

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA MOLEK

**PREUČEVANJE IN STATISTIČNA ANALIZA VPLIVOV
OVOJNINE, VSEBNOSTI UČINKOVINE IN POGOJEV
SHRANJEVANJA NA VSEBNOST VODE V TRDNI
FARMACEVTSKI OBLIKI**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo sem opravljala v farmacevtski družbi Lek, d.d., Razvoj in raziskave, na oddelku Stabilnost formulacij pod mentorstvom izr. prof. dr. Vojka Kmetca, mag. farm. in somentorstvom dr. Simone Bohanec, univ. dipl. ing. kem. (Lek, d.d.).

Zahvaljujem se mentorju in somentorici za strokovno pomoč, vodenje in potrpežljivost pri opravljanju diplomske naloge.

Iskrena hvala tudi moji družini, ki me je podpirala in spodbujala med celotnim študijem, ter vsem ostalim, ki so mi kakorkoli pomagali pri izdelavi diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Vojka Kmetca, mag. farm. in somentorstvom dr. Simone Bohanec, univ. dipl. ing. kem.

Ljubljana, april 2008

Katja Molek

Predsednik diplomske komisije: zasl. prof. dr. Aleš Krbavčič, mag. farm.

Član diplomske komisije: izr. prof. dr. Samo Kreft, mag. farm.

Član diplomske komisije: izr. prof. dr. Vojko Kmetec, mag. farm.

Član diplomske komisije: dr. Simona Bohanec, univ. dipl. ing. kem.

1. VSEBINA

| | |
|--|----|
| 2. POVZETEK..... | 3 |
| 3. SEZNAM OKRAJŠAV | 5 |
| 4. UVOD..... | 6 |
| 5. TESTIRANJE STABILNOSTI IN OBDELAVA PODATKOV | 9 |
| 5.1. VRSTE TESTIRANJA STABILNOSTI | 11 |
| 5.1.1. Pospešeno testiranje stabilnosti | 11 |
| 5.1.2. Vmesno testiranje stabilnosti | 12 |
| 5.1.3. Dolgoročno testiranje stabilnosti | 12 |
| 5.1.4. Stresno testiranje stabilnosti | 13 |
| 5.2. OBDELAVA STABILNOSTNIH PODATKOV Z LINEARNO REGRESIJO | 13 |
| 5.2.1. Regresijska premica in interval zaupanja | 14 |
| 5.3. ICH SMERNICE ZA OBDELAVO STABILNOSTNIH PODATKOV | 17 |
| 6. DEJAVNIKI RAZGRADNJE UČINKOVINE | 21 |
| 6.1. POVIŠANA TEMPERATURA..... | 21 |
| 6.2. VLAGA | 22 |
| 6.2.1. Mehanizmi vezave vlage na trdne snovi..... | 23 |
| 6.2.2. Dejavniki, ki vplivajo na vsebnost vode v trdnih farmacevtskih oblikah..... | 24 |
| 6.2.3. Analiza vode v farmacevtskih sistemih | 25 |
| 6.2.4. Zaščita trdne farmacevtske oblike pred vlago | 27 |
| 7. NAMEN NALOGE | 30 |
| 8. MATERIALI IN METODE..... | 32 |
| 8.1. MATERIALI | 32 |
| 8.1.1. Podatki o učinkovini in testiranih vzorcih | 32 |
| 8.1.2. Reagenti in topila..... | 32 |
| 8.2. APARATURE | 32 |
| 8.3. POGOJI TESTIRANJA IN PRIPRAVA VZORCEV | 33 |
| 8.4. METODE..... | 33 |
| 8.4.1. Določanje vsebnosti vode po Karl Fischerju | 33 |
| 8.4.2. Obdelava stabilnostnih podatkov z linearno regresijo..... | 34 |
| 9. REZULTATI IN RAZPRAVA..... | 35 |
| 9.1. VSEBNOST VODE V ODVISNOSTI OD POGOJEV SHRANJEVANJA..... | 35 |
| 9.1.1. Primerjava rezultatov pri pogojih 40/75, 30/75, 30/65 in 25/60..... | 35 |

