sta preiskovani analizni metodi ustrezni za svoj namen.

Validacija metode, razvoj metode, Karl Fischer, vodna aktivnost.

ABSTRACT

To ensure the adequacy of the results of the analysis, the method has to be validated. It is most important that the obtained results fit the set criteria. If a suitable analytical method doesn't exist, it must first be developed.

During the course of a validation the following characteristics are examined: precision, accuracy, specificity and selectivity, limit of detection, limit of quantification, linearity, range, and ruggedness. The latter is recommended to be evaluated during the course of the method development. Which of the characteristics need to be examined depends on the intended use of the method and the scope of the validation.

In this thesis, a method for determination of water in vitamin tablets using a Karl Fischer titration system was developed, confirmed with a suitability test and validated, and a method for determination of water activity in vitamin tablets using a Aqualab 4TE instrument was validated.

All the investigated parameters, in both water and water activity determination, were within the set criteria, thus both analytical methods are fit for their intended purposes.

Method validation, method development, Karl Fischer, water activity

SEZNAM OKRAJŠAV

AP – analitski postopek

a_w – vodna aktivnost

ERH – uravnotežena relativna vlažnost

FO – farmacevtska oblika

I_{pol} – polarizirajoči/polarizacijski tok

IPS – izguba pri sušenju

ICH – International Conference on Harmonisation

KF – Karl Fischer

Ph. Eur. 8.0 – Evropska farmakopeja 8.0

r - izkoristek

RH – relativna vlažnost

R - Pearsonov koeficient korelacije

T – temperatura

TU – test ustreznosti

ZU – zdravilna učinkovina

1. UVOD

1.1. VALIDACIJE

KAJ JE VALIDACIJA METODE?

Vsak izdelek ima določene specifikacije, ki opisujejo njegove značilnosti. Da zagotovimo kakovost, je potrebno preverjati, da njegove dejanske lastnosti ustrezajo predpisanim specifikacijam. Analizo je potrebno izvesti za vsako specificirano lastnost, razen če iz določenega razloga to ni potrebno. Zato morajo biti metode, ki se uporabljajo za ugotavljanje kakovosti izdelka validirane oz. verificirane. Pri tem se mora striktno upoštevati specifikacijske meje.

Cilj validacije analitskega postopka (AP) je dokaz, da je le ta primeren za predviden namen [1]. ISO/IEC 17025 navaja definicijo validacije kot: »Potrditev s preverjanjem in zagotovitvijo objektivnih dokazov, da so določene zahteve za specifično namensko uporabo izpolnjene« [2]. Validacija metode je proces definiranja analitskih zahtev in potrditve, da ima preiskovana metoda zmožnosti v skladu z zahtevami. Ob tem ocenimo tudi zmogljivost in primernost metode. Validacija metode je zelo tesno povezana z njenim razvojem, saj že tekom razvoja metode dobimo vpogled v njene karakteristike. Poznati pa moramo tudi razliko med validacijo in verifikacijo. Verifikacija je krajši postopek, ki ga izvedemo na že validiranih prevzetih postopkih ali instrumentih, da dokažemo ustreznost le teh pri nas. Tudi v tem primeru je potrebnega nekaj eksperimentalnega dela, vendar v primerjavi z validacijo precej manj [2]. Štirje najpogostejši tipi validiranih analitskih postopkov (AP) po *International Conference on Harmonisation* (ICH) so:

- Identifikacijski testi
- Kvantifikacijski testi za vsebnost nečistot
- Limitni testi za kontrolo nečistot
- **Kvantitativni testi aktivne snovi v vzorcih zdravilnih učinkovin (ZU) ali zdravil ali drugih izbranih komponent zdravila**

V našem primeru smo imeli opravka z zadnjim od naštetih. Njihov namen je določanje vsebnosti analita v vzorcu. Validacijske karakteristike so podobne za analize ZU in končnega zdravila/produkta. Cilj AP mora biti jasno razviden, saj to določa katere validacijske karakteristike moramo preveriti, oceniti (**3.2. Preverjane karakteristike**) [1].

ZAKAJ JE VALIDACIJA METODE POTREBNA?

Pomembno je narediti pravilne meritve in dokazati pravilnost rezultatov [2]. Da je rezultat analize ustrezen svojemu namenu, mora biti dovolj zanesljiv, da odločitve, ki temeljijo na tem rezultatu, lahko z gotovostjo sprejmemo. Izvajanje validacijske študije ima tudi dodatne koristi.

S seboj prinese tudi poglobljeno znanje in izkušnje s podrobnostmi, ki so pomembne pri izvedbi metode, vključno s poznavanjem kritičnih stopenj v procesu analize. Validacija da laboratoriju in zaposlenim večje zaupanje v rezultate [2].

Preden metodo validiramo, je potrebno samo metodo razviti. Metodo lahko razvija tudi drugo osebje, kot jo potem validira. To je precej zaželeno, saj je s tem takoj razvidno, če je metoda razumljiva. Razvoj lahko poteka na dva načina. Eden od ekstremov je, da minimalno prilagodimo že obstoječo metodo, tako da je primerna za novo uporabo. Drugi ekstrem pa je, da se metodo razvije povsem od začetka, kar vključuje precej več dela in negotovosti o uspešnosti končne metode. Hkrati lahko testiramo/razvijamo več različnih idej, preden na koncu izberemo najboljšo. Ne glede na vloženo količino truda tekom razvoja, ni nobenega zagotovila, da bo tudi validacija uspešna [2].

KDAJ IZVAJAMO VALIDACIJO METODE?

Validacijo metode izvajamo, kadar je potrebno pokazati, da njene karakteristike zmogljivosti ustrezajo uporabi za predviden namen. To izvajamo med razvojem metode, pred uporabo metode na vzorcih (preverjanje sposobnosti, da ponovimo objavljene podatke, preverjanje ustreznosti analitskih zahtev), ob spremembi uporabe/delovnega okolja/analitikov, po obdobju neuporabe. Laboratorij mora validirati:

- Nestandardne metode;
- Metode razvite znotraj laboratorija;
- Standardne metode, ki jih uporabljamo izven njihovega prvotnega namena;
- Nadgradnje ali modifikacije standardnih metod.

Validacija je potrebna tudi, kadar želimo demonstrirati enakovrednost rezultatov, pridobljenih z dvema različnima metodama, npr. nova metoda in obstoječa standardna metoda [2].

KAKO IZVESTI VALIDACIJO METODE?

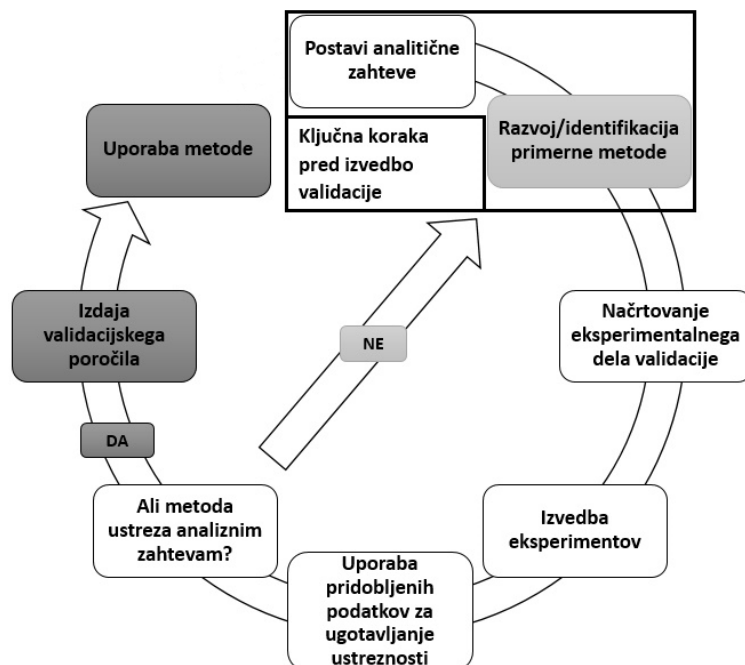
Ko je razvoj metode končan, je potrebno podrobno dokumentirati postopek analize. Ta dokumentiran postopek se nato uporabi za validacijo. Obstajata dva glavna pristopa: medlaboratorijski in znotrajlaboratorijski pristop validacije metode. Pri medlaboratorijskem pristopu gre predvsem za kolaboracijske oz. kooperativne študije, kjer se pričakuje široko uporabo te metode in so namenjene standardizaciji npr. s strani *International Organization for Standardization* (ISO), *European Committee for Standardization* (CEN) ali *Association of Official Agricultural Chemists* (AOAC). Znotrajlaboratorijski pristop je primernejši, kadar ni splošnega interesa za metodo oz. so laboratoriji konkurenčni. Pri znotrajlaboratorijskem pristopu je potrebno upoštevati obstoječe smernice, v nasprotnem primeru ni nujno, da bodo regulatorni organi validacijo priznali.

Laboratorij se mora odločiti, katere karakteristike je potrebno preučiti za validacijo metode in v nekaterih primerih, kako podrobna mora biti analiza posamezne karakteristike. Pomembno je, da se laboratorij zaveda obsega dela. V primeru, da je obseg dela dobro definiran in se uporaba s časom ne spreminja veliko, obstaja možnost, da organizacija izda splošne smernice za obseg validacijskih študij. Zavedati se moramo, da je validacija vedno iskanje ravnovesja med ceno, tveganjem in tehničnimi zmožnostmi. Laboratorij bi se moral truditi po najboljših močeh znotraj svojih omejitev, da upošteva strankine in regulatorne zahteve, obstoječe izkušnje z metodo in dostopno opremo ter potrebo po kompatibilnosti s podobnimi metodami, ki so v uporabi v tem ali drugih laboratorijih. Če bi izvajali analizo, ki je nimamo validirane in je ne nameravamo uporabljati rutinsko, je z vidika časa, denarja in težavnosti bolje, da jo za nas opravi drug laboratorij, ki to analizo izvaja rutinsko [2].

Validacijsko delo mora biti izvedeno in rezultati poročani po dokumentiranem postopku. Načrt validacijskega plana t.j. validacijski protokol in validacijsko poročilo sta lahko navedena v smernicah za določen sektor (ICH). Če takšne smernice obstajajo, je priporočljivo, da se jim sledi in se jih upošteva. S tem zagotovimo uporabo pravilne terminologije in statističnih metod, ter način interpretacije, ki je ustrezen za določen sektor. Protokol validacije naj bo obravnavan le kot osnutek, dokler poročilo ni odobreno, saj se tekom validacije lahko prilagodi izvedbo določenega dela dokumenta. Z doslednim pregledovanjem ter odobravanjem protokolov in poročil zagotavljamo dobro proizvodnjo in dokumentacijsko prakso. V osnovi naj bi protokol in poročilo vsebovala naslednje:

Naslov, kjer naj bo navedeno za katero metodo gre, kdaj in kdo izvaja validacijo, kratek opis metode, analita, vzorcev in namen uporabe. Plan, v katerem naj bo naveden namen in obseg dela validacije. Preučevane karakteristike, kjer naj bo naveden kratek opis preučevanih karakteristik, specifične zahteve, predstavitev eksperimentov, ki bodo izvedeni in kako se bo ovrednotilo rezultate. Navedeni naj bodo tudi rezultati in zaključki eksperimentov. Karakteristike naj bodo predstavljene ločeno. Povzetek, kjer naj bo povzetek dela validacijske študije in rezultati. Lahko se vključi tudi pomen, ki ga to predstavlja za rutinsko uporabo in kontrolo kakovosti. Najpomembnejša je navedba, ki nam pove ali metoda ustreza namenu [2]. Izbira ustreznega validacijskega postopka in protokola je odgovornost izvajalca validacije [1]. Pogosta napaka je, da avtor postopka izvedbe validacije predpostavi, da vsi postopek razumejo tako kot on. Da preverimo jasnost te dokumentacije in preprečimo napako, se predlaga, da postopek preizkusi več analitikov. V primeru, da rezultati niso konsistentni, je potrebno opisati postopek bolj podrobno in zmanjšati dvoumnosti [2]. Pri validaciji metode, ki se bo rutinsko uporabljala moramo biti pozorni, da validacija odraža pogoje, na katere bi lahko naleteli tekom

izvajanja analize. Zato je pomembno, da med validacijo testiramo različne možne variacije: drug analitik, drugačna T laboratorija, itd. [2]. Na sliki 1 je prikazan proces validacije metode od začetka validacije do končne odločitve, če se to dotično zahtevo da izvesti z izbrano metodo [2].

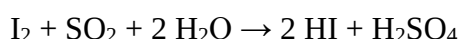


Slika 1: Proces validacije metode: validacija metode vsebuje stopnjo, kjer preverjene karakteristike ovrednotimo in potem primerjamo z analitičnimi zahtevami. Ne glede na to, kakšni podatki že obstajajo glede te metode, se ustreznost namena določi glede na to, kako se metoda obnese, ko jo analizira izbrani analitik z dostopno opremo. Povzeto po [2, 3]

1.2. KARL FISCHER

KEMIČNA REAKCIJA, KI POTEKA PRI KF TITRACIJI

Določevanje vsebnosti vode je osnovano na reakciji, ki jo je opisal R. W. Bunsen:



Karl Fischer je ugotovil, da lahko to reakcijo uporabimo za določevanje vode v brezvodnih sistemih, ki vsebujejo presežek žveplovega dioksida. Eden prvih uporabljenih primernih topil je bil metanol. Da dosežemo premik ravnotežja v desno stran reakcije, je potrebno nevtralizirati kisline, ki nastajajo med procesom t.j. HI in H_2SO_4 . Karl Fischer je za ta namen uporabil piridin [5].

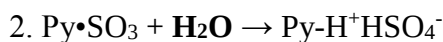
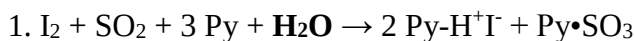
VPLIV TOPILA

Za KF titracijo je bila osnovana dvostopenjska reakcija:



Glede na te enačbe, metanol ni le topilo, ampak je tudi sam udeležen v reakciji. Stehiometrijsko razmerje med I_2 in H_2O je odvisno od izbire topila. V alkoholni raztopini reakcija med jodom

in vodo poteče v stehiometričnem razmerju 1:1, medtem ko je v brez-alkoholni raztopini to razmerje 1:2:



Študije so pokazale, da I_2 in H_2O reagirata v razmerju 1:1, če je odstotek metanola v topilu vsaj 20 %. Zato naj bi bil metanol vedno prisoten, vsaj v minimalnih zahtevanih količinah [5]. Če bi morali zaradi stranskih reakcij uporabiti titrant brez metanola, kot npr. za določanje vode v aldehydih ali ketonih, se lahko uporabi druge alkohole kot je npr. 2-metoksietanol, saj je večina drugih topil, predvsem zaradi neustreznih stehiometrijskih razmerij, neprimernih [5, 7]. Za 2-metoksietanol je značilno enako stehiometrijsko razmerje kot metanol, poleg tega pa zagotavlja veliko daljši rok uporabe KF reagenta. Stabilizirajoči vpliv na KF sistem izhaja iz njegove inertnosti na določene stranske reakcije, ki potekajo pri metanolu [7]. Metanol ima pomembno vlogo tudi pri tvorbi metilsulfita in v primeru, da metanola ni v KF sistemu, bo tvorba metilsulfita onemogočena (glej kinetiko KF reakcije), zato bo potekala predvsem tako imenovana Bunsen-ova reakcija [7].

Topilu lahko dodamo pomožne reagentne npr. formamid, ki na splošno poveča ionsko prevodnost. Posledica tega je, da je potrebna manjša napetost, da vzdržujemo polarizacijski tok (I_{pol}) [5]. Prav tako poveča topnost polarnim substancam. Volumen dodanega formamida naj ne preseže 50 %, ponavadi pa zadošča že 30 % delež [10].

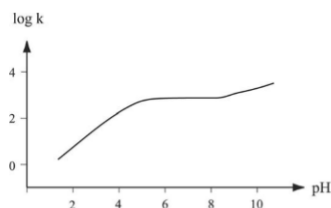
VLOGA PIRIDINA IN DRUGIH BAZ

Študije so pokazale, da piridin ni direktno vključen v reakcijo, saj deluje le kot baza in ga lahko zamenjamo z drugimi bazami, npr. z imidazolom. Ta ni samo zamenjal toksičnega in neprijetno dišečega piridina, ampak je tudi omogočal hitrejše in natančnejše titracije. Imidazol ima namreč pufrsko območje v bolj primernem pH obsegu t.j. med pH 5,5 in 8 – v tem območju je logaritem konstante hitrosti k konstanten [5, 7]. Če uporabimo drugo bazo/pufer pri enakih vrednostih pH, se $\log k$ ne spremeni [7]. Idealno pH območje medija za KF reakcijo leži med 5,5 in 7. V primeru, da imamo kisle vzorce ($\text{pH} < 5$), dodamo imidazol, ter v primeru, da imamo bazične vzorce ($\text{pH} > 7$), dodamo salicilno ali benzojsko kislino [5, 9].

VPLIV VSEBNOSTI VODE

Vsebnost vode v topilu, ki jo lahko vnesemo tudi z vzorcem, prav tako vpliva na molarno razmerje $\text{H}_2\text{O}:\text{I}_2$ [5]. Če preseže 1 mol/L (18 g/L) se obnašanje reakcije spremeni in poteka predvsem Bunsen-ova reakcija za vodne raztopine. To pomeni, da sta porabljeni 2 H_2O za 1 I_2 ali 1 SO_2 . Neekonomično je titrirati velike količine vzorca z visoko vsebnostjo vode. V takšnih primerih je potrebno vzorce razredčiti oz. uporabiti manjše količine vzorca [8].

KINETIKA KF REAKCIJE IN VPLIV pH



Slika 2: Vpliv pH medija na log k; povzeto po [5]

Hitrost KF reakcije je opisana s konstanto hitrosti k in je odvisna od pH vrednosti medija, kar prikazuje slika 2 [5]. Ena od možnih razlag za vpliv pH na hitrost reakcije je, da se z jodom ne oksidira SO_2 , ampak metilsulfitni ion. Ta nastane iz SO_2 in metanola s solvolizo (glej spodaj), in sicer [5]:

- do pH 5 log k narašča linearno s pH; več metilsulfita nastane z lovljenjem protonov in večja je hitrost reakcije.

- med pH 5,5 in 8 je hitrost reakcije konstantna (tu je plato); tu je ves SO_2 prisoten v obliki metilsulfita, zato se hitrost reakcije ne more še povečati.

- nad pH 8 hitrost reakcije ponovno počasi narašča; hitrost reakcije se poveča zaradi pojava stranskih reakcij med jodom in hidroksidnimi oz. metiliranimi ioni. Pri titraciji to povzroči višjo porabo joda in počasno določitev končne točke [5, 8].

Trenutno je sprejeta naslednja reakcijska shema za KF reakcijo:



B je izbrana aminska baza [7]. Kot sekundarni produkt KF reakcije nastopa med titracijo v $\text{CH}_3\text{OH}/\text{SO}_2/\text{I}_2$ raztopini bazični metilsulfit [5].

STRANSKE REAKCIJE

Določitev vode s KF je specifična le, če ni stranskih reakcij s KF reagenti. To pomeni, da se nič vode ne sme sprostiti v stranskih reakcijah, niti vzorec ne sme porabljeni vode ali sproščati joda. Večina neželenih in motečih stranskih reakcij je lahko zavrtih s primernimi ukrepi [8]. Na rezultat vplivajo predvsem tri skupine stranskih reakcij [5]:

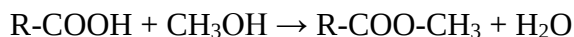
1. Reakcija z metanolom, CH_3OH

- Aldehidi in ketoni reagirajo z metanolom, pri čemer nastane dodatna voda



Rešitev: Uporabimo posebne reagente za aldehide in ketone (tako imenovane K-reagente). Kljub uporabi teh reagentov ta stranska reakcija še vedno poteče, npr. pri določitvi acetona je premik (*drift*) po reakciji višji kot pred njo. Povečanje premika (*drifta*) je odvisno od velikosti vzorca, zato se priporoča uporabo majhnega vzorca in zamenjavo topila po dveh do treh vzorcih.

- Esterifikacija s karboksilnimi kislinami, pri čemer nastane dodatna voda

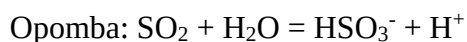
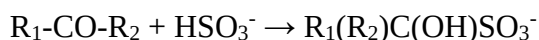


Rešitev: Pred KF titracijo najprej nevtraliziramo vzorec z uporabo ustrezne baze (imidazol).

2. Reakcija z vodo, H₂O

- Ketoni in aldehidi reagirajo z SO₂, bazo in vodo (voda je porabljena)

Adicija bisulfita:



Rešitev: Titracijo začnemo takoj, ko dodamo vzorec. Izvedemo hitro titracijo vode, tako da že na začetku dodamo 90 % pričakovane porabe titranta in s tem dosežemo, da adicija bisulfita ne poteče.

3. Reakcija z jodom, I₂

- Reakcija joda z npr. oksidi, hidroksidi, karbonati, amini, askorbinsko kislino in merkaptani, vodi v višjo porabo joda in lažno kaže na večjo vsebnost vode.

Rešitev: KF reakcija večine teh substanc se lahko izvede z uporabo sušilne pečice ali z izvedbo zunanje ekstrakcije [5].

VARIACIJA V KF TEHNIKI IN REAGENTIH

Za določitev vsebnosti vode poznamo dve različni KF tehniki, ki sta prikazani v preglednici I [5]. Zanima nas predvsem volumetrična titracija. Prav tako obstajajo različni KF reagenti. Najpomembnejša sta eno- in dvokomponentni KF reagent, ki sta prikazana v preglednici II, poznamo pa tudi reagente, ki vsebujejo piridin, posebne reagente za aldehide in ketone ter reagente z etanolom [5, 9].

Preglednica I: Razlika med volumetrično in kolumetrično KF titracijo; povzeto po [5]

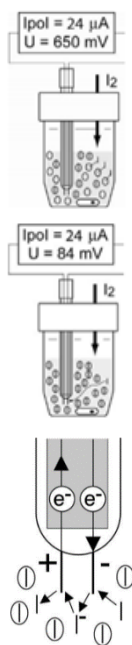
KF TITRACIJA	
Volumetrična	Kolumetrična
Jod dodajamo z bireto med titracijo.	Jod se tvori elektrokemično med titracijo.
Primerna za vzorce, kjer je voda prisotna kot glavna komponenta: 100 ppm – 100 %	Primerna za vzorce, kjer je voda prisotna v sledovih: 1 ppm – 5 %

Preglednica II: Primerjava eno- in dvokomponentnega reagenta; povzeto po [5, 9]

REAGENT	Enokomponentni	Dvokomponentni
TITRANTI	Jod, SO ₂ , imidazol, metanol	Jod, metanol
TOPILO	Metanol	SO ₂ , imidazol, metanol
PREDNOSTI	Enostavno rokovanje, primerna cena	Visoka hitrost titracije, stabilen titer
SLABOSTI	Titer manj stabilen, hitrost titracije počasnejša	Omejena kapaciteta topila
Koncentracije dostopnih reagentov in vsebnosti vode v vzorcu, za katere so primerni	5 mg/mL za 1000 ppm – 100 % 2 mg/mL za < kot 1000 ppm 1 mg/mL za < kot 200 ppm	5 mg/mL za 1000 ppm – 100 % 2 mg/mL za < kot 1000 ppm

PRINCIP BIPOTENCIOMETRIČNE DOLOČITVE

KF titracija temelji na bipotenciometrični določitvi. Na par Pt elektrod je apliciran majhen, konstanten izmenjujoč tok t.j. polarizirajoči tok (I_{pol}).