| | |
|--|----|
| 9.1.2. Linearna regresija: primerjava premic pri pogoju 25/60 | 37 |
| 9.1.3. Linearna regresija: primerjava premic pri pogojih 30/65 in 30/75 | 39 |
| 9.1.4. Primerjava skupnih premic pri različnih pogojih | 40 |
| 9.2. VSEBNOST VODE GLEDE NA ŠTEVILO KAPSUL V PLASTENKI..... | 41 |
| 9.2.1. Pregled rezultatov pri pogoju 40/75..... | 42 |
| 9.2.2. Linearna regresija rezultatov pri pogoju 25/60..... | 44 |
| 9.3. VSEBNOST VODE V ODVISNOSTI OD VSEBNOSTI UČINKOVINE V PELETAH..... | 45 |
| 9.3.1. Pregled rezultatov vsebnosti vode v 10, 20 in 40 mg kapsulah..... | 45 |
| 9.3.2. Linearna regresija rezultatov 10, 20 in 40 mg kapsul pri pogojih 25/60, 30/65 in 30/75 | 47 |
| 9.4. KORELACIJA MED VSEBNOSTJO VODE IN STABILNOSTJO FARMACEVTSKE OBLIKE..... | 48 |
| 10. SKLEP | 50 |
| 11. LITERATURA | 53 |

2. POVZETEK

Vsako zdravilo, ki pride na tržišče, mora biti stabilnostno testirano. Pri razvoju farmacevtskega izdelka ločimo razvojno in registracijsko fazo testiranja stabilnosti. V registracijski fazi testiramo proizvodne serije v skladu z ICH ali FDA priporočili oziroma priporočili posameznih držav, ki predpisujejo načine testiranja, pogoje shranjevanja in termine analiz. Namen stabilnostnega testiranja je napoved roka uporabnosti in načina shranjevanja farmacevtskih izdelkov.

Ta diplomska naloga zajema registracijsko fazo testiranja stabilnosti treh proizvodnih serij. Farmacevtska oblika so pelete, polnjene v HPMC kapsule in pakirane v plastenke s sušilnim sredstvom. Učinkovina, ki je vgrajena v pelete, je zelo občutljiva na vlago, kar vpliva na kemijske in fizikalne lastnosti farmacevtske oblike.

Zanimalo nas je, kako različni dejavniki vplivajo na količino vezane vode v peletah. Glede na lastnosti testiranih vzorcev smo za kritične dejavnike izbrali pogoj shranjevanja, število kapsul v enoti ovojnine in vsebnost učinkovine v eni kapsuli. V ta namen smo določali vsebnost vode v peletah z metodo po Karl Fischerju.

Dobljene rezultate smo predstavili tabelarično in, če je bilo smiselno, še grafično ter jih statistično obdelali po principu linearne regresije, določanja intervalov zaupanja, primerjave regresijskih premic in, v primeru neznačilnih razlik med nakloni in odseki, združevanju premic v skupno regresijsko premico. Regulatorja kot primer uporabe linearne regresije navaja obdelavo podatkov dolgoročne stabilnosti za coni I in II za napovedovanje roka uporabnosti, vendar dopušča njeno uporabo tudi za obdelavo drugih podatkov in stabilnostnih parametrov. V diplomski nalogi smo z linearno regresijo obdelali podatke vplivov izbranih kritičnih dejavnikov na vsebnost vode v peletah, ki so bile hranjene na pogojih 25/60, 30/65 in 30/75. S tem smo potrdili možnost aplikacije linearne regresije na podatke dolgoročne stabilnosti za coni III in IV (30/65 in 30/75) ter na vrednotenje kritičnih dejavnikov stabilnosti. V našem primeru so to zgoraj omenjeni dejavniki, za katere smo ugotovili, da dejansko vplivajo na vsebnost vode v peletah, in sicer pogoj shranjevanja, število kapsul v enoti ovojnine in vsebnost učinkovine v eni kapsuli.

Poleg dolgoročne in vmesne stabilnosti smo izvajali še pospešene teste stabilnosti in rezultate med seboj primerjali. Pospešeno testiranje stabilnosti nam je služilo za napovedovanje stabilnosti končnega izdelka in za hitro oceno vplivov posameznih dejavnikov na vsebnost vode v peletah, ki smo jih potrdili z rezultati vmesnega in dolgoročnega testiranja.

Iz dobljenih rezultatov smo ugotovili, da je vsebnost vode odločilna za stabilnost naše farmacevtske oblike. Korelacija med vsebnostjo vode in vsoto razkrojnih produktov je potrdila domnevo, da vsota razkrojnih produktov narašča z vsebnostjo vode v peletah.