Slika 3: Stanje I_{pol} in napetosti na začetku in med titracijo (zgoraj), na koncu titracije (v sredini) in prikaz ionske kondukcije (spodaj); povzeto po [5]

Na začetku in med titracijo:

- dokler dodan jod reagira z vodo, ni prostega joda v titracijski raztopini
- za vzdrževanje izbranega I_{pol} na elektrodi je potrebna visoka napetost (približno 400 do 650 mV)

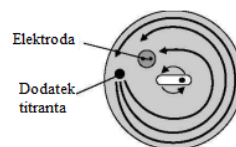
Ob koncu titracije:

- Takoj, ko vsa voda zreagira z jodom (I_2), je v titracijski raztopini prisoten prosti jod
- Prosti jod omogoči ionsko prevodnost in napetost se mora zmanjšati (približno na 50 – 100 mV), da ohranja I_{pol} konstanten
- Ko napetost pade pod definirano vrednostjo je titracija končana

Potek ionske prevodnosti:

- Molekulo joda (I_2) privlači negativno nabita žička Pt elektrode
- Nato prejme dva elektrona in se reducira v jodidne ione ($2 I^-$)
- Dva negativno nabita jodidna iona privlači pozitivno nabita žička Pt elektrode, kjer oddata elektrone in se ponovno oksidirata v jodidno molekulo (I_2). Ta stanja so prikazana na sliki 3.

Da dosežemo konstantno ionsko prevodnost, moramo biti pozorni na mešanje titracijske raztopine. Zato potrebujemo titracijsko celico primerne oblike, kratek magnet ter ustrezno postavitve elektrode in mesta dodajanja titranta kot prikazuje slika 4. Jod je prisoten le v nizkih koncentracijah in če je mešanje slabo, jod ne more doseči negativno nabite Pt žičke. To vodi v prekinitev ionske prevodnosti in meritveni signal postane nestabilen [5].



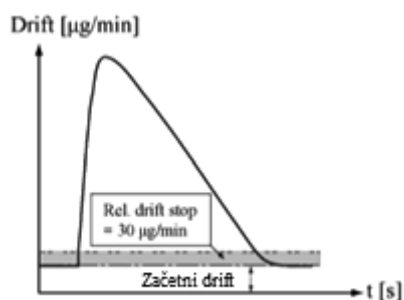
Slika 4: Prikaz ustrezne postavitve elektrode in mesta dodajanja titranta; povzeto po [5]

KONČNA TOČKA IN POLARIZACIJSKI TOK

KF titracija je končana, ko je detektiran presežek joda (I_2) v titracijski celici. Takrat pride do ionske prevodnosti, ki jo omogoča prosti jod in napetost polarizirane dvojne elektrode pade pod specifično, vnaprej izbrano vrednost. Vrednost končne točke je odvisna predvsem od:

- I_{pol} (najpomembnejši) – končna točka: 100 mV pri $I_{pol} 24 \mu A$,
- Tipa elektrode t.j. geometrije, dimenzije kovinskih delov (v manjši meri) – dvojna Pt elektroda (dolžina: 3 – 4 mm, premer: 1 mm),
- Uporabljenega topila in analita, ki je v neposredni bližini anode [5].

PARAMETRI PREKINITVE TITRACIJE



Slika 5: Prikaz prekinitve titracije z ustavitvijo glede na relativni premik ("relative drift stop"); povzeto po [5]

Pri neproblematičnih in topnih vzorcih izberemo ustavitve glede na relativni premik (*»relative drift stop«*) za prekinitve titracije, ki je razložen na sliki 5. Premik (*drift*) opisuje količino vode, ki vstopi v titracijsko celico v definiranem časovnem obdobju in je podan v μg vode/min. Pri ustavitvi glede na relativni premik (*»relative drift stop«*) se titracija prekine takoj, ko dejanski premik (*drift*) pade pod vsoto začetnega premika (*drifta*) in relativnega premika (*drifta*).

Ta parameter je neodvisen od začetnega premika (*drifta*) in koncentracije titranta. Zato je to najenostavnejši in najbolj univerzalni parameter za uporabo. Vrednost ustavitve glede na relativni premik (*»relative drift stop«*) vpliva na ponovljivost in titracijski čas:

- Nizka vrednost »ustavitve glede na premik« (*»drift stop«*):
boljša ponovljivost, dolg titracijski čas
- Visoka vrednost »ustavitve glede na premik« (*»drift stop«*):
slabša ponovljivost, kratek titracijski čas

Priporočene vrednosti ustavitve glede na relativni premik (*»relative drift stop«*) za volumetrično KF titracijo za enokomponentni sistem so:

- 5 do 15 $\mu\text{g/min}$, kot optimalna vrednost za doseg ponovljivih rezultatov;
- 20 do 30 $\mu\text{g/min}$, vrednost, ki skrajša titracijski čas, vendar zveča tveganje, da se bo titracija končala prehitro, kar bo vodilo v slabo ponovljivost in manjšo vsebnost vode.

Nekateri vzorci (t.j. vzorci, ki sprostijo zadnje sledi vode zelo počasi ali pri njih potekajo stranske reakcije), imajo visoko vrednost premika (*drifta*) na koncu titracije. Pri njih je priporočljiva kombinacija ustavitve glede na relativni premik (*»relative drift stop«*) in maksimalnega titracijskega časa. Če vrednost »ustavitve glede na premik« (*»drift stop«*) ni dosežena, je titracija končana najkasneje ob definiranem maksimalnem času [5].

1.3. VODNA AKTIVNOST

Vodna aktivnost (a_w) je razmerje parnega tlaka vode v produktu (P) in nasičenega tlaka vodne pare (P_0) pri isti temperaturi (T). Številčno je enaka $\frac{1}{100}$ relativne vlažnosti (RH), ki jo ustvari produkt v zaprtem sistemu. Razmerje med a_w in uravnoteženo relativno vlažnostjo (ERH) je predstavljeno z enačbo 1 [13].

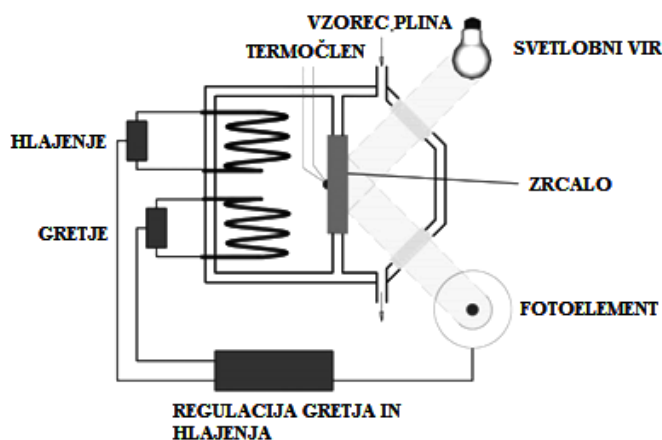
$$a_w = \frac{P}{P_0}$$

$$\text{ERH (\%)} = a_w * 100$$

Enačba 1: Izračun a_w – zgoraj; prikaz ravnotežja med ERH in a_w – spodaj; povzeto po [13]

PRINCIP DOLOČEVANJA TEMPERATURE ROSIŠČA Z METODO HLAJENJA ZRCALA

Merjenje a_w po principu določevanja T rosišča z metodo hlajenja zrcala izvedemo tako, da damo vzorec v majhno neprodušno posodico, znotraj katere se vzpostavi ravnotežje med vodo v trdnem vzorcu in prostorom nad njim [13]. Merimo RH prostora nad vzorcem, in sicer, ko sta a_w vzorca in RH zraka v ravnotežju, meritev vlažnosti zraka nad vzorcem poda a_w vzorca [18]. Polirano, hlajeno zrcalo, katerega T je natančno kontrolirana s termoelektičnim hladilnikom, deluje kot kondenzirajoča površina [13, 18]. Ohlajevalni sistem je elektronsko povezan s fotoelektrično celico, v katero je usmerjena svetloba iz kondenzirajočega zrcala. Tok zraka v ravnotežju s testiranim vzorcem je usmerjen na zrcalo, ki se ohlaja, dokler se na njem ne začne kondenzirati vlaga [13]. Fotoelektrična celica zazna spremembo v reflektanci, ko se kondenzacija pojavi na zrcalu, termočlen, ki je pritrjen na zrcalu pa nato izmeri T pri kateri se le ta pojavi in ta T je rosišče iz katerega je določen ERH [13, 18]. Naprava preko opozorilnih signalov izpiše končno a_w in T [18]. Slika 6 prikazuje zrcalni merilnik vlažnosti.



Slika 6: Zrcalni merilnik vlažnosti

LINEARNA IZRAVNAVA IN KALIBRACIJSKI STANDARDI

Za zagotovitev optimalne izvedbe in točnosti je pomembno redno preverjanje linearne izravnave t.j. merjenje a_w proti znanim standardom. V primeru napačne meritve znanih standardov, je potrebno preveriti, če je prišlo do kontaminacije instrumenta pri meritvi a_w . V primeru, ko smo prepričani, da se nelinearnost pojavi, je potrebno izvesti linearno izravnavo [18]. Kalibracijski standardi, ki jih uporabljamo pri preverjanju linearne izravnave, so posebej pripravljene solne raztopine, ki imajo specifično konstanto molalnosti in a_w , ki so točno

merljive. V preglednici III so podani kalibracijski standardi v petih območjih a_w ter njihovi temperaturni popravki pri T različni od 25°C, saj so le ti nanjo zelo občutljivi [18].

Preglednica III: Kalibracijski standardi v petih območjih a_w in njihovi temperaturni popravki pri T različni od 25 °C; pri meritvi z instrumentom Aqualab lahko dobljeni rezultati odstopajo za 0,003 a_w ; povzeto po [18]

T (°C)	VERIFIKACIJSKI STANDARDI				
	H ₂ O	0,5 M KCl	6,0 M NaCl	8,57 M LiCl	13,4 M LiCl
15,0	1,000	0,984	0,761	0,492	0,238
20,0	1,000	0,984	0,760	0,496	0,245
25,0	1,000	0,984	0,760	0,500	0,250
30,0	1,000	0,984	0,760	0,504	0,255
35,0	1,000	0,984	0,760	0,508	0,261
40,0	1,000	0,984	0,760	0,512	0,266

VLAGA

Izraz »vlažnost« je na splošno izraz, ki kvantificira količino vodne pare v plinu [15]. Zrak ima dano kapaciteto, do katere lahko absorbira vodno paro in če se le to preseže, se vlaga začne kondenzirati na površine v okolici. Na splošno velja, da tem bolj vroč je zrak, več vodne pare lahko sprejme [14]. To lahko vidimo, če pogledamo krivuljo nasičene vlažnosti v odvisnosti od T na psihrometričnem grafu – slika 19.

ABSOLUTNA VLAŽNOST

Absolutna vlažnost je definirana kot masa vodne pare, prisotne v enoti volumna vlažnega zraka, pri dani T in tlaku. Izrazimo jo z g vode/m³ zraka [14]. Torej je predstavljena kot delna gostota vodne pare v vlažnem zraku [16].

RELATIVNA VLAŽNOST



Slika 7: Vizualni prikaz RH; povzeto po [15]

Relativna vlažnost (RH) zraka izraža, kolikšen delež je nasičen z vodno paro [14]. Definirana je kot razmerje med absolutno vlažnostjo in nasičeno absolutno vlažnostjo pri določeni T, kar je prikazano s sliko 7 in enačbo 2. Izražena je v % [16].

$$RH = \frac{P_c}{P_0} \times 100$$

Enačba 2: Izračun RH; P_c = tlak vodne pare v sistemu; P_0 = nasičen tlak vodne pare pod enakimi pogoji; povzeto po [13]

TEMPERATURA ROSIŠČA

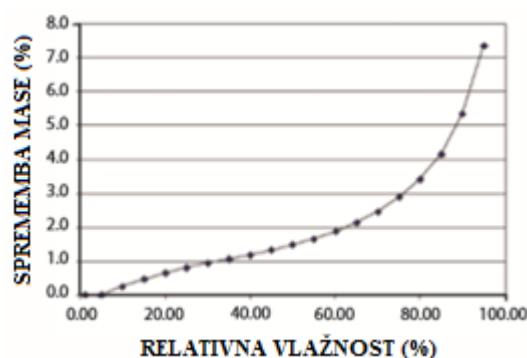
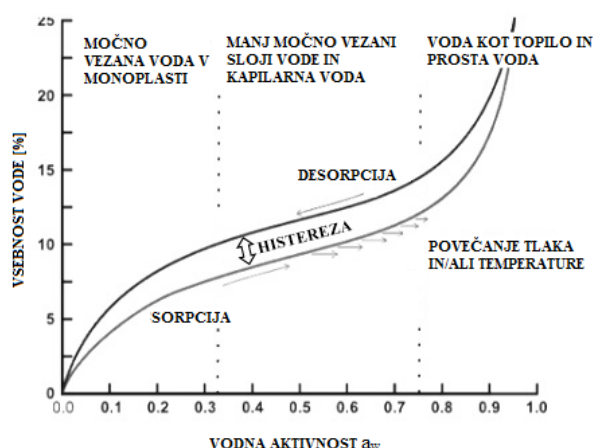
Rosišče je T pri kateri je zrak nasičen z vodno paro. Ko zrak doseže T rosišča pri določenem tlaku, je vodna para v zraku v ravnotežju z vodo v tekočem stanju. To pomeni, da se vodna para kondenzira z isto hitrostjo kot voda v tekočem stanju izhlapeva. Če T zraka pade pod T rosišča,

bo prišlo do kondenzacije vodne pare na površinah v okolici in začele se bodo tvoriti kapljice vode (npr. pojav rose - kapljice na travnatih bilkah) [17]. Npr. če vzorec z določeno vlago pri določeni T ohlajamo, pridemo do nasičene vlažnosti, t.j. T rosišča, kjer je RH 100 % in takrat je T vzorca enaka T rosišča. Če ta vzorec nadalje ohlajamo, bo prišlo do kondenzacije vlage na površini le tega.

Za pomoč pri določevanju T rosišča lahko uporabimo psihrometrični diagram zraka (glej sliko 19) iz katerega lahko odčitamo: T zraka oz. suhega termometra, RH , T nasičenja (T rosišča), absolutno vlažnost, T vlažnega termometra, v nekaterih bolj naprednih diagramih pa tudi entalpijo, parni tlak, specifičen volumen zraka,...

SORBCIJSKA-DESORBCIJSKA IZOTERMA

Razmerje med a_w in vsebnostjo vlage pri določeni T je imenovano sorbcijška izoterma vlage. To razmerje je kompleksno in unikatno za vsak produkt zaradi različnih interakcij med vodo in trdnimi komponentami pri različni vsebnosti vlage. Povečanje a_w skoraj vedno spremlja povečanje vsebnosti vode, vendar v nelinearnem trendu [19]. Sorbcijško izotermo lahko ustvarimo s procesom adsorpcije ali desorpcije. Razlika med tema krivuljama je definirana kot histereza, kar je prikazano na sliki 8 - levo [12, 13]. Če produkt posušimo pod specifikacijsko vsebnostjo vlage in ga želimo ponovno navlažiti, lahko torej dobimo neželene rezultate zaradi nereverzibilnih strukturnih sprememb in/ali kinetičnih efektov [12, 19]. Večina trdnih oralnih FO je izdelanih z a_w 0,3 – 0,5 in zato pridobijo vodo v stabilnostnih študijah, kjer je po ICH znotraj klimatske cone II vlažnost zraka definirana kot 60 % ($a_w = 0,6$), saj imajo materiali z nižjo a_w tendenco, da vodo pridobijo in obratno. Slika 8 – desno prikazuje primer adsorbcijške izoterme za tipično oralno FO [12].



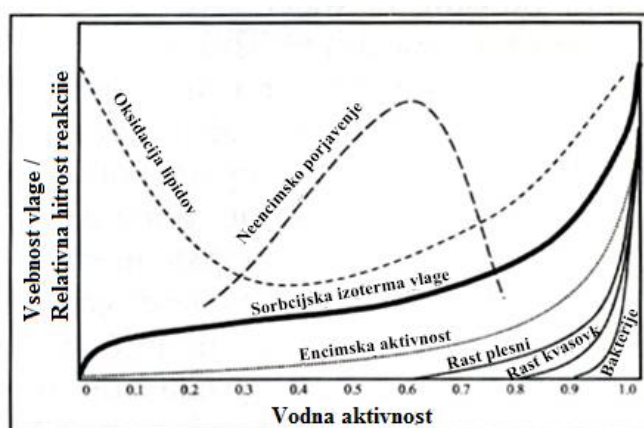
Slika 8: Prikaz histereze ter prevladujoče oblike vode glede na a_w (levo); prikaz adsorbcijške izoterme za tipično oralno FO (desno); povzeto po [12]

Sorbcijška izoterma za vsako vrednost vlage v zraku označuje ustrezno vrednost vsebnosti vode v vzorcu pri določeni konstantni T . Če se sestava ali kvaliteta materiala spremeni, potem se tudi sorbcijško obnašanje spremeni. Izoterma zaradi kompleksnosti sorbcijškega procesa, ne

more biti določena z izračunom, ampak mora biti zabeležena eksperimentalno za vsak produkt [12,18].

UPORABNOST VODNE AKTIVNOSTI

a_w je meritev energijskega statusa vode v sistemu. Njena vrednost opisuje, kako močno je voda strukturno ali kemično vezana znotraj substance. Ker lahko pri procesih kvarjenja reagira le prosta voda, je tudi boljši pokazatelj varnosti in stabilnosti z vidika mikrobiološke rasti, hitrosti kemične in biokemične reakcije ter fizikalnih lastnosti kot vsebnost vode. Slika 9 prikazuje kako a_w vpliva na razne procese kot so relativna dejavnost mikroorganizmov, lipidov in encimov [18].



Slika 9: Prikaz vpliva a_w na različne procese glede na vsebnost vode; povzeto po [18]

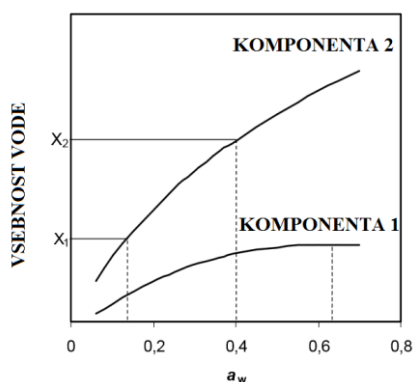
Zavedati se moramo, da meritve celotne vode niso vedno najboljši pristop za razumevanje učinka vode. Voda se lahko v FO nahaja v različnih oblikah, ki imajo različne vplive na varnost, stabilnost oz. razpoložljivost za fizikalne, kemične in mikrobiološke procese [11]. Najpogostejše oblike so prosta, adsorbirana in vezana voda. Prosta voda je prisotna v praznih prostorih ali v porah in ima enake lastnosti in energijo kot čista voda. Lahko služi kot dispergirno sredstvo, kot topilo za kristalinične komponente ali za mikrobiološko rast. Adsorbirana voda se nahaja v več slojih, medtem ko je vezana voda prisotna le v enem sloju [12]. Nižja a_w rezultira v manjši količini razpoložljive vode za vpliv na prej omenjene procese. Analize vsebnosti vlage podajajo celotno količino vode, ne ločijo pa posameznega tipa vode [11].

Torej a_w ni določena s količino vode v produktu, ampak je primerjava koliko vode v produktu je proste [11]. Ko voda reagira s topljenci in površino, ni na voljo za druge vodne interakcije [12]. Vrednosti a_w so v območju od nič (čisto suho) do 1,0 (čista voda). Ko se a_w zniža, se zniža tudi energija vode v produktu in je kot topilo manj »razpoložljiva« za mikrobiološko rast, kemično reaktivnost ali za migracijo vlage [11].

a_w je najboljši indeks za **mikrobiološko rast**. Vsak mikroorganizem ima mejno a_w pod katero ne more rasti [11]. Rast večine bakterij je inhibirana pod približno $a_w = 0,91$, podobno večina kvasovk neha rasti pod $a_w = 0,87$ in večina plesni neha rasti pod $a_w = 0,80$. Absolutna meja za mikrobiološko rast je približno $a_w = 0,60$ [12]. Direktna povezava med vsebnostjo vlage in mikrobiološko rastjo pa ne obstaja. Voda postane bolj mobilna, če a_w naraste, kar vpliva na molekulsko mobilnost, kot tudi na kemično in encimsko hitrost reakcij [11].

United States Pharmacopeia (USP) navaja uporabo a_w tudi za **kontrolno kemičnega razpada**. Pogosta vzporedna praksa v farmacevtskem razvoju je, da uravnotežimo produkte pri različnih vlažnostih (a_w) in preiskujemo njihove razpadne hitrosti. a_w izmerimo precej bolj natančno (skala: 0,01 – 0,02 a_w) od nivoja, kjer pri večini trdnih peroralnih FO potekajo signifikantne spremembe v razpadu (skala: 0,1 – 0,2 a_w). Na vse razpadne procese ima vpliv le aktivna voda, zato dobimo z merjenjem a_w informacije o stabilnosti in varnosti produkta [12].

Prav tako je tesna povezanost med a_w in **fizikalno stabilnostjo produkta**. Razlike v nivoju a_w med komponentami ali med komponento in okoljsko vlažnostjo je gonilna sila za migracijo vode. Razumevanje ali se bo voda absorbirala ali desorbirala iz določene komponente je nujno,



Slika 10: Odvisnost vsebnosti vode od a_w ; X_1 -vsebnost vode v komponenti 2 na začetku; X_2 -vsebnost vode v komponenti 2 po vzpostavitvi ravnotežja

da preprečimo razgradnjo, še posebej, če je katera od komponent občutljiva na vlago. Materiali različnih a_w izražajo časovno in temperaturno odvisno vodno migracijo iz območij z visoko proti nizki a_w . **PRIMER:** Če v zaprtem prostoru zmešamo komponento 1 z 0,65 a_w in bolj higroskopsko komponento 2 z 0,15 a_w v masnem razmerju 1:1, bo prišlo do prehoda vode iz snovi z višjo a_w na snov z nižjo a_w , dokler se ne vzpostavi ravnotežje t.j. ko bosta obe komponenti dosegli skupno vrednost $a_w \approx 0,4$. Med komponentama 1 in 2 ne pride do izenačevanja v vsebnosti vode. Vsaka od obeh komponent adsorbira oz. odpušča

vlago, kot opisuje njena sorpcijska izoterma – slika 10. V primeru, da bi imeli obe komponenti enako a_w se vlaga med komponentama 1 in 2 ne bi izmenjala (v zmesi bi vseeno dobili povprečno vsebnost vlage komponente 1 in 2).

To je pomembno upoštevati, predvsem pri večkomponentnih produktih. Ta migracija lahko namreč vodi v neželene spremembe v kvaliteti obeh komponent. a_w zagotavlja uporabne informacije za oblikovanje formulacije, pogoje proizvodnje in zahteve pakiranja [11].

NADOMEŠČANJE KF Z VODNO AKTIVNOSTJO

Večina farmakopejskih monografij, ki vsebujejo postopke za meritve vode je osnovanih na meritvah celotne vode ali s KF titracijo ali z izgubo pri sušenju (IPS). KF titracija je že veliko let prevladujoča meritev vode v farmacevtskih produktih. Čeprav je tehnika zanesljiva pod previdno nadzorovanimi pogoji, nanjo vplivajo številni faktorji, kot so rokovanje z vzorcem in stranske reakcije, ki povzročajo napačne rezultate. Rezultati pogosto variirajo s spremembo v sobni RH. Prav tako vključuje uporabo nekaterih manj želenih kemikalij in zahteva trening za ustrezno izvedbo, medtem ko je merjenje a_w nedestruktivno, zahteva malo dela, zahtevana oprema pa je na splošno poceni. Potrebni je le nekaj preprostih preverjanj, da zagotovimo ustreznost meritev [12]. a_w lahko nadomesti KF analize, ker zagotavlja bolj uporabne informacije, saj loči tip vode, prav tako zaradi tega zagotavlja boljšo korelacijo z mikrobiološko varnostjo, kemično stabilnostjo in fizikalnimi lastnostmi. To še posebej velja za produkte, ki lahko doživijo spremembe v stabilnosti, kadar se pojavijo majhne spremembe v vsebnosti vlage, ki so težko merljive (sorpcijska izoterma je relativno ravna na področjih, kjer se pojavi zvišana hitrost razpada) [11]. Prednost merjenja a_w pred KF je tudi, ko je vzorec higroskopnen in kadar je vsebnost vode visoka (npr. hidrati) ter variabilnost meritev povzroči, da je razločevanje sprememb v vsebnosti vode težko doseženo [12].

Iz a_w lahko sklepamo na vsebnost vode, če poznamo izotermo za specifičen produkt [18]. Za večino produktov, je izoterma sigmoidne oblike. Za manjša območja a_w , lahko linearna regresija opiše izotermno razmerje, ampak redko velja za celotno območje a_w . Za te namene t.j. za karakterizacijo izoterm za celotno območje a_w , se uporabljajo bolj kompleksne enačbe npr. najpogostejši sta GAB (Guggenheim-Anderson-de Boer) in BET (Brunauer-Emmett-Teller) enačbi. Kot linearna regresija, so te enačbe prilagojene, da najdejo koeficient, ki najbolje razloži izotermno razmerje. V uporabi je programska oprema za analizo podatkov in določitev koeficientov, ki lahko napovejo vsebnost vlage pri katerem koli nivoju vode in obratno [11].

Še vedno pa je potrebno poznati vsebnost vlage za določevanje vode kot nečistote. a_w bo lahko še vedno nadomeščala KF za ta namen, saj je preko razmerja sorpcijske izoterme vlage možno določevati vsebnost vlage osnovani na a_w . Instrument a_w bi tako lahko z zagotavljanjem obojih meritev, vsebnosti vlage in a_w , nadomestil določevanje vode s KF titracijskim sistemom [11].

2. NAMEN DELA

V farmacevtskih procesih so meritve vlage izjemnega pomena, saj prisotnost vode vpliva na fizikalno in kemijsko stabilnost farmacevtskih izdelkov, kar lahko vodi do degradacije, kot tudi do mikrobiološke kontaminacije, ki lahko privede do zmanjšane varnosti zdravila. Če bi bili izmerjeni rezultati napačni, bi povzročili nepotrebne stroške oz. vplivali na kakovost zdravila. Da zagotovimo, da se to ne zgodi, je potrebno dokazati pravilnost meritev in rezultatov, kar dosežemo z validacijo.

Cilj te naloge je razviti in validirati KF metodo za določanje vsebnosti vode v vitaminskih tabletah ter validirati metodo za določevanje a_w v vitaminskih tabletah.

Za določevanje vsebnosti vode v vitaminskih tabletah s pomočjo KF titracijskega sistema bomo poskušali razviti ustrezno metodo, s katero bi nato analizirali vzorce in katero bi lahko kasneje validirali. Določili bomo naslednje parametre: titrant, topilo, ekstrakcijski čas, zatehto vzorca ter preverili pH delovne raztopine, ki je za dano metodo izjemnega pomena. Ustreznost razvite metode bomo preverili s testom ustreznosti (TU) po Ph. Eur. 8.0. Ob ustreznosti le te, jo lahko nato validiramo, da potrdimo: natančnost, rigidnost, točnost, linearnost in robustnost metode. Pred izvedbo validacije KF metode za določevanje vode, kot tudi metode za določevanje a_w v vitaminskih tabletah, bomo najprej pripravili protokol, kjer bomo podrobno opisali celotno izvedbo validacije ter ga dali pregledati in potrditi pred začetkom izvajanja analiz. Pri validaciji metode za določevanje a_w bomo poleg že prej omenjenih parametrov preverjali tudi specifičnost oz. selektivnost. Obe validaciji bomo izvedli ob upoštevanju kriterijev za vodo, saj je bila naša študija vodne aktivnosti pri Leku prva, ter smo zato uporabili kriterije za določevanje vode s KF titracijskim sistemom. Te kriterije smo uporabili tudi, ker pri iskanju po literaturi nismo našli ustrežnejših. Za statistično podporo pri obdelavi podatkov bomo uporabili Microsoft Excel® 2010. Po zaključku obeh validacij bomo pripravili poročilo, kjer bomo predstavili dobljene rezultate ter jih komentirali. Namen razvoja ter validacij omenjenih metod bo zagotoviti ustreznost rezultatov meritev vitaminskih tablet na KF sistemih in Aqualab 4TE instrumentu.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI IN OPREMA

3.1.1. Materiali

KARL FISCHER

- HYDRANAL[®] - Formamide dry, CH₃NO, Fluka[®], M: 45,04 g/mol, Sigma – Aldrich Laborchemikalien GmbH

- Metanol, CH₃OH, J. T. Baker, M: 32,04 g/mol, Netherlands

- HYDRANAL[®] Water standard 10,0, Fluka[®], Sigma – Aldrich Laborchemikalien GmbH

- HYDRANAL[®] Composite 5, Fluka[®], Sigma – Aldrich Laborchemikalien GmbH, d: 1,15 g/mL, Water equivalent (titer) 4,5 – 5,5 mg/mL, Deutscher Akkreditierungs Rat, Reagent for volumetric one – component KF titration (methanol free), Germany

VODNA AKTIVNOST a_w

- litijev klorid, LiCl, 0,250 a_w , 13,41 molal v H₂O, AQUA LAB by DECAGON

- natrijev klorid, NaCl, 0,760 a_w , 6,0 molal v H₂O, AQUA LAB by DECAGON

- Nasičene solne raztopine, ki so v eksikatorjih za doseganje ustreznih RH: LiCl, MgCl₂, NaBr, KI, H₂O

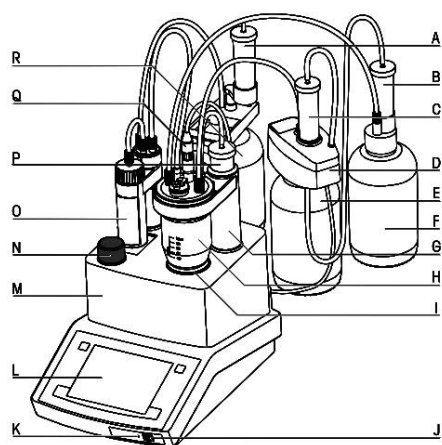
IPS

- fosforjev pentoksid, P₂O₅, MW: 141,94 g/mol, d: 2,3 g/mL pri 25 °C, Fluka[®], Sigma – Aldrich Laborchemikalien GmbH, Germany

3.1.2. Oprema

KARL FISCHER

- KF: Mettler Toledo Volumetric Karl Fischer Titrator V30, z LabX programsko opremo (slika 11)



A	Sušilna cev posode s titrantom	J	Stikalo za vklop/izklop
B	Sušilna cev posode s topilom	K	Led lučka
C	Sušilna cev posode z odpadnim topilom	L	Zaslon na dotik
D	Upravljalcec topila	M	Pogon birete (črpalka)
E	Posoda z odpadnim topilom	N	Vijak za pričvrstitev birete
F	Posoda s topilom	O	Bireta 5 ml
G	Titracijska roka	P	Sušilna cev titracijske celice
H	Titracijska celica	Q	Dvojna Pt elektroda
I	Notranje magnetno mešalo	R	Posoda s titrantom

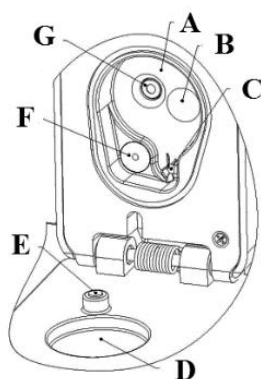
Slika 11: Shema uporabljenega KF titratorja - levo in opis delov – desno

- Pribor: injekcijska brizga z iglo, čaša (50 mL), terilnica s pestilom, žlička, stekleni tehtalni čolniček, štopovniki, merilni valj (25 mL)

- Analitska tehnica: Mettler Toledo Balance Excellence Plus XP205DR/M, Mettler Toledo GmbH, Schwarzenbach, Švica
- Programska oprema za določevanje vode s KF: LabX program
- Programska oprema za računanje statistike: Microsoft® Exel 2010

INSTRUMENT ZA MERJENJE VODNE AKTIVNOSTI IN RH

- Merilec a_w , Aqualab 4TE (slika 12):



A	Zgornja komora
B	Kapacitivnostni filter (TEV)
C	Ventilator
D	Prostor za vzorec (spodnja komora)
E	Optični senzor
F	Zrcalo
G	Enota za merjenje temperature

Slika 12: Shema uporabljenega instrumenta za merjenje a_w - levo in slika ter opis delov – desno

- Analizator vlage, Testo 635 (kapacitivnostni senzor: na higroskopni polimer senzorja se veže vlaga iz zraka nad vzorcem in spremeni njegove lastnosti – kapacitivnost)
- Eksikatorji
- MicroLite II 5032P-RH (podatkovni zapisniki)
- Avtomatska pipeta, 10 – 300 μ L, Picus, Sartorius
- Pribor: posodica za vzorec, štopovniki, petrijevke, parafilm
- Programska oprema za računanje statistike: Microsoft® Exel 2010

IPS

- Sušilnik – Kambič Laboratorijska oprema, EU
- Pribor: petrijevke, terlnica s pestilom, tehtiči, štopovniki, žlička
- Analitska tehnica: Mettler Toledo Balance Excellence Plus XP205DR/M, Mettler Toledo GmbH, Schwarzenbach, Švica
- Programska oprema za računanje statistike: Microsoft® Exel 2010

3.2. PREVERJANE KARAKTERISTIKE

Najpogostejše preverjane karakteristike, ki smo jih preverjali tudi sami so:

TOČNOST

Točnost AP izraža ujemanje med vrednostjo, ki je sprejeta kot konvencionalna prava vrednost ali referenčna vrednost in izmerjeno vrednostjo. AP mora biti točen po celotnem območju.

Za določanje točnosti v končnih produktih je na voljo več metod:

- a) Analiza zmesi sestavin zdravila, ki so jim bile dodane različne znane količine analita.
- b) Če zgornja metoda ni možna, lahko dodamo znane količine analita končnemu produktu ali pa primerjamo rezultate z drugo metodo, za katero imamo dokazano točnost.
- c) Točnost lahko predpostavimo, če smo dokazali natančnost, linearnost in specifičnost.

Točnost naj se predstavi kot odstotek izkoristka s testom vsebnosti pri dodatku znane količine analita v vzorec ali kot razlika med povprečjem meritev in sprejeto pravo vrednostjo, skupaj z intervalom zaupanja. Za določitev točnosti je potrebno izvesti vsaj 9 določitev na vsaj treh različnih koncentracijah (npr. 3 ponovitve na treh koncentracijah), ki pokrivajo specificirano območje, ki ga določimo glede na tip AP [1].

NATANČNOST

Natančnost AP izraža ujemanje med serijo meritev, dobljenih iz večkratnega vzorčenja iz istega homogenega vzorca pod predpisanimi pogoji. Lahko jo preverjamo na treh nivojih:

NATANČNOST/PONOVLJIVOST

Ponovljivost izraža natančnost pod istimi operacijskimi pogoji znotraj kratkega časovnega intervala (isti analitik, ista oprema). Ponovljivost lahko določimo na dva načina:

- a) Minimalno 9 določitev, ki pokrivajo specificirano območje postopka (npr. 3 koncentracije v treh paralelkah)
- b) Minimalno 6 določitev pri 100 % testni koncentraciji

VMESNA NATANČNOST

Vmesna natančnost izraža znotraj-laboratorijske variacije: različni dnevi, drugi analitiki, druga oprema, itd. Obseg določitve vmesne natančnosti je odvisen od okoliščin pod katerimi nameravamo AP uporabljati. Tipično se preverja vpliv različnih dni, analitikov, aparaturne itd. Ni potrebno preučevati vpliva vsakega od teh dejavnikov posebej.

OBNOVLJIVOST/REPRODUCIBILNOST

Reproducibilnost izraža natančnost med laboratoriji (kolaborativne študije, ponavadi namenjene standardizaciji metode npr. za vključitev postopka v farmakopeje).

Priporoča se uporaba avtentičnih homogenih vzorcev oz. če to ni možno, umetno pripravimo vzorec ali vzorčno raztopino. Natančnost AP ponavadi izrazimo kot varianco, SD ali RSD (koeficient variacije) serije meritev [1].

SPECIFIČNOST

Je sposobnost, da nedvoumno določimo le analit v prisotnosti drugih komponent. Te tipično vključujejo nečistote, razpadne produkte, matriks itd. Če določen AP ni specifičen lahko to še vedno kompenziramo z drugimi podpornimi AP npr. identifikacija, test čistote, vsebnosti [1].

LINEARNOST

Linearnost AP je sposobnost (znotraj določenega območja), da dobimo rezultate, ki so direktno sorazmerni koncentraciji (količini) analita v vzorcu. Linearno zvezo moramo oceniti za območje AP. Linearnost je potrebno najprej oceniti z vizualnim pregledom točk signala v odvisnosti od koncentracije ali vsebnosti analita. Le v primeru, da gre za linearen odziv nadaljujemo z obdelavo podatkov s statističnimi metodami (npr. linearna regresija z metodo najmanjših kvadratov). V določenih primerih je potrebno rezultate najprej matematično transformirati (npr. logaritmirati), da dosežemo linearnost. Izračunati je potrebno R (koeficient korelacije), odsek na Y – osi (*»intercept«*), naklon regresijske premice (*»slope«*) in vsoto kvadratov ostankov (*»residual sum of squares«*). Priporoča se priložitev ustreznih grafov. Če so točke v grafu rezidualov porazdeljene naključno okoli horizontalne osi (X), je linearna regresija primerna za podatke. V nekaterih primerih npr. imunski testi, linearnosti ni možno doseči, zato so v teh primerih na voljo ustrezne funkcije, ki opisujejo koncentracijo analita v vzorcu. Za določitev linearnosti se priporoča uporabo vsaj petih različnih koncentracij analita v treh ponovitvah [1].

OBMOČJE

Območje AP je interval med spodnjo in zgornjo koncentracijo (količino) analita v vzorcu (vključno s tema koncentracijama) za kateri je bilo dokazano, da ima AP ustrezen nivo točnosti, natančnosti in linearnosti. Specificirano območje AP je ponavadi dobljeno iz študij linearnosti in je odvisno od namenjene uporabe postopka. Različni AP imajo različna minimalna specificirana območja:

- Testi vsebnosti v ZU ali končnem izdelku: od 80 – 120 % pričakovane koncentracije
- Določanje nečistot (vsebnost vode): od stopnje poročanja nečistote do 120 % specifikacijske meje, itd. [1]

ROBUSTNOST

Robustnost AP je merilo njegove sposobnosti, da majhne, a namerne, variacije v parametrih nimajo vpliva na izmerjeno vrednost in je pokazatelj njegove zanesljivosti tekom normalne uporabe. Robustnost se načeloma preverja že tekom razvoja metode [1].

V preglednici IV so predstavljene najpomembnejše karakteristike, ki jih moramo preveriti in so odvisne od vrste metode, ki jo želimo validirati. V preglednici ni robustnosti, ki se mora po ICH izvesti že ob razvoju metode, pred izvedbo validacije.

Preglednica IV: Karakteristike, ki jih moramo glede na vrsto metode preveriti po ICH; za izvedbo naših validacij smo preverjali karakteristike potrebne za test vsebnosti (vsebnost vode); – označuje, da ta karakteristika ponavadi ni preučevana za ta tip meritev; + označuje, da je ta karakteristika ponavadi preučevana; (1) v primeru, kjer smo preučili obnovljivost/reproducibilnost (glej zgoraj), vmesna natančnost ni potrebna; (2) pomanjkanje specifičnosti AP lahko nadomestimo z drugimi AP; (3) je lahko potrebna v določenih primerih; povzeto po [1]

Tip AP	IDENTIFIKACIJSKI TEST	TEST NEČISTOT		TEST VSEBNOSTI
Karakteristike		Kvantitat. test	Limit. test	Test raztapljanja (samo merjenje) vsebnost/jakost
Točnost	-	+	-	+
Natančnost				
Ponovljivost	-	+	-	+
Vmesna natančnost	-	+(1)	-	+(1)
Specifičnost (2)	+	+	+	+
Meja detekcije	-	-(3)	+	-
Meja kvantifikacije	-	+	-	-
Linearnost	-	+	-	+
Območje	-	+	-	+

Preverjane karakteristike izberemo od primera do primera, neka splošna pravila pa so podana v zgornji preglednici. V praksi je ponavadi možno načrtovati eksperimentalno delo na tak način, da lahko hkrati preverimo več validacijskih karakteristik naenkrat [1]. Na ta način lahko minimiziramo trud, ki ga potrebujemo, da dobimo vse potrebne informacije [2]. ICH predpisuje, da je v nekaterih primerih kot so: spremembe v sintezi ZU, spremembe v sestavi končnega produkta, spremembe v AP, potrebno izvesti tudi revalidacijo. Stopnja potrebne revalidacije je odvisna od narave sprememb. Tudi nekatere druge spremembe lahko zahtevajo ponovno validacijo [1]. V ta namen t.j. v primeru revalidacije je potrebno arhivirati tudi ustrezno število vzorcev, ki morajo temeljiti na znanstvenih načelih in oceni tveganja [4]. Vse pomembne podatke zbrane med validacijo in formule, ki smo jih uporabili za izračun, moramo predstaviti in ustrezno komentirati [1].

3.3. METODE

3.3.1. Analiza vzorcev pri določanju vode s KF titratorjem

3.3.1.1. Standardizacija na vodo

Za izvedbo standardizacije smo uporabili prečiščeno vodo. Titracijsko celico smo napolnili z ustreznim topilom - brezvodnim metanolom tako, da smo prekrili elektrodi. Izbrali smo tudi kompozit, na katerem so se kasneje izvajale analize – kompozit 5. Na začetku tedna smo preverili faktor KF titranta s standardizacijo. To smo izvedli z metodo standardnega dodatka v

5 ponovitvah oz. nato z 1 ponovitvijo znotraj tega tedna. Izvedli smo predtitracijo oz. jo je instrument izvedel samodejno, tako da v topilu ni bilo prisotne vode. Nato smo določili premik (*drift*), da smo videli kako hitro vlaga vstopa v sistem. Potem smo lahko dodali slepi vzorec vode, da smo dodatno preverili sposobnost titriranja aparature in s tem zmanjšali možnost napak. Po slepi titraciji smo začeli s standardizacijo in dodali ustrezno količino vode (2 – 250 mg po *United States Pharmacopeia* (USP) ali 30 mg po Japonski farmakopeji (JP)) v injekcijski brizgi, po postopku opisanem v poglavju 3.3.1.3. *Priprava vzorcev*. Ekvivalentni faktor je aparatura izračunala sama oz. smo ga izračunali po enačbi 3:

$$\frac{m}{V - V_{sl}} = FKF \left[\frac{mg}{mL} \right]$$

Enačba 3: Izračun faktorja KF titranta; m – masa vode; V – volumen porabljenega KF titranta [mL]; Vsl – slepa vrednost [mL] – če je aparat avtomatsko ne upošteva; FKF – faktor KF titranta [mg/mL]; povzeto po [7]

3.3.1.2. Določanje vode v vzorcu

Izvedba je potekala na podoben način kot standardizacija, le da smo tokrat namesto prečiščene vode uporabili vzorec. Titracijsko celico smo napolnili z ustreznim topilom – brezvodnim metanolom oz. mešanico brezvodnega metanola in ustreznega drugega topila, s katerim smo želeli izvesti titracijo tako, da smo prekrili elektrodi. Izbrali smo ekstrakcijski čas in kompozit 5. Izvedli smo predtitracijo oz. jo je instrument samodejno, tako da v topilu ni bilo prisotne vode. Nato smo pri ustreznem premiku (*driftu*) začeli z analizo vzorca po postopku opisanem v poglavju 3.3.1.3. *Priprava vzorcev*. Izračunali smo vsebnost vode m/m % v vzorcu po enačbi 4 oz. nam jo je podal že inštrument sam po enačbi 5.

$$\frac{(V - V_{sl}) \times FKF \times 100}{m_{vz}} = \text{vsebnost vode v vzorcu [\%]}$$

Enačba 4: Izračun po katerem smo izračunali vsebnosti vode m/m %; V = volumen porabljenega KF titranta [ml]; Vsl = slepa vrednost [ml] – če jo aparat avtomatsko ne upošteva; FKF = faktor KF titranta [mg/mL]; m_{vz} = natehta vzorca [mg] povzeto po [7]

$$\frac{(VEQ * CONC - [\frac{t * DRIFT}{1000}]) * C}{m} = \text{vsebnost vode v vzorcu [\%]}$$

Enačba 5: Izračun po katerem je instrument s programom LabX izračunal vsebnosti vode m/m %, VEQ = poraba titranta [mL]; CONC = koncentracija titranta, določena s tedensko standardizacijo [mg/mL]; t = čas titracije [min]; DRIFT = premik (*drift*) [µg/min]; C = konstanta in znaša 0.1 [/]; m = natehta vzorca [g].

3.3.1.3. Priprava vzorcev

OSNOVNA PRIPRAVA VZORCA

1. Homogenizirali smo tablete v prašek
 - a) strli smo 4 tablete
 - b) strli smo 12 tablet in naredili vse 3 paralelke iz istega tabletnega prahu
 - c, d) strli smo vsaj 10 tablet za posamezen vzorec, ki smo ga želeli analizirati

2. Natančno smo natehtali približno:

- a) 500 mg tabletnega prahu
- b) 250 mg tabletnega prahu
- c) 750 mg tabletnega prahu
- d) $500 \text{ mg} \pm X \text{ mg}$ tabletnega prahu

3. Med mešanjem na magnetnem mešalu smo hitro stresli vzorec v celico s topilom (cca. 40-50 mL).

4. Določili smo vsebnost vode.

Opomba: Točka 1: a, b in c smo uporabili pri razvoju metode, in sicer a) poskusi 1-7/3, b) poskusi 8/1 – 8/3 ter c), ki predstavlja postavljeno metodo (točka 9); d) pa smo uporabljali pri TU ($V_{z \text{ TU osn}}$) in nadaljni validaciji;

Točka 2: a) je standardna zatehta, točki b) in c) pa se nanašata na robustnost metode, ter d) na poskuse 8/1-3 pri razvoju metode;

PRIPRAVA VZORCA PRI STANDARDIZACIJI IN TESTU USTREZNOSTI

- 1. Injekcijsko brizgo z iglo smo večkrat sprali z vodo (demineralizirano).
- 2. Previdno smo odmerili in natehtali zahtevano količino vode.
- 3. Vodo smo injicirali v celico s približno 40 – 50 mL topila. Topilo smo konstantno mešali med dodajanjem vzorca.
- 4. Določili smo vsebnost vode.

Opomba:

- Priporočena je uporaba rokavic (bombažnih), da ne pride do napak zaradi vnosa vlage na brizgo.
- Iglo med posameznimi stopnjami obrišemo s staničevino, da ne pride do napak. S tem preprečimo, da bi natehtali tudi vodo ali topilo, ki bi lahko bila prisotna na zunanjem delu igle.

TOČNOST METODE (vzorec z dodatkom vodnega standarda; 3 paralelke)

- 1. Za določitev točnosti metode smo uporabili vodni standard 10,0.
- 2. Določili smo dodatke ustrezne količine vodnega standarda.*
- 3. Diferenčno smo zatehtali vzorec.
- 4. Med mešanjem na magnetnem mešalu smo hitro stresli vzorec v celico s topilom (cca. 40-50 mL).
- 5. Dodali smo ustrezen volumen ali maso vodnega standarda: najnižji dodan volumen je moral biti 2 μL in najvišja točka vsaj 120 % spec. meje.
- 6. Določili smo vsebnost vode v vzorcu in dodan vodni standard (v %).

LINEARNOST (vodni standard; 3 paralelke)

1. Za določitev linearnosti metode smo uporabili vodni standard 10,0.
2. Določili smo dodatke ustrezne količine vodnega standarda.*
3. Dodali smo ustrezno količino vodnega standarda v celico s topilom (cca. 40-50 mL): najnižji dodan volumen je moral biti 2 μ L in najvišja točka vsaj 120 % spec. meje.
4. Določili smo vsebnost vode iz zateht vodnega standarda v mg ter določili porabo KF titranta v mL.