3. SEZNAM OKRAJŠAV

| | |
|--------|---|
| ANCOVA | analiza kovariance |
| DVS | metoda za določanje vsebnosti vode z dinamično sorpcijo-desorpcijo vode |
| FDA | Ameriška agencija za hrano in zdravila (Food and Drug Administration) |
| HDPE | polietilen visoke gostote |
| HPLC | tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (High Performance Liquid Chromatography) |
| HPMC | hidroksipropil metilceluloza |
| ICH | Mednarodna konferenca o usklajevanju (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use) |
| IR | infrardeča spektroskopija |
| KF | metoda Karl Fischer za določanje vsebnosti vode v farmacevtskih sistemih |
| NIR | spektroskopija v bližnjem IR spektru (Near Infrared Spectroscopy) |
| NMR | nuklearna magnetna resonanca |
| RP | razkrojni produkti |
| RV | relativna vlaga |
| SS | vsota kvadratov (Sum of Squares) |

4. UVOD

Zdravilo je vsaka snov ali kombinacija snovi, ki so predstavljene z lastnostmi za zdravljenje ali preprečevanje bolezni, določitev diagnoze bolezni in ponovno vzpostavitev, izboljšanje ter spremembo fiziološke funkcije pri ljudeh in živalih (1). Zaradi uporabe farmacevtskih izdelkov na ljudeh in živalih je kakovost bistvenega pomena. Kakovost lahko zagotovimo le s skrbno načrtovanim razvojem in proizvodnjo ter potrdimo z obsežnim testiranjem stabilnosti, ki je poleg varnosti in učinkovitosti nujen pogoj za kakovostno in uporabno zdravilo (2).

Testiranje stabilnosti se izvaja tako tekom razvoja, kot tudi takrat, ko je zdravilo že na tržišču. Namen testiranja stabilnosti je ugotoviti, kako se kakovost učinkovin in farmacevtskih izdelkov spreminja s časom pod vplivom različnih dejavnikov okolja, kar nam omogoča napoved roka uporabnosti in načina shranjevanja. S tem namenom izvajamo testiranje kritičnih parametrov učinkovine in/ali farmacevtske oblike, za katere menimo, da se bodo spreminjali tekom shranjevanja, transportiranja in distribucije in lahko vplivajo na kakovost farmacevtskega izdelka. Na podlagi stabilnostnih študij izberemo ustrezno ovojnino, ki lahko zmanjša vplive kritičnih dejavnikov na stabilnost izdelka in s tem podaljša rok uporabnosti zdravila (2). Izvajanje stabilnostnih študij je regulatorno urejeno z ICH smernicami in FDA priporočili ter priporočili posameznih držav, ki natančno predpisujejo načine testiranja, pogoje shranjevanja in termine analiz (3,4,5,6).

V registracijski fazi testiranja stabilnosti se izvajajo analize na končni farmacevtski obliki. Farmacevtska oblika je oblika zdravila, v katero se s pomočjo tehnoloških postopkov vgradi zdravilna učinkovina in s tem omogoči njena uporabnost, ob upoštevanju fizioloških pogojev in fizikalno kemijskih lastnosti zdravilne učinkovine in pomožnih snovi (1). Pogosto se stabilnost same učinkovine in učinkovine, vgrajene v farmacevtsko obliko, razlikuje zaradi prisotnosti pomožnih snovi in procesa proizvodnje farmacevtske oblike. Pomožne snovi običajno negativno vplivajo na stabilnost učinkovine, kar pomeni, da pospešijo njeno razgradnjo. Do negativnih vplivov pomožnih snovi na stabilnost učinkovine lahko pride predvsem pri trdnih peroralnih farmacevtskih oblikah, kjer so učinkovina in pomožne snovi v tesnem stiku, zaradi česar lažje prihaja do medsebojnih interakcij.

Uporabnost zdravil je odvisna tudi od izbire ustrezne ovojnine, zaradi česar se njenemu preučevanju posveča vedno več pozornosti (7, 8). Industrijski način proizvodnje pomeni podaljšan stik zdravila z ovojnino. Med trženjem, transportiranjem in shranjevanjem so farmacevtski izdelki dodatno izpostavljeni različnim vplivom okolja, kot so temperatura, vlaga, svetloba, kisik in različni mehanski vplivi, ki lahko vodijo do nestabilnosti farmacevtskih izdelkov. Prav tu pride v ospredje primerna in kakovostna ovojnina, ki mora zaščititi farmacevtsko obliko pred kemičnimi, fizikalnimi in tudi mikrobiološkimi vplivi okolja. Poleg tega mora posredovati vse potrebne informacije o zdravilu, omogočati enostavnost rokovanja in dajati izdelku primeren izgled.