*Opomba k točki 2 pri točnosti in linearnosti metode pri pripravi vzorca: Da smo izvedli točnost/linearnost, smo si morali najprej izbrati ustrezne dodatke vode med 0,4 – 5,4 % vsebnosti vode, ter preračunati koliko standarda je potrebno dodati. Izbrali smo naslednje okvirne vrednosti, ki so navedene v preglednici VII pri točnosti in v preglednici VIII pri linearnosti.

3.3.2. Razvoj metode

3.3.2.1. Ključne odločitve pri razvoju metode

Za določitev vode v vitaminskih tabletah smo razvili in validirali KF metodo. Potrebno je bilo postaviti ustrezno metodo, ki smo jo kasneje validirali in po njej nato analizirali vzorce. Najpomembnejša sta izbira delovnega medija in območja pH, zato smo bili pri teh dveh parametrih še posebej pozorni. Določili smo naslednje parametre:

- Titrant:

Direktno KF titracijo smo izvedli z enokomponentnim reagentom. Glede na koncentracijo titranta in vsebnost vode smo se morali odločiti o ustrezni izbiri titranta. Informativno smo določili specifikacijsko mejo za vodo, ki znaša $\leq 4,5$ %, zato smo se tudi odločili za izvedbo analize s Hydranal Composite 5 titrantom.

- Topilo:

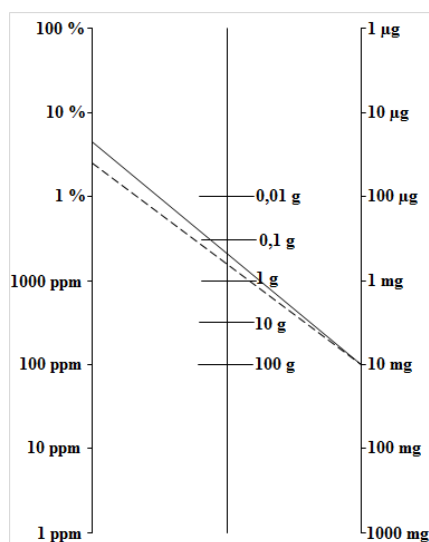
Najprej smo poskusili izvesti titracijo v brezvodnem metanolu, saj je formamid kancerogen in zdravju škodljiv ter bi ob uporabi le metanola kot topila izboljšali kakovost dela za izvajalca analize. Bistveno je bilo, da se vzorec v topilu popolnoma raztopi, zato smo ga lahko že predhodno poskušali raztopiti v majhni količini le tega. Poskusili smo tudi kombinacijo metenola in formamida, da smo s tem zagotovili popolno raztapljanje.

- Ekstrakcijski čas:

Za začetek smo si izbrali 20 s ekstrakcijski čas in smo ga po potrebi povečali.

- Zatehta vzorca:

Da smo določili primerno maso vzorca smo uporabili sliko 13. Optimalna vsebnost vode naj bi znašala približno 10 mg na vzorec in ker določena specifikacijska meja za vodo znaša $\leq 4,5$ %



Slika 13: Določitev količine vzorca za vsebnost vode v območju 1000 ppm do 100 %; polna črta – optimalna količina vzorca za pričakovano vsebnost vode 4,5 % ter prekinjena črta za 2,5 %

bi bilo primerno zatehtati okoli 0,2 g vzorca. Pri poskusnem merjenju vzorca, smo približno videli vsebnost vode v vzorcu v odstotkih (cca 2,5 %) zato smo lahko nadalje določili zatehto vzorca, ki pa je znašala 0,4 g. Ker pa se natančnost večja z maso vzorca (zmanjša se možnost napak zaradi vezave vlage med pripravo in dodajanjem vzorca), smo povečali maso vzorca na 0,5 g in bi jo lahko kasneje še prilagodili, če bi bilo potrebno. Če želimo doseči visoko stopnjo natančnosti, mora biti poraba titranta med 30 – 70 % nominalnega volumna birete. Uporabili smo 5 mL bireto, torej je priporočeno, da volumen porabe znaša med 1,5 mL in 3,5 mL.

3.3.2.2. Izvedba razvoja metode

Naslednje poskuse, prikazane v preglednici V, smo izvedli po postopku opisanem v poglavju 3.3.1.2. *Določanje vode v vzorcu* in vzorce za analizo pripravili po postopku opisanem v poglavju 3.3.1.3. *Priprava vzorcev*. Glede na opisane zahteve v prejšnjem poglavju smo si izbrali parametre za prvi poskus (preglednica V - poskus 1) ter nato prilagajali nastavitve glede na dobljene rezultate. Hkrati smo opazovali tudi obliko grafov poteka titracije. Preverili smo tudi, če se tablete v čaši napolnjeni z metanolom raztopijo. Ko smo glede na dobljene rezultate sklepali, da je metoda primerna, smo pomerili postavljeno metodo tudi v treh paralelkah, da smo videli ustreznost RSD-ja. Odločili smo se tudi preizkusiti vpliv različnih mas zatehtanega vzorca ($500 \pm X$). Namreč, ko postavimo ustrezno metodo za določanje vode s KF titracijskim sistemom, moramo pred izvedbo validacije to metodo potrditi s TU, ki jo zahteva Ph. Eur. 8.0. S tem testom dokažemo, da sistem daje zanesljivo točne rezultate ter s tem informativno preverimo, če bo postavljena metoda temu ustrezala, preden ga izvedemo. S pH lističi smo izmerili tudi pH medija po izvedbi analize, saj je le ta zelo pomemben za KF titracijo. Ko smo postavili metodo (preglednica V - točka 9), je bilo potrebno izvesti TU po Ph. Eur. 8.0, da smo ugotovili, če je dobljeni sistem primeren za analizo.

Preglednica V: Seznam poskusov pri razvoju metode; poskus 5 predstavlja najustrežnejše parametre metode; poskusi 6, 7 in 8 se razlikujejo v pripravi vzorca in so bili izvedeni v treh paralelkah; točka 9 predstavlja postavljeno metodo

Poskus	Titrant	Topilo	Ekstrakcijski čas (s)	Zatehta (mg)
1	Hydranal Composite 5	MeOH	20	500
2	Hydranal Composite 5	MeOH:formamid = 1:1	60	500
3	Hydranal Composite 5	MeOH:formamid = 1:1	300	500
4	Hydranal Composite 5	MeOH	60	500
5	Hydranal Composite 5	MeOH:formamid = 1:1	60	500
6/1, 2, 3	Hydranal Composite 5	MeOH:formamid = 1:1	60	500
7/1, 2, 3	Hydranal Composite 5	MeOH:formamid = 1:1	60	500
8/1, 2, 3	Hydranal Composite 5	MeOH:formamid = 1:1	60	500 ± X
9	Hydranal Composite 5	MeOH:formamid = 1:1	60	500

3.3.2.3. Test ustreznosti po Ph. Eur. 8.0

TU po Ph. Eur. 8.0 zahteva preverjanje točnosti določitve z izbranim titrantom za vsako kombinacijo substance (vzorca), titranta in topila, zato smo ga tudi izvedli. Delali smo po postopku, ki ga farmakopeja navaja kot primer [20], ki je ustrezen za vzorce, ki vsebujejo 2,5 – 25 mg vode. Iz naših rezultatov o vsebnosti vode, ki smo jih pridobili, ko smo postavljali metodo smo lahko potrdili, da so naši vzorci v tem območju.

TU je potrebno izvesti, da potrdimo ustreznost izbranega titranta in topila v izbranem sistemu, saj je od njiju odvisna izmerjena vsebnost vode. V nasprotnem primeru t.j. v primeru neustreznosti ne moremo nadaljevati z validacijo ampak lahko ponovno poskušamo izboljšati metodo oz. validacije ni možno izvesti.

3.3.2.4. Izvedba testa ustreznosti

Najprej smo po postavljeni metodi (preglednica V - točka 9), ki smo jo razvili, določili vsebnost vode vzorca (M) v mg po postopku opisanem v poglavju 3.3.1.2. *Določanje vode v vzorcu*. Vzorec in dodatke vode smo pripravili za analizo po postopku opisanem v poglavju 3.3.1.3. *Priprava vzorcev*. V isti titracijski celici smo v zaporedju (eno za drugo) dodajali znane količine vode (W_1), ki so ustrezale približno 50 – 100 % količine vode v vzorcu (M), ki smo ga analizirali. Dodati je bilo potrebno vsaj 5 dodatkov vode v tem območju.

Na koncu smo določili še vsebnost vode po dodatku vode, ki je ekvivalenten specifikacijski meji za vsebnost vode v vzorcu. Ker specifikacijske meje ni in smo jo določili zgolj informativno t.j. $\leq 4,5$ %, smo vzeli informativno specifikacijsko mejo, ki je v uporabi že dlje časa t.j. za IPS, ki naša $\leq 2,5$ %. Vsebnost vode smo določili po vsakem dodatku (W_2).

Izkoristek (r) smo izračunali po enačbi 6:

$$r = 100 * \frac{W_2}{W_1}$$

Enačba 6: Izračun r; W_1 = količina dodane vode [mg]; W_2 = količina določene vode [mg]

$$W_2 = \frac{\text{rezultat vode iz analize v \% * masa zatehte vzorca (vode) v mg}}{100}$$

Enačba 7: Izračun količine določene vode

Ko smo pridobili vse izkoristke t.j. po končani analizi, smo izračunali povprečen izkoristek ($\bar{r}$), ki je moral znašati med 97,5 % in 102,5 %, da je sistem reagent/topilo ustrezen.

- Izračunali smo regresijsko premico, kjer je X os predstavljala kumulativno dodano vodo in Y os vsoto vsebnosti vode za vzorec (M) in kumulativne določene vode po vsakem dodatku.

$$X_i = \sum_{i=1}^n W_1$$

$$Y_i = M + \sum_{i=1}^n W_2$$

Enačba 8: Izračun regresijske premice; X_i – kumulativna vsebnost vode [mg]; Y_i – vsota vode v vzorcu in kumulativne vrednosti rezultatov določitve vode [mg]; M – vsebnost vode v vzorcu [mg]

- Izračunali smo naklon (b) in presečišče z Y osjo (a) ter presečišče ekstrapolirane kalibracijske linije z osjo X (d).

$$Y = k * X + a; \text{ ko je } Y = 0, \text{ potem je } d = \frac{(0-a)}{b};$$

- Izračunali smo % napake (e_1 in e_2) po naslednjih enačbah:

$$e_1 = 100 * \frac{a - M}{M}$$

$$e_2 = 100 * \frac{|d| - M}{M}$$

Enačba 9: Izračun % napake; a = presečišče z Y osjo [v mg vode]; d = presečišče z X osjo [v mg vode]; M = vsebnost vode v vzorcu [v mg vode]

Da je sistem ustrezen mora biti:

- $|e_1|$ in $|e_2|$ manj kot 2,5 %
- b med 0,975 in 1,025
- RSD po nivojih ($n \geq 3$) ≤ 10 % za nivo vode $\geq 0,5$ %

3.3.3. Validacija metode za določanje vode s KF titratorjem

3.3.3.1. Osnove izvedbe validacije

Razvito metodo (preglednica V - točka 9), potrjeno s TU po Ph. Eur. 8.0 smo potem validirali, da smo potrdili: natančnost, rigidnost, točnost, linearnost in robustnost metode. Validacijo smo izvedli na vitaminskih tabletah ob upoštevanju kriterijev za vodo, ki so navedeni v preglednici

VI. Vrednosti so morale ustrezati specifikacijski meji, ki znaša informativno $\leq 4,5$ % oz. za točnost in linearnost vsaj 120 % specifikacijske meje t.j. vsaj 5,4 %.

Preglednica VI: Vrednoteni parametri in kriteriji, ki smo jih upoštevali pri izvedbi validacije metode KF in a_w

PARAMETER	KRITERIJ
Natančnost metode znotraj enega dneva (ponovljivost)	<u>RSD ($n \geq 6$):</u> ▪ ≤ 10 % za nivo vode oz. ERH $\geq 0,5$ % ▪ ≤ 20 % za nivo vode oz. ERH $< 0,5$ % $t_{tab}(0,05, n-1) = 2,571$; $t_{tab}(0,01, n-1) = 4,032$ *
Natančnost metode (vmesna natančnost): med dnevi vključuje tudi Rigidnost metode: merimo na istem oz. drugem inštrumentu/drug analitik ali na drugem inštrumentu/isti analitik	<u>RSD ($n \geq 6, 12$):</u> ▪ ≤ 10 % za nivo vode oz. ERH $\geq 0,5$ % ▪ ≤ 20 % za nivo vode oz. ERH $< 0,5$ % $t_{tab}(0,05, n-1) = 2,201$; $t_{tab}(0,01, n-1) = 3,106$ * <u>Sprememba povprečne vsebnosti glede na rezultate ponovljivosti (absolutna razlika):</u> ▪ $\pm 1,0$ % absolutno za nivo vode oz. ERH $\geq 3,0$ % ▪ $\pm 0,5$ % absolutno za nivo vode oz. ERH 1,0 % do 3,0 % ▪ $\pm 0,2$ % absolutno za nivo vode oz. ERH $< 1,0$ %
Točnost metode	<u>Posamezni in celokupni izkoristek:</u> ▪ za specif.mejo vode oz. ERH $< 0,5$ %: 80 – 120 % ▪ za specif.mejo vode oz. ERH 0,5 % – 5,0 %: 90 – 110 % ▪ za specif.mejo vode oz. ERH $> 5,0$ %: 95 – 105 % $t_{tab}(0,05, n-1) = 4,303$ * za $n = 3$; $t_{tab}(0,05, n-1) = 3,182$ * za $n = 4$; $t_{tab}(0,05, n-1) = 2,201$ * za $n = 12$ <u>RSD po nivojih ($n \geq 3$):</u> ▪ ≤ 10 % za nivo vode oz. ERH $\geq 0,5$ % ▪ ≤ 20 % za nivo vode oz. ERH $< 0,5$ %
Linearnost metode	▪ $r \geq 0,99$ (a_w: informativno, ker zveza ni vedno linearna-sorbcijska izoterma) ▪ ± 25 % odstop odseka na osi y (KF: glede na porabo KF reagenta pri 100 % vzorcu)
Robustnost metode	<u>RSD ($n \geq 3, 6, 9, 12$):</u> ▪ ≤ 10 % za nivo vode oz. ERH $\geq 0,5$ % ▪ ≤ 20 % za nivo vode oz. ERH $< 0,5$ % $t_{tab}(0,05, n-1) = 2,571$; $t_{tab}(0,01, n-1) = 4,032$ * za $n = 6$; $t_{tab}(0,05, n-1) = 2,306$; $t_{tab}(0,01, n-1) = 3,355$ * za $n = 9$; <u>Sprememba povprečne vsebnosti glede na rezultate ponovljivosti (absolutna razlika):</u> ▪ $\pm 1,0$ % absolutno za nivo vode oz. ERH $\geq 3,0$ % ▪ $\pm 0,5$ % absolutno za nivo vode oz. ERH 1,0 % - 3,0 % ▪ $\pm 0,2$ % absolutno za nivo vode oz. ERH $< 1,0$ %
Selektivnost metode	/
* OPOMBA: vsi rezultati morajo biti znotraj intervala zaupanja pri 95 % ($t_{tab}(0,05)$) zanesljivosti oz. pri 99 % ($t_{tab}(0,01)$) zanesljivosti.	

Za validacijo določanja vsebnosti vode s KF metodo v vitaminskih tabletah smo najprej pripravili protokol, kjer smo podrobno opisali celotno izvedbo validacije ter ga dali pregledati in potrditi, nato smo začeli z analizo. Vsi vzorci so bili analizirani po tem validacijskem

protokolu. Validacija je zajemala naslednje sekvence: natančnost metode znotraj enega dneva (ponovljivost), vmesna natančnost metode (vpliv različnih dni, analitikov, aparatur), točnost metode, linearnost metode in robustnost metode.

Vzorci (Vz) smo ustrezno označili (če črki sledi številka, označuje številko paralelke):

- A – pri določanju natančnosti metode znotraj enega dneva (ponovljivosti)
- B – pri določanju vmesne natančnosti metode (vpliv različnih dni, analitikov, aparatur)
- C – pri določanju robustnosti metode (50 % zatehta)
- C' – pri določanju robustnosti metode (150 % zatehta)

Vodo v vzorcu smo določali po postopku opisanem v poglavju 3.3.1.2. *Določanje vode v vzorcu* ter vzorce pripravili po postopku opisanem v poglavju 3.3.1.3. *Priprava vzorcev*. Rezultate smo predstavili kot % vsebnosti vode.

3.3.3.2. Izvedba validacije

NATANČNOST METODE ZNOTRAJ ENEGA DNEVA (PONOVLJIVOST)

Homogen vzorec vitaminskih tablet smo pripravili v šestih paralelkah, VzA₁ do VzA₆. Izračunali smo povprečno vsebnost vode v posameznem vzorcu, upoštevajoč vse ponovitve. Izračunali smo RSD povprečnih vsebnosti ($n = 6$) in interval zaupanja povprečnih vsebnosti pri 95 % zanesljivosti ($n = 6$, $t_{\text{tab}} = 2,571$). Kriteriji za natančnost metode znotraj enega dneva so navedeni v preglednici VI.

VMESNA NATANČNOST METODE (vpliv različnih dni, analitikov, aparatur)

Homogen vzorec vitaminskih tablet smo pripravili v šestih paralelkah, VzB₁ do VzB₆. Analizo je izvajal drug tehnik, na drug dan, z uporabo drugega KF sistema. Izračunali smo povprečno vsebnost vode v posameznem vzorcu, upoštevajoč vse ponovitve določitev vseh paralelk vzorca za izračun vsebnosti vode. Izračunali smo RSD vode ($n = 6$, 12) in interval zaupanja pri 95 % zanesljivosti ($n = 12$, $t_{\text{tab}} = 2,201$). Primerjali smo rezultate s ponovljivostjo metode. Kriteriji za vmesno natančnost metode so navedeni v preglednici VI.

Iz rezultatov za natančnost metode iz 1. in 2. dneva ($n = 12$) smo izračunali povprečno vsebnost vode v vzorcu, povprečno maso vzorca in povprečno porabo titranta. Te podatke smo nato uporabili pri preverjanju točnosti in linearnosti metode.

TOČNOST METODE

Različne vrednosti vodnega standarda znotraj območja 0,4 % do približno 5,4 % (t.j. od približno 9 % - 120 % specifikacijske meje) vsebnosti vode, so bile dodane ustreznim vrednostim vitaminskih tablet. Vsaka koncentracija (masa) je bila pripravljena v treh paralelkah. Vzorec smo pripravili po postopku opisanem v poglavju 3.3.1.3. *Priprava vzorcev*. V preglednici VII so navedene okvirne vrednosti dodatka vodnega standarda.

Preglednica VII: Okvirne vrednosti dodatka vodnega standarda, ter pripadajoč % in masa dodane vode, ki smo jih želeli zatehtati pri točnosti metode; m_{vz} ($n=12$); c standarda (1., 2. paralelka) = 10,06 mg/g; c standarda (3. paralelka) = 10,01 mg/g.

Dodatki vode	% dodane vode [%]	m dodane vode [mg]	m dodatka standarda [g]
1.	0,4	2	0,2
2.	2,6	13	1,3
3.	4,5	23	2,3
4.	5,4	27	2,7

Ko smo izračunali vrednosti za maso dodatka standarda, smo izvedli analizo. Analizo smo izvedli po postavljeni metodi (preglednica V – točka 9) s tem, da smo dodali izračunan volumen vode oz. vodnega standarda. S pomočjo rezultatov analize o vsebnosti vode v vzorcu z dodatki vode in vsebnosti vode v čistem vzorcu, ki smo ga dobili iz povprečja rezultatov za natančnost metode iz 1. in 2. dneva ($n = 12$), lahko izračunamo izmerjeno vodo po enačbi 10.

Izmerjena voda [%] = % vode v vzorcu (z dodatkom vode) – % vode v čistem vzorcu ($n = 12$)

Enačba 10: Izračun izmerjene vode; % vode v vzorcu (z dodatkom vode) = rezultat analize

S pomočjo izračuna mase dodane vode in natehte vzorca, lahko izračunamo dodano vodo po enačbi 11.

$$\text{Dodana voda [\%]} = \frac{\text{masa dodane vode (mg)}}{\text{masa vzorca (mg)}} \times 100$$

Enačba 11: Izračun dodane vode; Maso dodane vode izračunamo iz natehte vodnega standarda (g)

Iz teh vrednostih (izmerjene in dodane vode) smo izračunali r , po enačbi 6. Izračunali smo $\bar{r}$, SD in RSD znotraj paralelk in znotraj območij koncentracij oz. določene vsebnosti vode ter celotni $\bar{r}$, SD in RSD. Točnost smo preverili v območju QL – 120 %. Kriteriji za točnost metode so navedeni v preglednici VI.

LINEARNOST

Za dokaz linearnosti metode smo izvedli analize 8 vodnih standardov v 3. paralelkah. Dodali smo take količine analita (vodnega standarda), da smo dobili vsebnosti vode med 2,05 mg in 27,46 mg. Glede na nominalno maso vzorca 502,98 mg ($n = 12$) to ustreza vsebnosti vode med 0,41 % in 5,46 %. Standarde smo pripravili po postopku opisanem v poglavju 3.3.1.3. *Priprava vzorcev*. V preglednici VIII so navedene okvirne vrednosti dodatka vodnega standarda.

Preglednica VIII: Okvirne vrednosti dodatka vodnega standarda, ter pripadajoč % in masa dodane vode, ki smo jih želeli zatehtati pri linearnosti metode; m_{vz} ($n = 12$); c standarda = 10,06 mg/g.

Dodatki vode	% dodane vode [%]	m dodane vode [mg]	m dodatka standarda [g]
1.	0,4	2	0,2
2.	1,0	5	0,5
3.	1,5	7,5	0,75
4.	2,0	10	1,0
5.	3,0	15	1,5
6.	3,5	17,6	1,76
7.	4,5	22,6	2,26
8.	5,4	27	2,7

Ko smo izračunali vrednosti za maso dodatka standarda, smo izvedli analizo. Analizo smo izvedli po prilagojeni metodi točke 9 (preglednica V). Spremenili smo ekstrakcijski čas, ki je znašal 20 s, kajti določujemo vodo in ne potrebujemo 60 s ter zatehto vzorca, saj dodajamo predpisan volumen vodnega standarda.

Iz natehte vodnega standarda smo izračunali maso dodane vode (c standarda = 10,06 mg/g). Nato smo izračunali % vode glede na nominalno maso vzorca, po enačbi 11, kjer smo za maso vzorca vzeli $\bar{m}_{vz}$ ($n = 12$). Pri vsakem analiziranem vzorcu smo odčitali tudi porabo KF reagenta. Iz podatkov porabe KF reagenta (povprečno dobljenih volumnov) v odvisnosti od % vode izračunanega glede na nominalno maso vzorca smo izračunali regresijsko premico s pomočjo metode najmanjših kvadratov za vsako paralelko v zgoraj omenjenih intervalih, ki so predstavljene pri rezultatih. Prav tako so predstavljeni pripadajoči grafi rezidualov. Znotraj posameznih območij koncentracij smo izračunali povprečje ($n = 3$) porabe KF titranta ter SD in RSD.

Presečišča z Y osjo smo odčitali iz enačbe premice, ki smo jo izračunali z linearno regresijo. Povprečen volumen porabe KF titranta ($n = 12$) smo vzeli iz povprečja vzorca pri primerjavi natančnosti metode za 1. in 2. dan. Odstotek presečišča smo izračunali za vsako paralelko posebej po enačbi 12.

$$\text{Odstotek presečišča} = \frac{\text{presečišče Y osi}}{\text{Povprečen volumen porabe KF titranta (n = 12)}}$$

Enačba 12: Izračun odstotka presečišča

Linearnost smo preverili v območju do 120 % specifikacijske meje. Kriteriji za linearnost metode so navedeni v preglednici VI.