Izbira ovojnine je odvisna od stabilnosti farmacevtske oblike, namena uporabe, klimatskega območja in prodajne strategije (7). Optimalno ovojnino izberemo na podlagi testov stabilnosti, podatkov iz literature in preteklih izkušenj. V primeru, ko imamo opravka z učinkovino, občutljivo na vlago, je pomembno, da izbrana ovojnina ščiti farmacevtsko obliko pred vlago iz okolja.

Voda oziroma vlaga ima v trdnih farmacevtskih sistemih, ki jih bomo preučevali, zelo velik pomen. Vsebnost vlage v trdnih farmacevtskih oblikah in s tem hitrost razgradnje učinkovine je odvisna od (8):

- začetne količine vlage vezane na sestavine farmacevtske oblike,
- hidrofilnih lastnosti učinkovine in pomožnih snovi,
- ovojnine,
- relativne vlažnosti okolja pri pakiranju,
- relativne vlažnosti okolja v času shranjevanja, transportiranja in distribucije končne farmacevtske oblike.

Farmacevtski izdelek dodatno zaščitimo pred vlago z dodajanjem sušilnih sredstev v vsebnik (9). Sušilno sredstvo veže vlago, ki zaradi prepustnosti ovojnine za vodo prihaja iz okolice, in tako vzdržuje nizko relativno vlažnost znotraj ovojnine, hkrati veže vodo iz farmacevtske oblike in jo tako posuši. Najpogosteje uporabljena sušilna sredstva so silikagel, molekularna sita ali kombinacija obeh.

Posledica uvedbe novih avtomatiziranih instrumentov, uvajanja načel dobre laboratorijske prakse in vedno ostrejšje zakonodaje različnih držav je kopičenje velike

množice podatkov, ki so prava zakladnica informacij. Do teh informacij je mogoče priti s sistematičnim in ciljanim izborom podatkov ter njihovo obdelavo. Poznamo različne metode za obdelavo podatkov, ki so odvisne od vrste, količine in oblike podatkov ter zelenih informacij, ki bi jih radi iz podatkov pridobili (10).

ICH smernica Q1E: Vrednotenje stabilnostnih podatkov kot način obdelave stabilnostnih podatkov navaja linearno regresijo (11). Linearna regresija je postopek prilagajanja eksperimentalnih podatkov matematičnemu modelu, in sicer premici. Uporaba linearne regresije je torej primerna za procese, ki potekajo po kinetiki ničtega reda, se pravi, da je merjena količina (vsebnost učinkovine, razkrojni produkti) linearno odvisna od časa shranjevanja, lahko pa jo apliciramo tudi na nelinearne procese, pri katerih predpostavimo linearno zvezo med spremenljivkama. Premici določimo tudi zgornji in spodnji 95% interval zaupanja srednje vrednosti, ki sta merilo variabilnosti podatkov in omogočata napoved roka uporabnosti. To je čas, pri katerem eden od intervalov zaupanja doseže specifikacijsko mejo kritičnega parametra. Smernica navaja uporabo linearne regresije za obdelavo eksperimentalnih podatkov dolgoročne stabilnosti za con I in II, vendar dopušča njeno aplikacijo tudi na druge, alternativne pogoje testiranja stabilnosti.

S pomočjo stabilnostnih študij torej preučujemo spreminjanje farmacevtske oblike s časom v odvisnosti od številnih dejavnikov. Ob poznavanju le-teh lahko na različne načine preprečimo ali upočasnimo razgradnjo učinkovine in/ali farmacevtske oblike. Velik pomen ima izbor ustreznih pomožnih sredstev in farmacevtske oblike, uporaba optimalne ovojnine, določitev pogojev shranjevanja in končno tudi sam proizvodni proces farmacevtskega izdelka. Ker je cilj farmacevtske industrije čim hitreje in ceneje priti do stabilnega in kakovostnega izdelka, se vedno več uporablja stresne in pospešene teste stabilnosti, s katerimi lahko napovedujemo rok uporabnosti in stabilnost farmacevtskih izdelkov. Iz istih razlogov se poslužujemo tudi različnih statističnih metod, ki nam pomagajo ovrednotiti množico eksperimentalnih podatkov in ekstrapolacijo teh podatkov na rezultate izven časa eksperimentalnega testiranja.