ROBUSTNOST METODE

Robustnost metode smo določili z variacijo ($\pm 50 \%$) v masi homogenega vzorca vitaminskih tablet. Vzorce smo pripravili v treh paralelkah ter jih primerjali z vzorci s 100 % maso tablet t.j. 500 mg. Za vzorce s 100 % maso tablet smo uporabili vzorce iz natančnosti metode znotraj enega dneva.

Izračunali smo povprečno vsebnost vode v posameznem vzorcu, upoštevajoč vse ponovitve. Izračunali smo RSD vode ($n = 3, 6, 9$) in interval zaupanja pri 95 % zanesljivosti ($n = 9, t_{tab} = 2,306$). Kriteriji za robustnost metode so navedeni v preglednici VI.

3.3.4. Analiza vzorcev pri določanju a_w

3.3.4.1. Priprava vzorcev

Meritev a_w je nedestruktivna in ne zahteva nobene priprave vzorca razen, če je tako predpisano. Vzorec smo kolikor hitro je mogoče prenesli v aparaturo, da se vzorec ni navlažil. Potrebno je bilo vzeti toliko vzorca, da je bilo prekrito celotno dno komorice t.j. pri našem vzorcu 12 tablet.

Pri preverjanju točnosti in linearnosti smo morali vzorec pred meritvijo ustrezno pripraviti.

POSTOPEK PRIPRAVE VZORCA ZA TOČNOST IN LINEARNOST

Vzorec vitaminskih tablet smo razdelili na 4 sete v treh paralelkah. En teden pred izvedbo analize smo namestili te štiri sete v štiri različne eksikatorje s točno definirano RH. Definirane RH so bile dosežene z uporabo standardnih nasičenih solnih raztopin (preglednica IX). Vitaminske tablete smo 1 teden pustili v eksikatorju. Po enem tednu smo jim izmerili a_w z Aqualab instrumentom. RH v vsakem eksikatorju smo spremljali s podatkovnimi zapisniki.

Preglednica IX: Nasičene solne raztopine in RH za točnost in linearnost metode

Nasičene solne raztopine	Teoritična RH, %	Izmerjena RH v eksikatorjih, %
LiCl	11	15,25
MgCl₂	30	37,20
NaBr	50	60,06
KI	70	67,52

3.3.4.2. Določanje a_w v vzorcu

a_w določimo tako, da damo vzorec v malo nepredušno posodico, znotraj katere se vzpostavi ravnotežje med vodo v trdnem vzorcu in prostorom nad njim ter merimo RH prostora nad vzorcem. Meritve smo izvajali pri T 22,5 °C. Rezultate smo odčitali, ko se je vzpostavilo ravnotežje in so se vrednosti ustalile t.j. ko sta bili 2 meritvi znotraj 0,003 a_w . Pri robustnosti metode so lahko bili parametri merjenja drugačni.

3.3.4.3. Določanje vode z analizo IPS v vzorcih

1. V presušene tehtiče smo natehtali točno določeno maso uprašenega vzorca.
2. Vzorce smo skupaj s sušilnim sredstvom – fosforjevim pentoksidom postavili v sušilnik.
3. Analizo IPS smo izvedli pri pogojih: P_2O_5 , vakuum, 1,0 g vzorca, 105 °C, 4 h.
4. Po končani analizi smo vzorce ohladili v eksikatorju nad silikagelom.
5. Po eni uri smo vzorce stehali in izračunali izgubo pri sušenju.

3.3.5. Validacija metode za določanje a_w

3.3.5.1. Osnove izvedbe validacije

Validacijo smo izvedli na vitaminskih tabletah ob upoštevanju kriterijev za vodo, ki so navedeni v preglednici VI, kajti za a_w je bila naša študija pri Leku prva. Prav tako nismo našli nobenih podatkov o kriterijih v literaturi. Vrednosti so morale ustrezati specifikacijski meji, ki znaša 0,65 a_w oz. za točnost in linearnost vsaj 120% specifikacijske meje t.j. vsaj 0,78 a_w .

Za validacijo a_w v vitaminskih tabletah smo najprej pripravili protokol, kjer smo podrobno opisali celotno izvedbo validacije ter ga dali pregledati in potrditi, nato smo začeli z analizo. Vsi vzorci so bili analizirani po tem validacijskem protokolu. Validacija je zajemala naslednje sekvence: natančnost metode znotraj enega dneva (ponovljivost), vmesna natančnost metode

(vpliv različnih dni, analitikov, aparatur), točnost metode, linearnost, robustnost metode in selektivnost (specifičnost) metode.

Vzorci (Vz) smo ustrezno označili (če črki sledi številka, označuje številko paralelke):

- a' – pri določanju natančnosti metode znotraj enega dneva (ponovljivosti)
- b' – pri določanju vmesne natančnosti metode (vpliv različnih dni, analitikov, aparatur)
- c', c'', d', e', f' – pri določanju robustnosti metode
- g' – pri določanju selektivnosti (specifičnosti) metode

a_w v vzorcih smo določali po postopku opisanem v poglavju 3.3.4.2. *Določanje a_w v vzorcu* ter pripravili vzorce po postopku opisanem v poglavju 3.3.4.1. *Priprava vzorcev*. Rezultate smo izrazili kot a_w (originalni izpis naprave) in v odstotkih ravnotežne relativne vlage (ERH).

3.3.5.2. Izvedba validacije

NATANČNOST METODE ZNOTRAJ ENEGA DNEVA (PONOVLJIVOST)

Pripravili smo 6 paralelk vzorca vitaminskih tablet (Vz a'₁ – a'₆), ki smo jih analizirali v enem dnevu. Izračunali smo povprečno a_w v posameznem vzorcu. Izračunali smo RSD povprečne a_w (n = 6) in interval zaupanja povprečnih vsebnosti pri 95 % zanesljivosti (n = 6, $t_{tab} = 2,571$). Kriteriji za natančnost metode znotraj enega dneva so navedeni v preglednici VI.

VMESNA NATANČNOST METODE (vpliv različnih dni, analitikov, aparatur)

Vzorec vitaminskih tablet pripravimo v šestih paralelkah, Vz b'₁ – b'₆. Analizo je izvajal drug tehnik, na drug dan. Izračunali smo povprečno a_w v posameznem vzorcu. Izračunali smo RSD povprečne a_w (n = 6, 12) in interval zaupanja povprečnih vsebnosti pri 95 % zanesljivosti (n = 12, $t_{tab} = 2,201$). Rezultate smo primerjali z natančnostjo metode znotraj enega dneva. Kriteriji za vmesno natančnost metode so navedeni v preglednici VI.

TOČNOST METODE

Točnost metode smo določili za informativne namene s pripravo 4 setov vitaminskih tablet v treh paralelkah, t.j. 12 setov skupaj. Vzorec smo pripravili po postopku opisanem v poglavju 3.3.4.1. *Priprava vzorcev*. Meritev smo izvedli v treh paralelkah. Vzorcem smo pomerili a_w . Točnost smo preverili v območju QL – 120 % specifikacijske meje. Primerjali smo povprečno dobljeno količino (a_w) z dodano količino (RH vrednost eksikatorjev, ki smo jo spremljali s podatkovnimi zapisniki npr. 11, 30, 50, 70 %). Upoštevali smo vse paralelke, izračunali izkoristke (r) v % in izračunali RSD r. Kriteriji za točnost metode so navedeni v preglednici VI.

LINEARNOST METODE = »SORBCIJSKA IZOTERMA«

Linearnost metode smo določili za informativne namene s pripravo 4 setov vitaminskih tablet v treh paralelkah, t.j. 12 setov skupaj. Vzorec smo pripravili po postopku opisanem v poglavju 3.3.4.1. *Priprava vzorcev*. Meritev smo izvedli v treh paralelkah. Vzorcem smo pomerili a_w

(glej rezultate pri točnosti metode). Izračunali smo povprečje vsakega seta. Celotno vsebnost vode v vzorcih smo izmerili s KF titrimetrično metodo v eni paralelki vsakega seta in z metodo IPS v dveh paralelkah vsakega seta.

a) KF: Vzorcem v eksikatorjih smo določili celotno vodo s KF titracijsko metodo. Vodo v vzorcu smo določali po postopku opisanem v poglavju 3.3.1.2. *Določanje vode v vzorcu z uporabo metode*, ki smo jo razvili za te vitaminske tablete (preglednica V - točka 9) ter vzorce pripravili po postopku opisanem v poglavju 3.3.1.3. *Priprava vzorcev*. Rezultate smo predstavili kot % vsebnosti vode.

b) IPS: Vzorcem v eksikatorjih smo določili celotno vodo in možne hlapne substance z analizo IPS po postopku opisanem v poglavju 3.3.4.3. *Določanje vode z analizo IPS v vzorcih*. Z uporabo dobljenih rezultatov za celotno vodo in aktivno vodo smo narisali sorpcijske izoterme:

- i) % vode dobljen s KF metodo v primerjavi z a_w
- ii) % vode (in lahko hlapnih substanc) dobljen z IPS v primerjavi z a_w

Linearnost smo preverili v območju do 120 % specifikacijske meje. Kriteriji za linearnost metode so navedeni v preglednici VI. Linearnost metode je pogojena s principom meritve, zato smo ob uporabi psihrometričnega grafa preverili rezultate dobljene v validacijski študiji.

ROBUSTNOST METODE

Robustnost metode je bila določena s spreminjanjem večih pogojev metode. Vsi vzorci so bili pripravljeni in analizirani v treh paralelkah.

Preučeno je bilo sledeče:

- (i) Variacija v ciklu vzorca (t.j. zaporedne meritve istega vzorca)
- (ii) Variacija v temperaturi pri kateri merimo
- (iii) Variacija v stanju tablet
- (iv) Variacija v napolnjenosti posodice

Izvedba analize in nadaljnje podrobnosti o vsaki spremembi so podani spodaj. Za ovrednotenje rezultatov smo uporabili kriterije za robustnost metode, ki so navedeni v preglednici VI.

VARIACIJA V CIKLU VZORCA (t.j. ZAPOREDNE MERITVE ISTEGA VZORCA)

Po metodi, naj bi bila vsaka analiza vzorca izvedena dokler dobljen rezultat ni stabilen, t.j. a_w za dve meritvi (cikla) vzorca znotraj 0,003. Analizirali smo vzorec v šestih paralelkah, vsakega tako dolgo, da nismo dobili dveh izpisov iz aparature, t.j. dveh zaporednih meritev in izračunali razliko med tema dvema cikloma. Nato smo analizirali vzorec v treh paralelkah tako, da smo dobili tri izpise iz aparature t.j. tri zaporedne meritve ter določili razliko v a_w med cikli. Rezultate smo prikazali v preglednici kot a_w in izračunali razlike med omenjenimi cikli.

VARIACIJA V TEMPERATURI PRI KATERI MERIMO

Dobljena vrednost a_w je veljavna le ob hkratni določitvi T, zato je bil vpliv T pri kateri izvajamo meritve na rezultate ocenjen z analiziranjem vzorcev v treh paralelkah pri različnih T. Meritev smo izvajali pri naslednjih T: 22,5 °C (kot je v navodilih aparature), 15 °C, 20 °C, 25 °C in 30 °C. Meritve smo zbrali v preglednico ter izračunali povprečje, absolutno razliko, RSD in 95 % interval zaupanja.

VARIACIJA V STANJU TABLET

Po AP je zahtevano, da naj bi se za analizo uporabljale cele tablete. V tem eksperimentu je bil ocenjen vpliv stanja tablet na rezultate. Analizirali smo cele, prepolovljene in zdrobljene tablete. Meritve smo zbrali v preglednico ter izračunali povprečje, absolutno razliko, RSD in 95 % interval zaupanja.

VARIACIJA V NAPOLNJENOSTI POSODICE

Da smo lahko izvedli analizo, smo namestili ustrezno količino vitaminskih tablet t.j. toliko, da pokrijemo dno v posodici za vzorec. Analizirali smo vzorce pri katerih smo posodico:

- normalno napolnili, t.j. z tabletami smo napolnili posodico tako, da je bilo prekrito celotno dno le te in uporabili 12 tablet
- napolnili le do polovice tako, da je bila prekrita le polovica dna le te in uporabili 6 tablet
- napolnili do vrha tako, da je bila posodica do vrha napolnjena s tabletami in uporabili 24 tablet

Meritve smo zbrali v preglednico ter izračunali povprečje, absolutno razliko, RSD in 95 % interval zaupanja.

SELEKTIVNOST (SPECIFIČNOST) METODE

Namen tega poskusa je bil, da določimo, če bi prisotnost hlapnih substanc v vzorcu vplivala na določitev vsebnosti a_w v vzorcu. Izbrali smo metanol, ker ima večji parni tlak kot voda. V tem poskusu, sta bili izmerjeni a_w in stopnja vlažnosti vzorca vitaminskih tablet z uporabo instrumenta za a_w (Aqualab) in analizatorja vlage (Testo 635). Najprej smo analizirali čiste vzorce in nato vzorce, ki smo jih obogatili z 10 μ L in 20 μ L metanola – vsak vzorec s po tremi paralelkami (primerna količina metanola je bila pipetirana na vsako tableto, ki smo jo uporabili v analizi). Meritve smo zbrali v preglednico ter izračunali povprečje, absolutno razliko, RSD in 95 % interval zaupanja. Dobljene rezultate obeh instrumentov smo primerjali med seboj.

4. REZULTATI

4.1. DOLOČANJE VODE S KF TITRATORJEM

4.1.1. Razvoj metode

Preglednice X - XIII prikazujejo rezultate poskusov razvoja metode. Ko smo preverili topnost tablet v metanolu, so v hipu razpadle oz. se deloma raztopile, vendar so ostali na dnu ostanki tablet. Po končani titraciji smo preverili tudi pH medija delovne raztopine s pH lističi in kot rezultat dobili vrednost 6. Slika 14 prikazuje potek KF titracij, kjer je prikazan signal v odvisnosti od časa. S temi grafi preverjamo ustrezen potek titracije oz. primerno izbiro metode.

Preglednica X: Rezultati poskusov 1-5. Prikazani so masa zatehtanega vzorca (m), ekstrakcijski čas, premik (*drift*), koncentracija titranta (c), volumen porabe titranta (V), odstotek nominalnega volumna 5 mL birete, čas titracije, rezultat odstotka vode v vzorcu, vsebnost vode v vzorcu (M).

Izmerjeni parametri	Poskus 1	Poskus 2	Poskus 3	Poskus 4	Poskus 5
m (g)	0,49510	0,50092	0,50255	0,50114	0,50431
Ekstrakcijski čas (s)	20	60	300	60	60
Premik (<i>drift</i>) (µg/min)	0,0	3,1	1,6	5,3	8,0
c titranta (mg/ml)	5,36205	5,36205	5,36205	5,36205	5,36205
V porabe titranta (ml)	2,732	2,612	2,465	2,265	2,480
% nom. V birete (%)	54,6	52,2	49,3	45,3	49,6
t titracije (min)	6:27	2:13	1:52	4:10	2:13
Rezultat (%)	2,959	2,793	2,627	2,416	2,629
M (mg)	14,65	13,99	13,20	12,11	13,26

Preglednica XI: Rezultati poskusov 6/1 - 6/3. Prikazani so masa zatehtanega vzorca (m), ekstrakcijski čas, premik (*drift*), koncentracija titranta (c), volumen porabe titranta (V), odstotek nominalnega volumna 5 mL birete, čas titracije, rezultat odstotka vode v vzorcu, vsebnost vode v vzorcu (M) ter RSD vsebnosti vode poskusa 6.

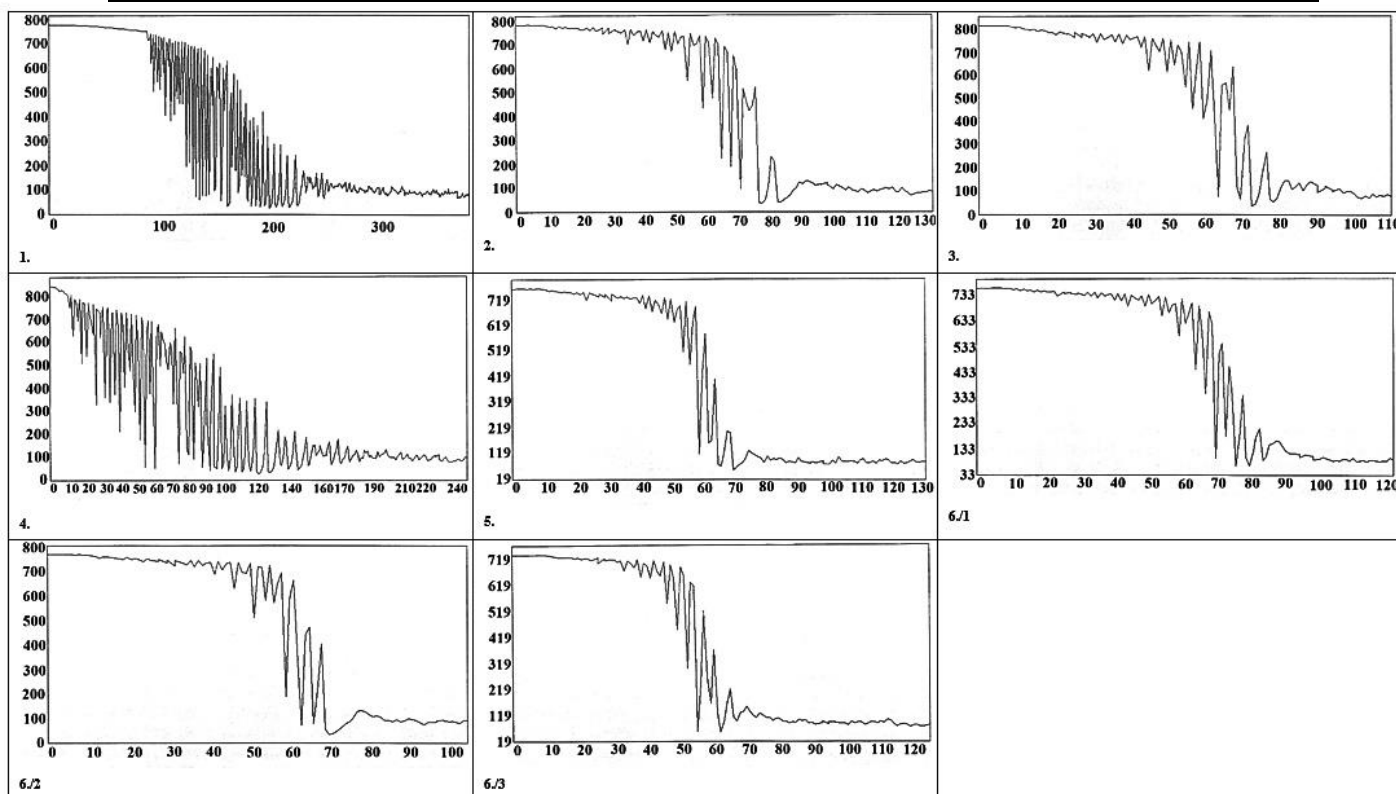
Izmerjeni parametri	Poskus 6/1	Poskus 6/2	Poskus 6/3
m (g)	0,50504	0,49945	0,50263
Ekstrakcijski čas (s)	60	60	60
Premik (<i>drift</i>) (µg/min)	5,3	0,0	5,0
c titranta (mg/ml)	5,36205	5,36205	5,36205
V porabe titranta (ml)	2,951	2,467	2,423
% nom. V birete (%)	59,0	49,3	48,5
t titracije (min)	2:04	1:46	2:07
Rezultat (%)	3,128	2,648	2,579
M (mg)	15,80	13,23	12,96
RSD	10,7 %		

Preglednica XII: Rezultati poskusov 7/1 - 7/3. Prikazani so masa zatehtanega vzorca (m), ekstrakcijski čas, premik (*drift*), koncentracija titranta (c), volumen porabe titranta (V), odstotek nominalnega volumna 5 mL birete, čas titracije, rezultat odstotka vode v vzorcu, vsebnost vode v vzorcu (M) ter RSD vsebnosti vode poskusa 7.

Izmerjeni parametri	Poskus 7/1	Poskus 7/2	Poskus 7/3
m (g)	0,50545	0,50689	0,50137
Ekstrakcijski čas (s)	60	60	60
Premik (<i>drift</i>) (µg/min)	0,0	0,0	0,0
c titranta (mg/ml)	5,37202	5,37202	5,37202
V porabe titranta (ml)	2,918	2,724	2,603
% nom. V birete (%)	58,4	54,5	52,1
t titracije (min)	1:38	1:38	2:22
Rezultat (%)	3,101	2,887	2,789
M (mg)	15,67	14,63	13,98
RSD	5,5 %		

Preglednica XIII: Rezultati poskusov 8/1 - 8/3. Prikazani so masa zatehtanega vzorca (m), ekstrakcijski čas, premik (*drift*), koncentracija titranta (c), volumen porabe titranta (V), odstotek nominalnega volumna 5 mL birete, čas titracije, rezultat odstotka vode v vzorcu, vsebnost vode v vzorcu (M) ter RSD vsebnosti vode poskusa 8.

Izmerjeni parametri	Poskus 8/1	Poskus 8/2	Poskus 8/3
m (g)	0,63027	0,67449	0,47047
Ekstrakcijski čas (s)	60	60	60
Premik (<i>drift</i>) ($\mu\text{g}/\text{min}$)	0,0	0,0	0,0
c titranta (mg/ml)	5,37202	5,37202	5,37202
V porabe titranta (ml)	3,125	3,366	2,405
% nom. V birete (%)	62,5	67,3	48,1
t titracije (min)	2:19	2:10	1:36
Rezultat (%)	2,664	2,680	2,746
M (mg)	16,79	18,08	12,92
RSD	1,61 %		



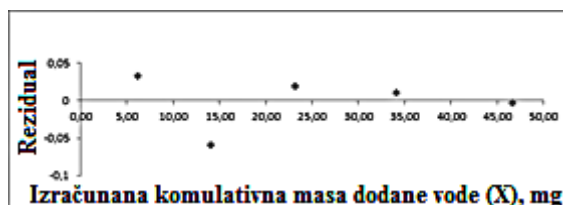
Slika 14: Potek KF titracij, kjer je prikazan signal (y os) v odvisnosti od časa (x os). Signal je podan v mV, čas pa v sekundah. Prikazan je potek titracij poskusov 1-6/3. Na začetku titracije je za vzdrževanje konstantnega I_{pol} potrebna visoka napetost (400 – 650 mV), saj ni prisotnega prostega I_2 . Ko pa vsa voda zreagira z I_2 in je I_2 prisoten, pride do ionske prevodnosti in je za vzdrževanje konstantnega I_{pol} potrebna manjša napetost (50 – 100 mV). Ta vrednost je pogosto že pod končno točko titracije.

4.1.2. Test ustreznosti

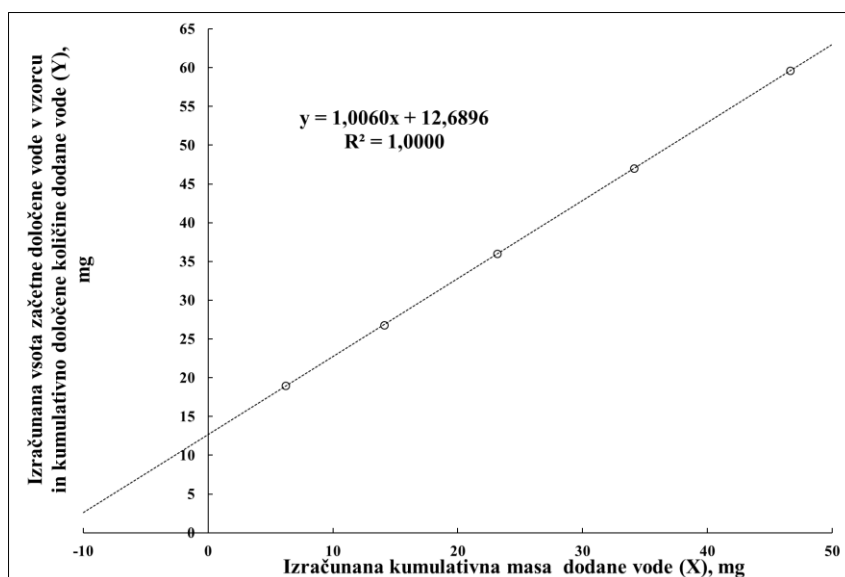
Preglednica XIV prikazuje rezultate TU. Prve ($V_{z\ TU\ OSN}$) in zadnje ($V_{z\ TU6}$) vrstice v preglednici v krivulji ne upoštevamo, saj je v prvi vrstici vnešen vzorec, kateremu smo določili vsebnost vode (M), v zadnji pa vzorec kateremu določimo še vsebnost vode po dodatku vode, ki je ekvivalenten specifikacijski meji za vsebnost vode v vzorcu. Prikazani so tudi parametri regresije. Slika 16 prikazuje regresijsko premico TU, slika 15 pa graf rezidualov pri TU.

Preglednica XIV: Pridobljeni rezultati TU ter parametri regresije; opomba: *izračunana masa dobljene vode v vzorcu BREZ UPOŠTEVANJA PREMIKA (DRIFTA – zunanje vdora vlage (mg)) – pri vseh izvedenih analizah pri TU je bil drift 0,0 µg/min; ** ne upoštevamo pri linearni regresiji;

		$V_Z\ T_{U\ o\ s\ n}$	Masa vzorca (mg)	504,45				
			Začetna določena količina vode v vzorcu, mg (M)	12,5810				
Vzorci oz. dodatki vode	Rezultati vode iz analize (%)	Količina dodane vode, mg (W_1) = masa zatehte vzorca (vode) v mg	Količina določene vode, mg (W_2)*	Izračunana kumulativna masa dodane vode, mg (X)	Izračunana vsota začetno določene vode v vzorcu in kumulativno določene količine dodane vode (Y)		Izkoristek (%)	
$V_Z\ T_{U\ o\ s\ n}^{**}$	2,494	0,00	12,5810	0,00	12,5810		/	
$V_Z\ T_{U1}$	102,887	6,20	6,3790	6,20	18,9600		102,89	
$V_Z\ T_{U2}$	99,438	7,90	7,8556	14,10	26,8156		99,44	
$V_Z\ T_{U3}$	101,470	9,05	9,1830	23,15	35,9986		101,47	
$V_Z\ T_{U4}$	100,515	10,96	11,0164	34,11	47,0150		100,51	
$V_Z\ T_{U5}$	100,497	12,52	12,5822	46,63	59,5972		100,50	
$V_Z\ T_{U6}^{**}$	100,195	12,68	12,7047	59,31	72,3019		100,19	
Odsek na y osi (a)	Naklon (b)	Odsek na x osi (d)	Absolutna vrednost odseka na x osi (d)	Napaka		R	$\bar{r}$ (%) =	100,96
				e1 =	e2 =		SD=	1,30
12,6896	1,0060	- 12,6139	12,6139	0,86	0,26	1,0000	RSD (%)=	1,29



Slika 15: Grafi rezidualov pri TU



Slika 16: Regresijska premica TU

4.1.3. Validacija

NATANČNOST METODE ZNOTRAJ ENEGA DNEVA (PONOVLJIVOST)

V preglednici XV so prikazani rezultati ugotavljanja natančnosti metode znotraj enega dneva.

Preglednica XV: Rezultati ugotavljanja natančnosti metode znotraj enega dneva

Vzorec	% vsebnosti vode v vzorcu
VzA ₁	2,457
VzA ₂	2,489
VzA ₃	2,501
VzA ₄	2,409
VzA ₅	2,407
VzA ₆	2,437
Povprečje (%)	2,45
SD	0,04
RSD (%)	1,63
95 % interval zaupanja: n = 6, t_{tab} (0,05, n-1) = 2,571	2,35 – 2,55

VMESNA NATANČNOST (vpliv različnih dni, analitikov, aparatur)

V preglednici XVI so prikazani rezultati ugotavljanja vmesne natančnosti ter primerjava s ponovljivostjo metode.

Preglednica XVI: Rezultati ugotavljanja vmesne natančnosti (VzB) ter primerjava s ponovljivostjo metode (VzA)

Paralelke	% vsebnosti vode v vzorcu	
	VzA	VzB
1	2,457	2,662
2	2,489	2,667
3	2,501	2,506
4	2,409	2,515
5	2,407	2,551
6	2,437	2,579
Povprečje (%)	2,45	2,58
SD	0,04	0,07
RSD (%)	1,63	2,71
Absolutna razlika (%)	0,13	
Skupno povprečje (%)	2,52	
SD	0,09	
RSD (%)	3,46	
95 % interval zaupanja: n = 12, t_{tab} (0,05, n-1) = 2,201	2,32 - 2,71	

V preglednici XVII so prikazani rezultati meritev vzorcev za natančnost metode iz 1. in 2. dneva (n = 12) za vsebnost vode v vzorcu, mase nateht vzorca in poraba KF reagenta v mL ter iz teh podatkov izračunano povprečje, SD in RSD.

Preglednica XVII: Prikaz rezultatov vsebnosti vode v vzorcih, mase nateht vzorcev ter volumen porabe titranta iz meritev vzorcev za natančnost metode iz 1. (VzA) in 2. (VzB) dneva (n = 12) ter njihovi izračuni povprečja, SD in RSD.

Paralelke	Vsebnost vode v vzorcu, %		Masa zatehte vzorca, mg		Poraba titranta, ml	
	VzA	VzB	VzA	VzB	VzA	VzB
1	2,457	2,662	500,55	504,03	2,322	2,540
2	2,489	2,667	506,95	498,68	2,383	2,518
3	2,501	2,506	499,68	498,06	2,360	2,367
4	2,409	2,515	502,38	506,58	2,286	2,412
5	2,407	2,551	503,44	507,12	2,288	2,449
6	2,437	2,579	502,53	505,75	2,313	2,469
Povprečje (n = 12)	2,52		502,98		2,392	
SD	0,09		3,23		0,09	
RSD (%)	3,46		0,64		3,62	

TOČNOST METODE

V preglednici XVIII so prikazani rezultati ugotavljanja točnosti metode.

Preglednica XVIII: Rezultati ugotavljanja točnosti metode; * izračunano iz zatehtanih vrednostih vodnega standarda;

DV – dodana voda v mg; I – izmerjena voda v %; D – dodana voda v %, r – izkoristek.

Paralelka 1				Paralelka 2				Paralelka 3				$\bar{r}$ (n = 3)	RSD (n = 3)
DV mg*	I %	D %	r %	DV mg*	I %	D %	r %	DV mg*	I %	D %	r %		
2,06	0,464	0,412	112,62	2,08	0,422	0,406	103,94	2,02	0,442	0,398	111,06	109,21	4,24
12,82	2,374	2,545	93,28	13,13	2,535	2,634	96,24	13,01	2,513	2,566	97,93	95,82	2,45
22,66	4,417	4,505	98,05	22,68	4,421	4,494	98,38	22,56	4,338	4,432	97,88	98,10	0,25
27,42	5,294	5,388	98,26	27,46	5,411	5,484	98,67	27,29	5,356	5,409	99,02	98,65	0,39
Povprečje (n = 4)				Povprečje (n = 4)				Povprečje (n = 4)				Celotno povprečje (n = 12)	
r _{povprečje} (%)			100,55	r _{povprečje} (%)			99,31	r _{povprečje} (%)			101,47	$\bar{r}_{\text{celotno}}$ (%)	100,44
SD			8,37	SD			3,27	SD			6,41	SD	5,84
RSD (%)			8,32	RSD (%)			3,29	RSD (%)			6,32	RSD (%)	5,81
95 % interval zaupanja: n = 3, t _{tab} (0,05, n-1) = 4,303													
ca. 2 mg ≈ 0,4 %				ca. 13 mg ≈ 2,6 %				ca. 23 mg ≈ 4,5 %				ca. 27 mg ≈ 5,4 %	
X – (t x s)		89,29		X – (t x s)		85,71		X – (t x s)		97,02		X – (t x s) 97,01	
X + (t x s)		129,13		X + (t x s)		105,93		X + (t x s)		99,18		X + (t x s) 100,29	

LINEARNOST

V preglednici XIX so prikazani rezultati ugotavljanja linearnosti metode.

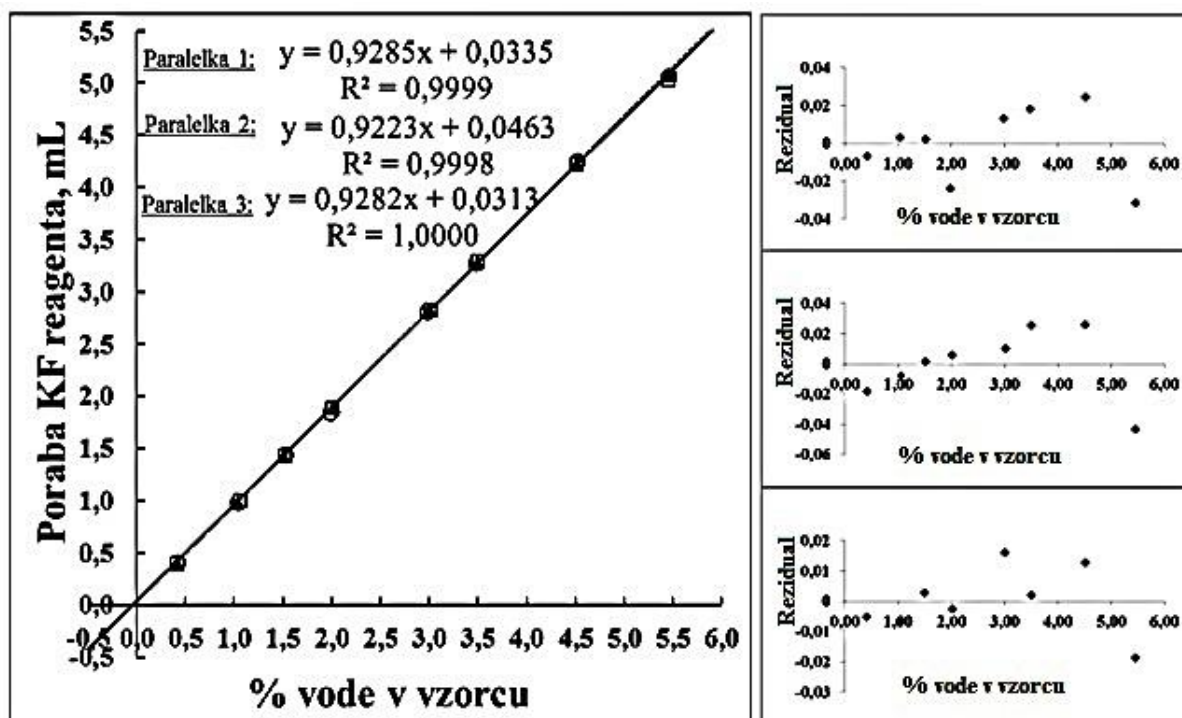
Preglednica XIX: Rezultati ugotavljanja linearnosti metode in rezultati izračuna regresijske premice; * izračunano iz zatehtanih vrednostih vodnega standarda; se nadaljuje na naslednji strani.

Paralelka 1			Paralelka 2			Paralelka 3			RSDporabe KF reagent po območjih (n=3), %
Masa dodane vode (mg)*	% vode glede na povprečno m _{vz}	Poraba KF reagenta, mL	Masa dodane vode (mg)*	% vode glede na povprečno m _{vz}	Poraba KF reagenta, mL	Masa dodane vode (mg)*	% vode glede na povprečno m _{vz}	Poraba KF reagenta, mL	
2,11	0,42	0,417	2,05	0,41	0,406	2,08	0,41	0,407	1,44
5,20	1,03	0,993	5,29	1,05	1,007	5,17	1,03	0,980	1,35
7,65	1,52	1,447	7,62	1,51	1,441	7,56	1,50	1,426	0,74
9,98	1,98	1,848	10,05	2,00	1,897	10,15	2,02	1,904	1,60
15,00	2,98	2,814	15,16	3,01	2,833	15,11	3,00	2,832	0,38
17,52	3,48	3,283	17,62	3,50	3,300	17,59	3,50	3,282	0,30
22,74	4,52	4,255	22,70	4,51	4,232	22,70	4,51	4,230	0,32
27,45	5,46	5,072	27,40	5,45	5,030	27,46	5,46	5,081	0,54

Preglednica XIX: Rezultati ugotavljanja linearnosti metode in rezultati izračuna regresijske premice;

Statistika			
Paralelke	1	2	3
R	0,9999	0,9999	1,0000
% odseka na y osi	1,40	1,94	1,31
Naklon	0,9285	0,9223	0,9282
Odsek na y osi	0,0335	0,0463	0,0313

Na sliki 17 so prikazane regresijske premice vseh treh paralelk, ter njihovi grafi rezidualov (od zgoraj navzdol so paralelke 1-3).



Slika 17: Regresijske premice vseh treh paralelk – levo in grafi rezidualov za vse tri regresijske premice (od zgoraj navzdol so paralelke 1-3) – desno

ROBUSTNOST METODE

V preglednici XX so prikazani rezultati ugotavljanja robustnosti metode s spremembo zatehte vzorca.

Preglednica XX: Rezultati ugotavljanja robustnosti metode s spremembo zatehte vzorca

Vzorci	% vsebnosti vode v vzorcu	
	100 %	
VzA ₁	2,457	
VzA ₂	2,489	
VzA ₃	2,501	
VzA ₄	2,409	
VzA ₅	2,407	
VzA ₆	2,437	
Povprečje (%)	2,45	
SD	0,04	
RSD (%)	1,63	
	50 %	150 %
VzC ₁ in C ₁ '	2,459	2,426
VzC ₂ in C ₂ '	2,491	2,446
VzC ₃ in C ₃ '	2,492	2,464
Povprečje (%)	2,48	2,45
SD	0,02	0,02
RSD (%)	0,77	0,78
Absolutna razlika (%)	0,031	0,005
Celotno povprečje (%)	2,46	2,45
SD	0,04	0,03
RSD (%)	1,46	1,35
95 % interval zaupanja: n = 9, t _{tab} (0,05, n-1) = 2,306	2,38 - 2,54	2,37 - 2,52

4.2. DOLOČANJE a_w

NATANČNOSTI METODE ZNOTRAJ ENEGA DNEVA (PONOVLJIVOST)

V preglednici XXI so prikazani rezultati ugotavljanja natančnosti metode znotraj enega dneva.

Preglednica XXI: Rezultati ugotavljanja natančnost metode znotraj enega dneva

Ponovitve	a _w - original	ERH, %
Vz a' ₁	0,0740	7,40
Vz a' ₂	0,0709	7,09
Vz a' ₃	0,0712	7,12
Vz a' ₄	0,0743	7,43
Vz a' ₅	0,0781	7,81
Vz a' ₆	0,0688	6,88
Povprečje (n = 6), (brez enote / %)	0,0729	7,29
SD (n = 6)	0,0033	0,33
RSD (n = 6), (%)	4,53	4,53
95 % interval zaupanja: n = 6, t _{tab} (0,05, n-1) = 2,571	0,0644 - 0,0814	6,44 - 8,14

VMESNA NATANČNOST (vpliv različnih dni, analitikov, aparatur)

V preglednici XXII so prikazani rezultati ugotavljanja vmesne natančnosti metode ter primerjava s ponovljivostjo metode.

Preglednica XXII: Rezultati ugotavljanja vmesne natančnosti metode ter primerjava s ponovljivostjo metode; *meritev zunaj 95 % intervala zaupanja, ampak znotraj 99 % intervala zaupanja.

Ponovitve	a_w - original		ERH, %	
	Vz a'	Vz b'	Vz a'	Vz b'
1	0,0740	0,0672	7,40	6,72
2	0,0709	0,0713	7,09	7,13
3	0,0712	0,0675	7,12	6,75
4	0,0743	0,0688	7,43	6,88
5	0,0781*	0,0699	7,81*	6,99
6	0,0688	0,0686	6,88	6,86
Povprečje (n = 6), (brez enote / %)	0,0729	0,0689	7,29	6,89
SD (n = 6)	0,0033	0,0015	0,33	0,15
RSD (n = 6), (%)	4,53	2,18	4,53	2,18
Celotno				
Celotno povprečje (n = 12), (brez enote / %)	0,0709		7,09	
SD (n = 12)	0,0032		0,32	
RSD (n = 12), (%)	4,51		4,51	
Absolutna razlika (%)	0,0040		0,40	
95 % interval zaupanja: n = 12, $t_{tab}(0,05, n-1) = 2,201$	0,0639 - 0,0779		6,39 - 7,79	
99 % interval zaupanja: n = 12, $t_{tab}(0,01, n-1) = 3,106$	0,0610 - 0,0808		6,10 - 8,08	

TOČNOST METODE

Točnost metode smo izrazili v odstotkih kot tudi r med ravnotežno relativno vlažnostjo v tabletah (ERH) izmerjeno z Aqualab inštrumentom (t.j. Aqualab rezultati za $a_w \times 100$) in RH v eksikatorjih (Eks) izmerjeno s podatkovnimi zapisniki. V preglednici XXIII so prikazani rezultati ugotavljanja točnosti metode.

Preglednica XXIII: Rezultati ugotavljanja točnosti metode; nadaljuje se na naslednji strani.

LiCl: Teoretično: 11 %				MgCl ₂ : Teoretično: 30 %			
a _w	ERH, %	Eks, %	r, %*	a _w	ERH, %	Eks, %	r, %*
0,1267	12,67	15,25	83,08	0,3303	33,03	37,20	88,79
0,1274	12,74	15,25	83,54	0,3316	33,16	37,20	89,14
0,1255	12,55	15,25	82,30	0,3301	33,01	37,20	88,74
Povprečje (n=3)							
r _{povprečni} (%)			82,97	r _{povprečni} (%)			88,89
SD			0,63	SD			0,22
RSD (%)			0,76	RSD (%)			0,25
95 % interval zaupanja: n=3, t _{tab} (0,05, n-1) = 4,303							
X – (t x s)			80,26	X – (t x s)			87,94
X + (t x s)			85,68	X + (t x s)			89,84
NaBr: Teoretično: 50 %				KI: Teoretično: 70 %			
a _w	ERH, %	Eks, %	r, %*	a _w	ERH, %	Eks, %	r, %*
0,5752	57,52	60,06	95,77	0,6852	68,52	67,52	101,48
0,5763	57,63	60,06	95,95	0,6856	68,56	67,52	101,54
0,5775	57,75	60,06	96,15	0,6877	68,77	67,52	101,85

Preglednica XXIII: Rezultati ugotavljanja točnosti metode

Povprečje (n=3)			
$r_{\text{povprečni}} (\%)$	95,96	$r_{\text{povprečni}} (\%)$	101,62
SD	0,19	SD	0,20
RSD (%)	0,20	RSD (%)	0,20
95 % interval zaupanja: $n=3$, $t_{\text{tab}}(0,05, n-1) = 4,303$			
$X - (t \times s)$	95,14	$X - (t \times s)$	100,76
$X + (t \times s)$	96,78	$X + (t \times s)$	102,48

Celotno povprečje, n = 12	
$r_{\text{povprečni}} (\%)$	92,36
SD	7,37
RSD (%)	7,98

LINEARNOST METODE

Po enem tednu, smo vzorcem, ki so bili nastavljeni v eksikatorjih na ustreznih pogojih, pomerili a_w . Meritve, ki smo jih dobili so podane v zgornji preglednici XXIII pri točnosti. Izračunali smo povprečje vsakega seta in jih vnesli v spodnjo preglednico XXIV. V spodnjo preglednico XXIV smo vnesli tudi rezultate KF in povprečje dveh paralelk pridobljenega iz analize IPS.

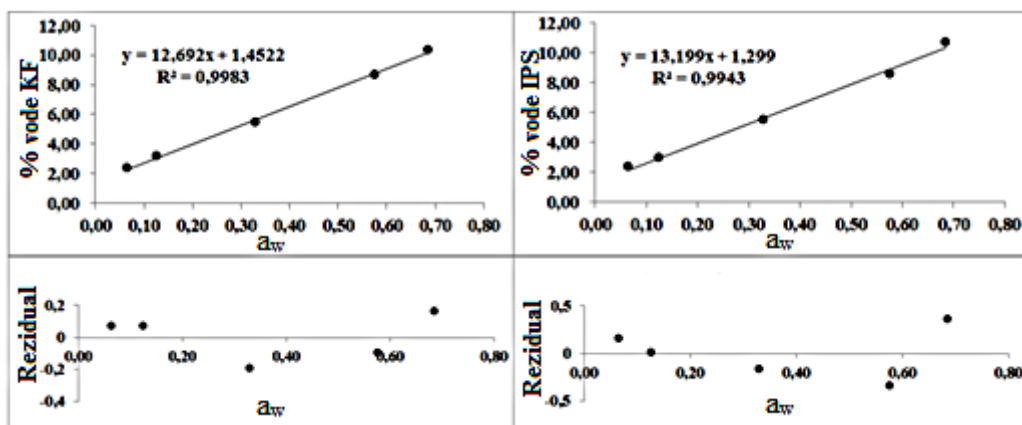
Z uporabo dobljenih rezultatov za celotno vodo in aktivno vodo smo narisali (slika 18) linearni del sorpcijske izoterme:

- % vode dobljen s KF metodo v primerjavi z a_w
- % vode (in lahko hlapnih substanc) dobljen z IPS v primerjavi z a_w

Preglednica XXIV: Rezultati ugotavljanja linearosti metode. Prikazane so povprečne vrednosti a_w čistega vzorca ter povprečne vrednosti a_w iz preglednice XXIII, izmerjene vrednosti vsebnosti vode po KF in IPS. V spodnjem delu so prikazani rezultati izračuna regresijskih premic. Opomba: V tej preglednici vidimo, da so bili rezultati za KF in IPS metodo zelo podobni, kar dokazuje da vitaminske tablete ne vsebujejo nobene lahko hlapne substance razen H_2O .

Analiza	Čist vzorec	"Dodana" vlaga			
		LiCl 11 %	MgCl ₂ 30 %	NaBr 50 %	KI 70 %
$a_w (n = 3)$	0,0657	0,1265	0,3307	0,5763	0,6862
% vode (KF)	2,35	3,12	5,46	8,67	10,32
% vode (IPS)	2,32	2,97	5,50	8,56	10,71
Statistika					
Parameter	KF izoterma		IPS izoterma		
R	0,9992		0,9971		
Naklon	12,6924		13,1986		
Odsek na y osi	1,4522		1,2990		

Na sliki 18 so prikazane regresijske premice, dobljene v validacijski študiji (linearni del sorpcijske izoterme vlage), ter njuni grafi rezidualov.



Slika 18: Sorpcijska izoterma vlage za določitev vode s KF v primerjavi z a_w ter pripadajoči grafi rezidualov – levo; sorpcijska izoterma vlage za določitev vode z IPS v primerjavi z a_w ter pripadajoči grafi rezidualov – desno.

ROBUSTNOST METODE

Pri preverjanju robustnosti metode smo dobili rezultate za naslednje preučevane sklope:

- (i) Variacija v ciklu vzorca (t.j. zaporedne meritve istega vzorca)

V preglednici XXV so prikazani rezultati ugotavljanja vpliva variacije cikla vzorca na rezultat.

Preglednica XXV: Rezultati ugotavljanja robustnosti metode: vpliv spremembe cikla vzorca na rezultat (2 cikla)

Ponovitve	a_w		
	Cikel 1	Cikel 2	Razlika
c' ₁	0,0768	0,0740	- 0,0028
c' ₂	0,0731	0,0709	- 0,0022
c' ₃	0,0733	0,0712	- 0,0021
c' ₄	0,0769	0,0743	- 0,0026
c' ₅	0,0804	0,0781	- 0,0023
c' ₆	0,0707	0,0688	- 0,0019

Po tej metodi smo nadaljevali z analizo vzorca v treh paralelkah, ki smo jo izvedli v treh ciklih.