5. TESTIRANJE STABILNOSTI IN OBDELAVA PODATKOV

Stabilnost je sposobnost farmacevtskega izdelka, da ves čas roka uporabnosti, pod pogojem, da se shranjuje pri predpisanih pogojih in v ustrezni ovojnini, ohranja svoje karakteristike znotraj specifikacijskih mej. Ločimo kemično, fizikalno, mikrobiološko in biofarmacevtsko stabilnost. Osnovni namen testiranja stabilnosti je varen, učinkovit in kakovosten izdelek (2). Nobeno gotovo zdravilo ne sme biti na tržišču, ne da bi bilo stabilnostno testirano, kar je potrebno dokazati ustreznim regulatornim ustanovam. Testiranje stabilnosti se ne izvaja le na končnih izdelkih, ampak tudi tekom razvoja zdravila. Na stabilnost zdravila vplivajo različni dejavniki, kot so fizikalne in kemijske lastnosti učinkovin in pomožnih snovi, farmacevtska oblika, ovojnina ter vplivi okolja.

Končni cilj stabilnostnih testiranj je določitev roka uporabnosti in načina shranjevanja učinkovin ter farmacevtskih izdelkov. Rok uporabnosti je čas hranjenja (do pet let), v katerem vzorec še ustreza zahtevam specifikacije pod pogojem, da se shranjuje v skladu z navodili na nalepki in v predlagani ovojnini (2).

Pri razvoju izdelka ločimo razvojno in registracijsko fazo testiranja stabilnosti (12). V registracijski fazi testiramo proizvodne serije v skladu z ICH ali FDA priporočili oziroma priporočili posameznih držav, ki navajajo načine testiranja, pogoje shranjevanja in termine analiz. V razvojni fazi izvajamo stresno in pospešeno testiranje stabilnosti učinkovine in testiranje kompatibilnosti pred izdelavo prvih laboratorijskih vzorcev, testiranje stresne in dolgoročne stabilnosti laboratorijskih vzorcev z namenom izbora recepture, ovojnine, napovedi roka uporabnosti in načina shranjevanja ter testiranje stabilnosti izdelka inovatorja.

Raziskave stabilnosti vključujejo testiranje kritičnih parametrov učinkovine in/ali farmacevtske oblike, za katere menimo, da se bodo spreminjali tekom shranjevanja, transportiranja in distribucije ter lahko vplivajo na kakovost, varnost in učinkovitost farmacevtskega izdelka.

Ločimo šest faz stabilnostnega razvoja (2, 13). V vsaki od teh faz je potrebno upoštevati osnovna načela. Najprej opredelimo izbor serij. To so lahko prve serije, predklinične, eksperimentalne ali proizvodne serije. Pomembno je, da so vzorci reprezentativni za

parametre, ki jih želimo izmeriti. Poleg izbora serij določimo število serij, analize postopke, specifikacije (kriteriji, ki se nanašajo na sprejemljivost spremembe učinkovine oz. zdravila) in ovojnino, katero je potrebno natančno opredeliti že pred testiranjem končnih serij. V nadaljevanju določimo parametre testiranja, pogoje shranjevanja, čas shranjevanja in frekvenco testiranja, pri čemer moramo dobiti zadostno število podatkov za obdelavo in statistično vrednotenje določenih trendov.

Faze stabilnostnega testiranja:

1. Stresni in pospešeni testi učinkovine
2. Stresni in pospešeni testi razvojnih formulacij (formuliranje številnih eksperimentalnih kombinacij učinkovine z različnimi pomožnimi snovmi in ugotavljanje intrinzične stabilnosti v prisotnosti le-teh)
3. Stresni in pospešeni testi izbranih formulacij (določiti moramo mehanizem razpada, parametre testiranja, specifikacije z vidika sproščanja učinkovine in roka uporabnosti, stabilnostno indikativne metode, končno ovojnino, občutljivost zdravila na svetlobo itd.)
4. Pospešeni in dolgoročni testi registracijskih serij (izvajajo se na zadnjih razvojnih ali proizvodnih serijah z namenom potrjevanja rezultatov stabilnostnega testiranja)
5. On-going testiranje stabilnosti (potrjevanje in podaljševanje roka uporabnosti na serijah, ki so namenjene na trg)
6. Follow-up testiranje stabilnosti (spremljanje stabilnosti v skladu z registracijsko dokumentacijo in testiranje stabilnosti kot posledica različnih variacij ali sprememb)

Izdelava razvojnega načrta na področju raziskav, razvoja in kontrole kakovosti farmacevtskih izdelkov je regulatorno urejena. Mednarodna komisija za usklajevanje (ICH) je projekt treh regij, Evrope, Japonske in Združenih držav Amerike (14). Namen ICH je usklajevanje regulative na področju registracije zdravil. Cilj ICH je doseči usklajenost v interpretaciji in aplikaciji smernic in zahtev pri registraciji zdravil ter ukinitev nepotrebnega ponavljanja testiranja stabilnosti pri razvoju in raziskavah novega zdravila. Smoter ICH je ekonomična izraba človeških, živalskih in materialnih sredstev in odstranitev nepotrebnih zakasnitev v razvoju in razpoložljivosti novih zdravil na tržišču.