Rezultati so navedeni v preglednici XXVI.

Preglednica XXVI: Rezultati ugotavljanja robustnosti metode: vpliv spremembe cikla vzorca na rezultat (3 cikli)

Ponovitve	a_w		
	c ₁ ''	c ₂ ''	c ₃ ''
Cikel 1	0,0763	0,0801	0,0813
Cikel 2	0,0746	0,0780	0,0790
Cikel 3	0,0738	0,0769	0,0778
Razlike			
Cikel 2 minus Cikel 1	- 0,0017	- 0,0021	- 0,0023
Cikel 3 minus Cikel 2	- 0,0008	- 0,0011	- 0,0012
Cikel 3 minus Cikel 1	- 0,0025	- 0,0032*	- 0,0035*

(ii) Variacija v temperaturi pri kateri merimo

V preglednici XXVII so prikazani rezultati ugotavljanja vpliva T vzorca na meritev. Meritve je instrument sam temperaturno kompenziral.

Preglednica XXVII: Rezultati ugotavljanja robustnosti metode: vpliv spremembe v T vzorca; *Glede na navodila naprave

Ponovitve	a _w				
	22,5 °C*	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C
d' ₁	0,0693	0,0621	0,0654	0,0707	0,0776
d' ₂	0,0650	0,0618	0,0641	0,0719	0,0745
d' ₃	0,0652	0,0630	0,0644	0,0710	0,0748
Povprečje	0,0665	0,0623	0,0646	0,0712	0,0756
Absolutna razlika		0,0042	0,0019	0,0047	0,0091
Ponovitve	ERH, %				
	22,5 °C*	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C
d' ₁	6,93	6,21	6,54	7,07	7,76
d' ₂	6,50	6,18	6,41	7,19	7,45
d' ₃	6,52	6,30	6,44	7,10	7,48
Povprečje (%)	6,65	6,23	6,46	7,12	7,56
SD	0,24	0,06	0,07	0,06	0,17
RSD (%)	3,61	0,96	1,08	0,84	2,25
Absolutna razlika (%)		0,42	0,19	0,47	0,91
Skupne vrednosti					
Skupno povprečje (%)		6,44	6,56	6,89	7,11
SD		0,28	0,19	0,30	0,53
RSD (%)		4,35	2,90	4,35	7,45
95 % interval zaupanja: n = 6, t_{tab} (0,05, n-1) = 2,571		5,72 – 7,16	6,07 – 7,05	6,12 – 7,66	5,75 – 8,47

(iii) Variacija v stanju tablet

V preglednici XXVIII so prikazani rezultati ugotavljanja vpliva stanja tablet.

Preglednica XXVIII: Rezultati ugotavljanja robustnosti metode: vpliv spremembe stanja tablet; *Glede na AP;

**** zunaj kriterija.**

Ponovitve	Vodna aktivnost		
	Cele tablete*	Zdrobljene tablete	Prepolovljene tablete
e' ₁	0,0725	0,1141	0,0931
e' ₂	0,0770	0,1185	0,0922
e' ₃	0,0788	0,1093	0,0844
Ponovitve	ERH, %		
	Cele tablete*	Zdrobljene tablete	Prepolovljene tablete
e' ₁	7,25	11,41	9,31
e' ₂	7,70	11,85	9,22
e' ₃	7,88	10,93	8,44
Povprečje (%)	7,61	11,40	8,99
SD	0,32	0,46	0,48
RSD (%)	4,20	4,04	5,34
Absolutna razlika (%)		3,79**	1,38**
		Skupaj (n = 6)	
Skupno povprečje (%)		9,50	8,30
SD		2,10	0,84
RSD (%)		22,11**	10,12
95 % interval zaupanja: n = 6, t_{tab} (0,05, n-1) = 2,571		4,10 – 14,90	6,14 – 10,46

(iv) Variacija v napolnjenosti posodice

V preglednici XXIX so prikazani rezultati ugotavljanja vpliva napolnjenosti posodice za vzorec.

Preglednica XXIX: Rezultati ugotavljanja robustnosti metode: vpliv spremembe v napolnjenosti posodice; * Glede na AP; se nadaljuje na naslednji strani;

Ponovitve	Vodna aktivnost		
	Normalno napolnjena*	Pol-napolnjena	Napolnjena do vrha
f' ₁	0,0725	0,0763	0,0795
f' ₂	0,0770	0,0715	0,0774
f' ₃	0,0788	0,0660	0,0838
Ponovitve	ERH, %		
	Normalno napolnjena*	Pol-napolnjena	Napolnjena do vrha
f' ₁	7,25	7,63	7,95
f' ₂	7,70	7,15	7,74
f' ₃	7,88	6,60	8,38

Preglednica XXIX: Rezultati ugotavljanja robustnosti metode: vpliv spremembe v napolnjenosti posodice; * Glede na AP

Povprečje (%)	7,61	7,13	8,02
SD	0,32	0,52	0,33
RSD (%)	4,20	7,29	4,11
Absolutna razlika (%)		0,48	0,41
	Skupaj		
Skupno povprečje (%)	7,37	7,82	
SD	0,47	0,37	
RSD (%)	6,38	4,73	
95 % interval zaupanja: n = 6, t _{tab} (0,05, n-1) = 2,571	6,16 - 8,58	6,87 - 8,77	

SELEKTIVNOST (SPECIFIČNOST) METODE

V preglednici XXX so prikazani rezultati ugotavljanja selektivnosti metode.

Preglednica XXX: Rezultati ugotavljanja selektivnosti metode; *informativno

Ponovitve	Aqualab		Testo	Aqualab		Testo	Aqualab		Testo
	a _w	ERH, %	H, %	a _w	ERH, %	H, %	a _w	ERH, %	H, %
	Čisti vzorec			10 µL metanola			20 µL metanola		
g' ₁	0,0680	6,80	5,50	0,2395	23,95	57,70	0,4188	41,88	80,20
g' ₂	0,0670	6,70	5,60	0,2333	23,33	57,50	0,4348	43,48	82,90
g' ₃	0,0664	6,64	5,60	0,2163	21,63	55,70	0,4581	45,81	84,40
Povprečje (%)*		6,71	5,57		22,97	56,97		43,72	82,50
SD*		0,08	0,06		1,20	1,10		1,98	2,13
RSD (%)*		1,19	1,08		5,22	1,93		4,53	2,58
Absolutna razlika (%)*		1,14			34,00			38,78	
Skupno povprečje (%)*		6,14			39,97			63,11	
SD*		0,63			18,65			21,32	
RSD (%)*		10,26			46,66			33,78	
95 % interval zaupanja: n = 6, t _{tab} (0,05, n-1) = 2,571		4,52 – 7,76			-7,98 – 87,92			8,30 – 117,92	

5. RAZPRAVA

5.1. DOLOČANJE VODE S KF TITRATORJEM

5.1.1. Razvoj metode

Za 1. poskus smo izbrali parametre opisane v poglavju 3.3.2.1. *Ključne odločitve pri razvoju metode* (preglednica V). Ugotovili smo, da je bil titrant Hydranal Composite 5 ustrezen, zaradi ustreznega % vode v vzorcu, ki je znašal 2,96 % t.j. med 1000 ppm – 100 % in ga nismo spreminjali. Zaradi zelo dolgega časa titracije smo sklepali, da topnost ni ustrezna, zato smo se odločili, da bomo topilu dodali 50 % formamida. Predvidevali smo, da bo to najverjetneje vplivalo na obliko titrationske krivulje (slika 14/1), ki je bila v tem primeru zelo nihajoča. Sklepali smo, da je prišlo do postopne in počasne ekstrakcije vode iz vzorca. Posledično je titracija potekala v takšnem ritmu kot se je sproščala voda iz vzorca t.j. nihajočem. Na takšno nihajočo obliko krivulje smo lahko sklepali tudi zaradi prekratkega ekstrakcijskega časa, zato smo povečali ekstrakcijski čas na 60 s. Zatehta vzorca 500 mg je bila glede na porabo titranta primerna. Volumen porabe titranta je znašal 2,732 mL t.j. 54,6 % nominalnega volumna birete, kar je med 30 in 70 % nominalnega volumna birete. Optimalna vsebnost vode v vzorcu znaša 10 mg, v našem vzorcu je izračunana vsebnost vode v vzorcu znašala 14,65 mg. Takšno zatehto vzorca smo lahko pustili, saj z večjo maso vzorca zmanjšamo možnost napak zaradi adsorbcije vlage pri pripravi in dodajanju vzorca.

Pri 2. poskusu smo opazili, da se je čas titracije zelo skrajšal in sicer s 6:27 min na 2:13 min, kar pomeni da smo uspeli izboljšati topnost vzorca z dodatkom formamida. Na izboljšanje topnosti smo lahko sklepali tudi zaradi lepše oblike krivulje (slika 14/2), zato smo ohranili takšno sestavo topila, s predpostavko, da je k temu lahko prispeval tudi podaljšan ekstrakcijski čas. Da smo ugotovili, če ima čas mešanja pred titracijo mogoče še kakšen vpliv, smo podaljšali ekstrakcijski čas na 300 s.

Pri 3. poskusu smo iz slike 14/3 videli, da ni bistvene spremembe od 2. poskusa. Opazili smo, da se je čas titracije še nekoliko skrajšal, z 2:13 min na 1:52 min, kar pomeni da ima ekstrakcijski čas prav tako določen oz. celoten vpliv na hitrost titracije kot mogoče tudi na obliko krivulje. Pri ekstrakcijskem času 300 s smo videli, da ni bilo signifikantnih sprememb v primerjavi s poskusom 2, zato smo se odločili pustiti čas 60 s, saj smo s tem le podaljšali čas celotne titracije. V poskusu 4 smo vpliv le ekstrakcijskega časa preverili s ponovno uporabo metanola, kot topila.

Pri 4. poskusu smo iz slike 14/4 videli, da smo ponovno dobili nihajočo obliko krivulje. Dokončno smo lahko določili ustrezne parametre analize. Glede na 2. poskus smo pri poskusu

4 spremenili le topilo. Videli smo lahko, da se je čas titracije glede na 2. poskus, kjer smo prav tako uporabili ekstrakcijski čas 60 s, podaljšal in sicer na 4:10 min in videli smo, da z dodatkom formamida dejansko izboljšamo topnost vzorca. Posledično smo lahko potrdili dvom iz 1. poskusa, in sicer, da je metanol ta, ki vpliva na nihajočo obliko krivulje zaradi nihajočega ritma sproščanja vode iz vzorca. Ekstrakcijski čas je imel prav tako vpliv na titracijo, saj je bila titracija hitrejša kot pri 1. poskusu, kjer je čas titracije znašal 6:27 min, sedaj v 4. poskusu pa 4:10 min, vendar je imelo glavni vpliv na hitrost titracije in obliko krivulje ter ustrezno topnost vzorca topilo. Tudi, ko smo preverjali, če se tablete v čaši z metanolom raztopijo, so na dnu ostali ostanki tablet.

Iz slike 14/5 pri 5. poskusu smo videli, da je oblika krivulje ustrezna. Pri tem poskusu smo uporabili najboljše parametre iz poskusov 1-4, ter se prepričali, da je izbrana metoda ustrezna. Iz slike 14: 6/1 - 6/3 pri 6. poskusu smo videli, da so bile krivulje ustrezne vendar so bila še opažena majhna nihanja. Pri 6. poskusu smo opazili nekaj nihanj tudi v rezultatu vsebnosti vode med tremi analiziranimi paralelkami. RSD rezultatov je znašal 10,7 % kar je kazalo na pomanjkljivost metode, saj je v TU zahtevan RSD r znotraj 10 %. Pomerili smo še tri paralelke vzorca s čim hitrejšim trenjem in tehtanjem vzorcev, da bi dobili bolj enotne rezultate.

Po preverjanju optimalne metode, smo po končani titraciji določili tudi pH medija s pH lističi in izmerili vrednost 6. Izmerjen pH je bil ustrezen, saj je optimalno pH območje med 5,5 in 7. Na ta način smo se izognili poteku stranskih reakcij, pri katerih bi se porabljal jod in vodil v preprečitev končne točke, ki bi potekale pri višjih pH vrednostih, hkrati pa prepočasnim titracijam pri nižjih pH vrednostih, zaradi znižanja KF konstante.

Pri 7. poskusu so rezultati že manj nihali. RSD znotraj treh paralelk vzorca je znašal 5,5 % kar je bilo še zmeraj preveliko, zato smo se odločili, da bi bilo najbolje spremeniti pripravo vzorca, kot je opisana v poglavju 3.3.1.3. *Priprava vzorcev*, kjer je priprava vzorca razložena za vsak poskus posebej. Namreč, ko smo strli le 4 tablete za zatehto posameznega vzorca, je bila masa majhna in je bil posledično vpliv vlage, ki jo je vzorec tekom priprave pridobil, večji. Z večjo maso tabletnega prahu za tehtanje smo dosegli večjo homogenost/enotnost vzorca in tako zmanjšali vpliv zračne vlage ter posledično nihanja v RSD-ju. Do neke mere smo to lahko rešili s hitrejšim trenjem in tehtanjem, a vseeno smo se na koncu odločili za trenje večjega števila tablet. Pomerili smo še tri paralelke vzorca po spremenjeni pripravi vzorca.

Pri 8. poskusu smo dobili ustrezne rezultate. RSD znotraj treh paralelk je znašal 1,61 %, kar je posledica povečane tabletne mase pri pripravi vzorca in zmanjšane vpliva vlage. To je bilo dovolj dobro, da smo prešli na TU, kajti tam je zahtevan RSD znotraj 10 %. S spremembo priprave vzorca smo zagotovili ustreznost postavljene metode. Preverili smo tudi odziv sistema

na različne zatehte vzorca ($500 \pm X$ mg) t.j. na različne količine vode in dobili ustrezne rezultate, kar pomeni, da smo bili pripravljeni potrditi postavljeno metodo s TU po Ph. Eur. 8.0. Tekom osmih poskusov nam je uspelo dokončno postaviti ustrezno metodo, ki je predstavljena pod točko 9 v preglednici V.

5.1.2. Test ustreznosti

Z izvedenim TU smo želeli potrditi primernost razvite metode za določevanje vode v vzorcu s pomočjo KF titracijskega sistema. Najprej smo, kot navaja postopek dela, ki je opisan v poglavju 3.3.2.4. *Izvedba testa ustreznosti*, analizirali vzorec ($V_{z\ TU\ osn}$). Po postavljeni metodi (preglednica V - točka 9) smo mu določili vsebnost vode, ki je znašala 2,49 % oz. 12,5810 mg. Temu vzorcu še nismo dodajali vode, zato sta spremenljivki W_1 in X v preglednici XIV enaki 0, prav tako nismo mogli določiti r izmerjenega vzorca, saj nismo poznali dejanske vrednosti vode v tem vzorcu. Zatehte šestih dodatkov vode, ki smo jih analizirali, so podane v preglednici XIV kot W_1 in so bile, kot je bilo zahtevano, v območju od 50 – 100 % t.j. 6,2905 mg – 12,5810 mg glede na vsebnost vode vzorca t.j. 12,5810 mg. $V_{z\ TU6}$ je bil vzorec z dodatkom vode, ki je bil ekvivalenten specifikacijski meji za vsebnost vode v vzorcu t.j. $\leq 2,5$ % oz. približno 12,6113 mg vode. S pomočjo rezultatov analize smo dobili vrednosti določene vode v vzorcih (enačba 7), ter določili posamezne r (enačba 6). Izračunali smo $\bar{r}$, ki je znašal 100,96 %, kar je bilo znotraj zahtevanega intervala 97,5 – 102,5 %. Določili smo tudi RSD r , ki je znašal 1,29 % in je ustrezal zahtevam ≤ 10 %. To pomeni, da je sistem reagent/topilo ustrezen.

Z linearno regresijo smo izračunali naklon premice (b), ki je znašal 1,0060 in je bil znotraj intervala 0,975 – 1,025. Izračunali smo tudi presečišče z osjo Y (a), ter presečišče ekstrapolirane kalibracijske linije z osjo X (d) oz. njeno absolutno vrednost. S pomočjo teh dveh parametrov smo izračunali % napake (enačba 9), ki sta znašala 0,86 in 0,26 in ustrezata zahtevanim vrednostim, ki je $\leq 2,5$ %. Iz rezultata pri regresijski premici za R , ki je znašal 1,0000 smo prav tako lahko videli, da metoda za izveden sistem daje linearne rezultate. Z dobljenimi rezultati smo lahko potrdili ustreznost sistema. Postavljena metoda je ustrezna in lahko smo začeli z validacijo metode.

5.1.3. Validacija

NATANČNOST METODE ZNOTRAJ ENEGA DNEVA (PONOVLJIVOST)

Iz dobljenih rezultatov analize, smo izračunali povprečno vsebnost vode v vzorcu, ki je znašala 2,45 % ter RSD, ki je znašal 1,63 % kar je ustrezalo zahtevanemu kriteriju ≤ 10 %. Prav tako smo izračunali 95 % interval zaupanja s pomočjo izračuna SD in vrednosti t_{tab} , ki je znašal: 2,35 – 2,55 %. Ugotovili smo, da so vse meritve znotraj omenjenega intervala. Zaključimo lahko, da je metoda, glede na kriterije za ponovljivost, natančna.

VMESNA NATANČNOST METODE (vpliv različnih dni, analitikov, aparatur)

To karakteristiko smo preučevali na drug dan kot natančnost metode znotraj enega dneva. Vključevala je rigidnosti metode, kjer je analizo izvajal drug tehnik na drugem KF sistemu. Izračunali smo povprečno vsebnost vode v vzorcu, ki je znašala 2,58 % ter RSD, ki je znašal 2,71 %, kar je ustrezalo zahtevanemu kriteriju ≤ 10 %. Te dobljene rezultate smo nato primerjali z natančnostjo metode znotraj enega dneva, izračunali absolutno razliko, ki je znašala 0,13 %, kar je bilo znotraj kriterija $\pm 0,5$ %. Izračunali smo še celotno povprečje, ki je bilo 2,52 % ter celotni RSD, ki je znašal 3,46 % in prav tako ustreza kriteriju ≤ 10 %. Izračunali smo tudi 95 % interval zaupanja znotraj 12 vzorcev, ki je znašal: 2,32 – 2,71 %, ter ugotovili, da so vse meritve znotraj le tega. Zaključimo lahko, da je metoda glede na kriterije za vmesno natančnost, natančna in rigidna.

Iz rezultatov za natančnost metode znotraj 1. in 2. dneva ($n = 12$), smo izračunali povprečno maso 502,98 mg, povprečno porabo KF titranta 2,392 mL ter vsebnost vode 2,52 % v vzorcih, saj smo jih potrebovali za izračune pri nadaljnjih analizah (linearnost, točnost).

TOČNOST METODE

Najprej smo izračunali okvirne vrednosti zateht vodnega standarda, s tem da so bile vrednosti v območju 0,4 % do 5,4 % vsebnosti vode ter jih dodali skupaj z vzorcem. Pri izračunu približka dodatka vodnega standarda, smo uporabili povprečno maso vzorcev ($n = 12$). Upoštevali smo tudi koncentracijo vodnega standarda, ki je za 1. in 2. paralelko znašala 10,06, za 3. pa 10,01 mg/g. Po izvedeni analizi smo iz nateht vodnega standarda preračunali maso dodane vode. Izpisali smo si zatehte analiziranih vzorcev ter rezultate analize t.j. % vode v vzorcu. Izračunali smo izmerjeno in dodano vodo in r ter povprečne r , SD, RSD znotraj paralelk in znotraj posameznih nivojev koncentracij ter celotni $\bar{r}$, SD, RSD.

Iz rezultatov smo lahko videli, da so vrednosti za RSD znotraj paralelk, ki so znašale za 1., 2. in 3. paralelko 8,32 %, 3,29 % in 6,32 %, kot tudi po koncentracijskih nivojih od 1. do 4. 4,24 %, 2,45 %, 0,25 % in 0,39 % ter celotni RSD, ki je znašal 5,81 %, ustrezale kriterijem, saj so bili ≤ 10 %. r znotraj paralelk so znašali: 100,55 %, 99,31 % in 101,47 %, celotni pa 100,44 %. Vsi so bili ustrezni, saj so bili znotraj območja 90 – 110 %. Preverili smo še r po koncentracijskih nivojih. Za 1. koncentracijski nivo, je znašal r 109,21 % in je bil znotraj območja med 80 – 120 %, za 2. in 3. koncentracijski nivo sta znašala r 95,82 % in 98,10 % in sta bila med 90 – 110 % ter 4. koncentracijski nivo, kjer je znašal r 98,65 % in je bil znotraj območja med 95 – 105 %. Dobili smo ustrezne rezultate. Iz povprečnih r pri koncentracijskih nivojih, SD ter t_{tab} ($n = 3$) smo izračunali 95 % intervale zaupanja, ki so znašali za 1. nivo: 89,29 – 129,13 %; 2. nivo: 85,71 – 105,93 %; 3. nivo: 97,02 – 99,18 % in 4 nivo: 97,01 – 100,29 %.

Iz rezultatov v preglednici XVIII vidimo, da so bili vsi rezultati znotraj omenjenih intervalov. Zaključimo lahko, da je metoda glede na kriterije točna med 0,40 % in 5,48 % vsebovane vode.

LINEARNOST

Najprej smo izračunali okvirne vrednosti zateht vodnega standarda, s tem da so bile vrednosti v območju 0,41 % do 5,46 % vsebnosti vode. Pri izračunu približka dodatka vodnega standarda, smo uporabili povprečno maso vzorcev ($n = 12$). Upoštevali smo tudi koncentracijo vodnega standarda, ki je znašala 10,06 mg/g. Po izvedeni analizi smo iz nateht vodnega standarda preračunali maso dodane vode, iz katere smo nato preračunali koliko je to % vode za nominalno maso vzorca t.j. $\bar{m}$ ($n = 12$). Dobili smo tudi porabo KF reagenta. S pomočjo dobljenih rezultatov smo narisali regresijske premice, določili povprečne volumne porabe KF titranta, ter RSD le teh. Tudi regresijske premice so bile linearne, saj je znašal R v 1. in 2. premici 0.9999 v 3. pa 1.0000. Presečišča z Y osjo, ki bi morala znašati ± 25 % porabe KF reagenta glede na porabo nominalnega vzorca, so bila ustrezna saj so znašala 1,40 %, 1,94 % in 1,31 %. Tudi nakloni so se zelo dobro ujemali še posebej 1. in 3. Zaključimo lahko, da je metoda glede na kriterije linearna med 0,41 % in 5,46 % vsebovane vode. Ta interval se lahko uporablja tudi kot območje metode.

ROBUSTNOST METODE

Iz dobljenih rezultatov analize smo izračunali povprečno vsebnost vode v vzorcih s 50 % zatehto, ki je znašala 2,48 % in vzorcih s 150 % zatehto, pri katerih je znašala 2,45 % ter RSD, ki je bil pri prvih 0,77 %, pri drugih pa 0,78 %. Oba RSD-ja sta bila ≤ 10 % in sta ustrezala kriterijem. Te rezultate smo primerjali z rezultati pridobljenimi pri natančnosti metode znotraj enega dneva, kjer je povprečna vsebnost vode v vzorcih znašala 2,45 % in RSD 1,63 %. Izračunali smo absolutno razliko, ki je med vzorci s 50 in 100 % zatehto znašala 0,031 %, med vzorci s 100 in 150 % zatehto pa 0,005 %. Izračunani razliki sta ustrezali kriteriju, kjer je bila dovoljena absolutna razlika 0,5 %. Izračunali smo tudi 95 % interval zaupanja za vzorce s 50 % in 100 % zatehto ($n = 9$): 2,38 – 2,54 % ter med vzorci s 100 % in 150 % zatehto ($n = 9$): 2,37 – 2,52 %. Vsi vzorci so bili znotraj izračunanih 95 % intervalov zaupanja. Zaključimo lahko, da je metoda glede na kriterije robustna, če masa vzorca variira za ± 50 % t.j. 250 mg – 750 mg.

5.2. DOLOČANJE a_w

NATANČNOST METODE ZNOTRAJ ENEGA DNEVA (PONOVLJIVOST)

Iz dobljenih rezultatov analize, smo izračunali povprečno a_w v vzorcu, ki je znašala 0,0729 a_w oz. ERH 7,29 % ter RSD, ki je znašal 4,53 % kar je ustrezalo zahtevanemu kriteriju ≤ 10 %. Prav tako smo izračunali 95 % interval zaupanja s pomočjo izračuna SD in vrednosti t_{tab} , ki je znašal: 0,0644 – 0,0814 a_w oz. 6,44 – 8,14 %. Ugotovili smo, da so bile vse meritve znotraj omenjenega intervala. Zaključimo lahko, da je metoda, glede na kriterije za ponovljivost, natančna.

VMESNA NATANČNOST METODE (vpliv različnih dni, analitikov, aparatur)

To karakteristiko smo preučevali na drug dan kot natančnost metode znotraj enega dneva. Vključevala je rigidnosti metode, kjer je analizo izvajal drug tehnik na istem instrumentu. Izračunali smo povprečno a_w v vzorcu, ki je znašala 0,0689 a_w oz. ERH 6,89 % ter RSD, ki je znašal 2,18 % kar je ustrezalo zahtevanemu kriteriju ≤ 10 %. Te dobljene rezultate smo nato primerjali z natančnostjo metode znotraj enega dneva, izračunali absolutno razliko, ki je znašala 0,0040 a_w oz. 0,40 %, kar je bilo znotraj kriterija $\pm 1,0$ %. Izračunali smo še celotno povprečje, ki je bilo 0,0709 a_w oz. 7,09 % ter celotni RSD, ki je znašal 4,51 % in je prav tako ustrezal kriteriju ≤ 10 %. Izračunali smo tudi 95 % interval zaupanja znotraj 12 vzorcev, ki je znašal: 0,0639 – 0,0779 a_w oz. 6,39 – 7,79 %. Ugotovili smo, da je zgolj ena meritev (Vz a'5) ležala zunaj 95 % intervala zaupanja. Zaključimo lahko, da je metoda glede na kriterije za vmesno natančnost natančna in rigidna.

TOČNOST METODE

1 teden pred analizo smo namestili 4* sete vzorcev v treh paralelkah v eksikatorje s točno definirano RH. Vrednosti RH, ki smo jih dosegli z uporabo različnih nasičenih solnih raztopin smo spremljali s podatkovnimi zapisniki. Izrazili smo r med ERH izmerjenim z Aqualab instrumentom in RH v eksikatorjih izmerjen s podatkovnimi zapisniki. r po nivojih vlažnosti so bili za 11 %, 30 %, 50 % in 70 % RH 82,97 %, 88,89 %, 95,96 % in 101,62 % ter celotni r , ki je znašal 92,36 %. r za 11 % in 30 % RH ter celotni r so bili izven kriterijev. Kriteriji za točnost so bili, kot je omenjeno v preglednici VI, povzeti po kriterijih pri KF in niso bili specifični za a_w . Poleg tega smo lahko slabe r pri 11 % in 30 % RH razložili z napako instrumenta s katerimi smo merili RH v eksikatorjih, saj so lahko imeli podatkovni zapisniki ± 2 % napako. Če bi izmerjene vrednosti za 11 % in 30 % vlažnosti zmanjšali za 2 % (napaka instrumenta) na 13,25 % in 35,20 % bi dobili povprečni r 95,50 % in 93,94 %. Poleg tega pa nasičene raztopine soli niso bile sveže pripravljene, zato so bili r v preglednici uporabljeni zgolj informativno. Napako instrumenta bi lahko odpravili z uporabo komor s točno kontrolirano RH. Rezultate pa bi

najverjetneje lahko izboljšali tudi s sveže pripravljenimi nasičenimi raztopinami soli. Napačne vrednosti v eksikatorjih z 11 % in 30 % RH bi lahko dobili tudi zaradi vpliva zunanje atmosfere, saj vzorci lažje pridobijo dodatno vlago iz zraka, kot pa ohranijo nizko RH vrednost.

RSD po nivojih vlažnosti so bili 0,76 %, 0,25 %, 0,20 % in 0,20 % ter celotni 7,98 % kar je tudi ustrezalo zahtevanim kriterijem. Iz povprečnih r po nivojih vlažnosti, SD ter t_{tab} ($n = 3$) smo izračunali 95 % intervale zaupanja, ki so znašali za 1. nivo: 80,26 – 85,68 %; 2. nivo: 87,94 – 89,84 %; 3. nivo: 95,14 – 96,78 % in 4 nivo: 100,76 – 102,48 %. Iz rezultatov v preglednici XXIII vidimo, da so vsi znotraj omenjenih intervalov. Teoretično smo glede na kriterije za točnost metode ugotovili, da je metoda točna med 0,1255 in 0,6877 a_w , t.j. okoli 11% do 70% ravnotežne relativne vlažnosti ob predpostavki, da bodo kriteriji do izboljšanja postopka zgolj informativni.

* Na začetku validacije smo imeli 5 setov vzorcev. Ugotovili smo da vzorec, ki smo ga namestili v eksikator nad vodo pri RH 100 %, ni ustrezen za analizo, saj tablete nabrekajo in razpadajo. Ta set vzorcev smo zanemarili in nadaljevali analize na naslednjih štirih setih vzorcev.

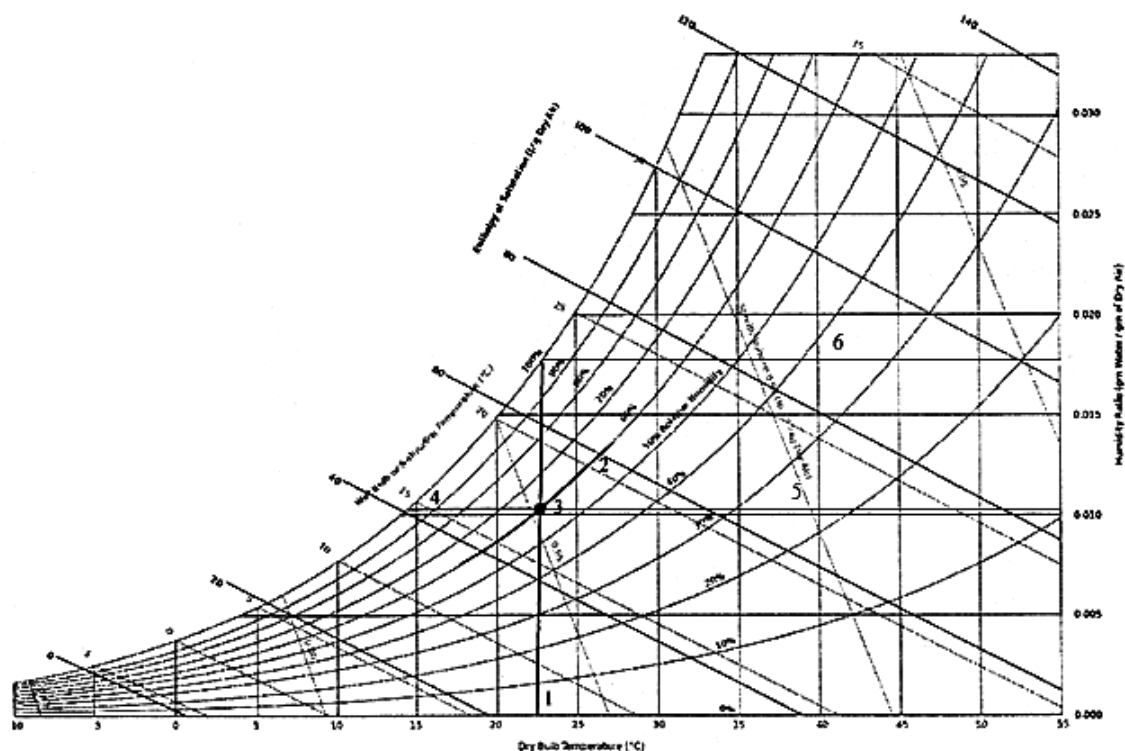
LINEARNOST METODE

Iz podatkov za a_w , KF in IPS smo izvedli linearno regresijo. Za a_w smo uporabili povprečje rezultatov 4 setov vzorcev v treh paralelkah, ki smo jih dobili pri točnosti metode. Uporabili smo tudi rezultate KF titracije v eni paralelki ter povprečje dveh paralelk IPS izvedenih na enako pripravljenih vzorcih. Analizirali smo tudi čisti vzorec, in sicer smo uporabili povprečje treh meritev a_w , dveh meritev IPS in eno meritev KF. Linearna regresija je prikazana na sliki 18 in je bila ustrezna, saj je zahtevana vrednost $R \geq 0,99$ zagotovljena. Pri sorbcijski izotermi vlage za določitev vode s KF je R znašal 0,9992, pri IPS pa 0,9971. Ta kriterij: $R \geq 0,99$ je veljal samo za informativne namene ker zveza (sorbcijska izoterma) ni vedno linearna.

Kljub temu, da naj bi bila sorbcijska izoterma sigmoidne oblike, smo iz naših rezultatov ugotovili, da je bila na merjenem območju RH in vsebnosti vode (pri konst. T) sorbcijska izoterma linearna. To niti ni bilo tako presenetljivo, saj naj bi bila tipična sorbcijska izoterma za oralno FO v začetnem delu linearna, kar prikazuje tudi slika 8. Videli smo, da so bili rezultati a_w od 0,0657 a_w (čisti vzorec) do 0,6862 a_w pridobljeni v validacijski študiji vsi v linearni regresiji sorbcijske izoterme. V preglednici XXIV prav tako vidimo, da so bili rezultati za KF in IPS metodo zelo podobni, s čimer smo pokazali, da vitaminske tablete ne vsebujejo nobene lahko hlapne substance razen H₂O.

PSIHROMETRIČNI GRAF:

Da smo lahko preverili rezultate dobljene v validacijski študiji, smo uporabili psihrometrični graf. To je graf, ki prikazuje termodinamične parametre vlažnega zraka pri konstantnem tlaku, največkrat tistim pri morski gladini na nadmorski višini 0. Psihrometrični graf prikazan na sliki 19 predstavlja te parametre in je na ta način grafična enačba stanja.



Slika 19: Psihrometrični graf

Vzamimo na primer rezultate pridobljene z nasičeno raztopino NaBr. Izmerjena vlažnost v eksikatorju je bila 60,06 %. Ob uporabi psihrometričnega grafa smo lahko izračunali T rosišča kot sledi (je opisano spodaj):

1. Vertikalna črta je narisana prek T pri kateri smo izvajali meritev ($T = 22,5\text{ }^{\circ}\text{C}$).
2. Črta je narisana vzdolž izmerjene vlažnosti (60,06 %, izmerjene v eksikatorju).
3. Pika je narisana tam kjer se ti dve črti sekata.
4. Črta je narisana do leve osi s čimer dobimo T rosišča ($t \approx 14,5\text{ }^{\circ}\text{C}$).

a_w v vitaminskih tabletah, kot smo jo izmerili z Aqualab instrumentom je bila 0,5763 ($n = 3$), ki ustreza ERH 57,63 %. Uporabili smo enačbo 13, ki je precej natančna za vrednosti RH nad 50 %:

$$RH \approx 100 - 5(t - t_d)$$

Enačba 13: Izračun RH 1; t = temperatura suhega termometra; t_d = temperature rosišča

Kjer je T suhega termometra 22,5 °C in T rosišča 14,5 °C, je bila RH izračunana na 60 %, ki je blizu izmerjene z Aqualab inštrumentom (57,63 %).

5. Črta je narisana do desne osi, s čimer dobimo absolutno vlažnost pri izmerjeni RH (60,06 %) in pri T meritve (22,5 °C). a_w v vitaminskih tabletah, kot smo jo izmerili z Aqualab instrumentom je bila 0,5763 ($n = 3$), ki ustreza ERH 57,63 %.

6. Nasičena (absolutna) vlažnost znaša pri 22,5 °C 0,0177 g vode/g suhega zraka. Po enačbi 14 izrazimo absolutno vlažnost:

$$RH = \frac{\text{absolutna vlažnost pri } 22,5\text{ °C}}{\text{nasičena absolutna vlažnost pri } 22,5\text{ °C}}; \text{ Enačba 14: Izračun RH 2}$$

Če v enačbo 14 vstavimo vrednosti RH, ki je 0,5763 in nasičeno absolutno vlažnost pri 22,5 °C, ki je 0,0177 g vode/g suhega zraka, dobimo vrednost 0,0102 g vode/g suhega zraka. Iz grafa vidimo, da to drži. Ker smo uporabili iste podatke kot pri določanju točnosti, ne smemo pozabiti na možne napake pri merjenju RH v eksikatorjih (podatkovni zapisniki, solne raztopine). Glede na (informativne) kriterije za linearnost, je metoda linearna v območju od 0,0657 a_w (čisti vzorec) do 0,6862 a_w .

ROBUSTNOST METODE

Pri robustnosti metode smo proučevali naslednje:

- (i) Variacija v ciklu vzorca (t.j. zaporedne meritve istega vzorca)

Ugotovili smo, da med prvim in drugim ciklom (meritve) ni bilo razlike oz. so bile vse razlike med cikli vzorca manjše od 0,003 a_w , kar je bilo po metodi ustrezno. Da smo zagotovili podrobnejši vpogled v vpliv števila ciklov pri merjenju, smo analizirali vzorec v treh paralelkah v treh ciklih in določili razliko v a_w v ciklih.

Videli smo, da so bile razlike v a_w med zaporednimi cikli (meritvami) vse znotraj zahtevanega kriterija 0,003 a_w . Kakorkoli, razlike med tretjim in prvim ciklom so bile večje (preglednica XXVI*). Zato, razen če je zahtevano drugače (t.j. razlika med prvim in drugim ciklom je večja kot 0,003 a_w), se priporoča, da se upošteva rezultate iz drugega cikla. Kljub dejstvu, da smo določili, da med prvim in drugim ciklom ni razlike, naj bi se kljub temu izvedla dva cikla, da zagotovimo pravilno delovanje instrumenta, t.j. da sta dva rezultata znotraj 0,003 a_w .

- (ii) Variacija v temperaturi pri kateri merimo

Ugotovili smo, da so bile vse absolutne razlike znotraj kriterija za absolutno razliko $\leq 1,0$ %. Rezultati pridobljeni pri 15 °C so bili najnižji, medtem ko tisti pridobljeni pri 30 °C pa so bili najvišji. Pri višjih T je parni tlak vodne pare višji in tudi nekoliko višja nasičena absolutna vlažnost in obratno pri nižji T. Vzorcju z enako količino vsebnosti vode se zato a_w pri višji T poveča. Podobni rezultati so bili pridobljeni za 20 °C, 22,5 °C in 25 °C. Pri vsaki T so bili RSD-ji znotraj zahtevanih kriterijev ≤ 10 %. Na pridobljenih rezultatih, smo zaključili, da je T med

20 °C in 25 °C, kot je definirano v AP, ustrezna za analizo, prav tako T 22,5 °C, ki je bila uporabljena za preostanek validacijske študije.

(iii) Variacija v stanju tablet

Videli smo, da je imelo drobljenje ali prepolavljanje tablet vpliv na rezultat analize. Najverjetneje zato, ker dobimo pri drobljenju oz. prepolavljanju tablet večjo specifično površino vzorca in lahko pride do dodatne desorpcije pri drobljenju. Zaradi večje površine se lahko veže več zračne vlage med samo pripravo vzorca, lahko pa se sprost tudi kapilarno vezana voda v notranjosti tablete. Izven kriterija sta bili obe absolutni razliki, pri zdrobljenih, kot tudi pri prepolovljenih tabletah, prav tako je bil skupni RSD večji od 10 %. Za analizo se zato lahko uporabljajo le cele tablete. Pri analizi je prav tako potrebno paziti, da se tablete ne poškodujejo.

(iv) Variacija v napolnjenosti posodice

Ugotovili smo, da napolnjenost posodice ni vplivala na pridobljene rezultate. Priporoča se, da je posodica normalno napolnjena. Kakorkoli, v primeru, da za analizo ne bi bilo na voljo zadosti tablet, bi lahko bila posodica na pol napolnjena. Posodice ni priporočljivo polniti do vrha, saj po nepotrebnem porabljam vzorec, kot tudi lahko pogosteje pride do raznih kontaminacij, ki motijo meritev in bi bilo potrebno pogostejše uravnavanje linearnosti instrumenta.

SELEKTIVNOST (SPECIFIČNOST) METODE

Ugotovili smo, da noben od instrumentov ni specifičen zgolj za a_w v vzorcu, ker sta se oba odzvala na prisotnost metanola. Kakorkoli, tipičen vzorec vitaminskih tablet bi vseboval le ekstremno majhno količino hlapnih substanc razen vode, saj v specifikaciji tablet ni rezidualnih topil, kot se jih tudi ne uporablja v proizvodnji tablet, medtem ko je specifikacijska meja IPS zgolj informativna. Pogledamo lahko tudi preglednico XXIV, kjer so rezultati za KF (vsa voda) in IPS (vsa voda in hlapne substance) zelo podobni, kar pomeni, da tablete niso vsebovale drugih hlapnih snovi razen vode. Pri Aqualab instrumentu lahko pride do napak, kadar ima vzorec prisotnih precej hlapnih komponent (npr. rezidualnih topil) s parnim tlakom podobnim ali večjim kot voda. Le-te lahko meritev motijo. Zato sta za dane meritve oba instrumenta ustrezna. Rezultati pridobljeni z instrumentom za a_w Aqualab so zadovoljivi in metoda je specifična za njen namen v tem primeru. Iz rezultatov vidimo, da so višji pri merjenju s Testo 635, kar pomeni, da je le ta bolj občutljiv za hlapne substance. Zaključimo lahko, da so rezultati, pridobljeni z instrumentom Aqualab za a_w , zadovoljivi.

6. SKLEP

Razvili smo ustrezno KF metodo za določanje vode v vitaminskih tabletah, ki smo jo nato potrdili s TU po Ph. Eur. 8.0 in jo validirali. Na podlagi validacije lahko trdimo, da je ta metoda natančna, rigidna, točna v območju med 0,40 % in 5,48 % vsebnosti vode, linearna v območju 0,41 % in 5,46 % vsebnosti vode in robustna ob variaciji mase vzorca ± 50 %.

- Za izbrane vitaminske tablete metanol ni bil ustrezno topilo pri KF titraciji, kljub temu, da so tablete v metanolu razpadle, saj se voda iz tablet počasi sprošča. Za izboljšanje topnosti smo dodali formamid, ki pa je toksičen, zato bi bilo z vidika zdravja bolje poiskati kakšno varnejše in ustrežnejše topilo.
- Priprava vzorca je zelo pomembna, saj smo s tem, ko smo spremenili pripravo le tega, močno izboljšali RSD in sicer z 10,7 % na 1,61 %.

Izvedli smo tudi validacijo metode za določanje a_w v vitaminskih tabletah in na podlagi te lahko prav tako trdimo, da je metoda natančna, rigidna, točna pod pogojem da rezultate jemljemo zgolj informativno, linearna v območju a_w med 0,0657 in 0,6862, robustna in zadovoljivo specifična.

- Kriteriji za a_w so povzeti po kriterijih pri KF in niso specifični za a_w , ker je izvajana analiza med novejšimi. Poleg tega bi novi kriteriji, ki bi bili prilagojeni sposobnostim našega instrumenta, dosti bolje obravnavali dobljene rezultate.
- Rezultate pri točnosti metode bi lahko izboljšali, če bi vzorce shranjevali v komorah s točno kontrolirano RH. Rezultate pa bi najverjetneje lahko izboljšali tudi s sveže pripravljenimi nasičenimi raztopinami soli.
- Pri merjenju a_w morajo biti tablete nepoškodovane, cele ker se pri poškodbah lastnosti tablet spremenijo. To je še posebej relevantno pri obloženih tabletah.
- V primeru, da bi imeli na voljo omejeno količino vzorca, za analizo zadošča že polovica priporočene količine tablet.
- Ta princip merjenja a_w ni specifičen za vodo, saj reagirajo tudi druge hlapne substance. To zna biti problem pri vzorcih s prisotnimi rezidualnimi topili, če pa se pri proizvodnji FO ne uporabljajo, ta pomanjkljivost ne predstavlja omejitev. V primeru, da sumimo, da bi vzorec takšna topila vseboval, je najbolje izvesti analizi IPS in KF ter primerjati njune rezultate. Če so podobni, vzorec teh snovi ne vsebuje.

Na vse meritve a_w , KF in IPS vpliva tudi zunanja atmosfera, zato moramo vzorce čim hitreje pripraviti in analizirati, da vlage ne izgubljajo oz. vežejo. Če bi bili vzorci bolj higroskopni, bi se priporočalo delo v ustreznih prostorih npr. z nizko RH in T.

Obe metodi se lahko uporabi za njun predviden namen, da zagotovimo kvalitetne rutinske analize s konsistentnimi in ponovljivimi rezultati.

Merjenje a_w bi lahko v prihodnosti povsem nadomestilo KF titracije, saj bi se s poznavanjem sorpcijskih izoterm podatke o vsebnosti vode lahko dobilo direktno iz meritve a_w . Takšni instrumenti že obstajajo. S tem, ko bo merjenje a_w pridobilo na popularnosti, bodo najverjetneje tudi ti postali bolj uporabni.

7. LITERATURA

- [1] http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf dostopano 15.10.2014.
- [2] Barwick V, Morillas Bravo PP, Ellison SLR, et al.: The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 2. izdaja, Eurachem, 2014.
- [3] http://www.rsc.org/images/Warwick2_tcm18-93083.pdf dostopano 7.2015.
- [4] <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM386366.pdf> dostopano 10.2014
- [5] Good Titration Practice™ in Karl Fischer Titration, Mettler Toledo, Schwerzenbach 2011.
- [6] Karl Fischer Volumetric Titration Theory and Practice, Radiometer analytical, Zürich 2007.
- [7] Moisture Measurement by Karl Fischer Titrimetry, 2. izdaja, GFS Chemicals, Inc., Powell 2004.
- [8] Bruttel P, Schlink R: Water Determination by Karl Fischer Titration, Metrohm, Herisau 2003.
- [9] Karl Fischer Volumetric – Basic knowledge at a glance, Mettler Toledo, Schwerzenbach 1998.
- [10] <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical/basic-principles-of-karl-fischer-titration.html> dostopano 8.2015.
- [11] http://pittcon.org/wp-content/uploads/2016/02/Aqualab_Aw-as-an-Alternate-to-Karl-Fischer.pdf dostopano 9.2015
- [12] Snider B, Liang P, Pearson N: Implementation of Water Activity Testing to Replace Karl Fischer Water Testing for Solid Oral – Dosage Forms. Pharmaceutical Technology 2007;(2): 56-71.
- [13] European Pharmacopoeia, 8th Edition, Council of Europe, Strasbourg 2013: 353-7.
- [14] Scott M, Bell S, Bannister M, et al.: A Guide to the Measurement of Humidity, Institute of Measurement and Control, London 1996.
- [15] Part one: Theory, Humidity Academy, Rotronic Measurement Solutions, Bassersdorf 2014.
- [16] <https://sl.wikipedia.org/wiki/Vla%C5%BEnost> dostopano 12.10.2014.
- [17] <http://www.livescience.com/43269-what-is-dew-point.html> dostopano 8.10.2015.
- [18] AquaLab Series 4TE Water Activity Meter Operator's Manual, Decagon Devices, Inc., Pullman 2008.

- [19] <http://www.aqualab.com/education/moisture-sorption-isotherms/> dostopano 5.1.2015.
- [20] European Pharmacopoeia, 8th Edition, Council of Europe, Strasbourg 2013: 158-9.