ICH regulativa opredeljuje štiri področja, in sicer kakovost, varnost, učinkovitost in multidisciplinarnost. Stabilnostno testiranje spada na področje kakovosti, ki je opisano v smernicah Q. Tako smernica Q1, na primer, vključuje testiranje stabilnosti, smernica Q2 validacijo analitskih postopkov, smernica Q3 področje nečistot itd (3, 15, 16, 17).

ICH smernica Q1A(R2) loči testiranje stabilnosti učinkovine in končnega izdelka (3). Poleg tega natančno opisuje pogoje pospešenega, vmesnega in dolgoročnega testiranja stabilnosti. Omenja tudi stresno testiranje učinkovine in končne farmacevtske oblike, pri čemer se omejuje na testiranje fotostabilnosti. Natančni pogoji testiranja fotostabilnosti novih učinkovin in produktov so opisani v smernici Q1B (18).

5.1. VRSTE TESTIRANJA STABILNOSTI

Pogoji pospešenega, vmesnega in dolgoročnega testiranja so natančno določeni v ICH smernici Q1A(R2): Testiranje stabilnosti novih učinkovin in produktov (3). Pogoji testiranja so opredeljeni glede na predlagane pogoje shranjevanja učinkovine ali farmacevtske oblike (sobna temperatura, hladilnik, zamrzovalnik) in klimatsko območje. Tako imajo nekatere države v svoji dokumentaciji še dodatna priporočila glede pogojev stabilnostnega testiranja.

5.1.1. Pospešeno testiranje stabilnosti

Pospešeno testiranje stabilnosti izvajamo z namenom pospešitve hitrosti kemijske razgradnje ali fizikalnih sprememb učinkovine ali farmacevtske oblike tako, da jo izpostavimo pretiranim pogojem shranjevanja. Običajen pogoj pospešenega testiranja je 40 °C / 75 % RV za farmacevtske oblike, ki se shranjujejo pod dolgoročnimi pogoji shranjevanja pri 25 °C. Časovni intervali analiz so odvisni od tega, za kateri trg farmacevtsko obliko razvijamo. Evropska regulativa zahteva v času šestih mesecev najmanj tri časovne točke, vključno z začetno in končno točko (0, 3 in 6 mesecev) (3). Po presoji raziskovalca ali domnevah, da bo pri pospešenem testiranju prišlo do bistvenih sprememb, se lahko uvede četrta časovna točka analize ali pa se poveča število vzorcev v zadnji točki testiranja. Ameriška regulativa zahteva rezultate analiz po

0, 1, 2 in 3 mesecih (4). Podatki pospešenega testiranja služijo za ocenitev vplivov kratkotrajnih odstopanj od predpisanih pogojev shranjevanja, do katerih lahko pride med transportom, shranjevanjem in distribucijo. Če v času pospešenega testiranja pride do bistvenih sprememb, je potrebno izvesti tudi teste na vmesnem pogoju shranjevanja.

5.1.2. Vmesno testiranje stabilnosti

Vmesno testiranje stabilnosti se izvaja pri pogoju 30 °C / 65 % RV z namenom, da zmerno povečamo hitrost kemijske razgradnje ali fizikalnih sprememb učinkovine ali končne farmacevtske oblike, ki se shranjujejo pod dolgoročnimi pogoji shranjevanja pri 25 °C. Vmesno testiranje stabilnosti izvajamo, če v času pospešenega testiranja pride do bistvenih sprememb katerega od parametrov stabilnosti testiranega vzorca. V tem primeru se zahteva 12 mesečna študija stabilnosti, z najmanj štirimi časovnimi točkami, vključno z začetno in končno točko (0, 6, 9 in 12 mesecev).

5.1.3. Dolgoročno testiranje stabilnosti

Dolgoročno testiranje stabilnosti izvajamo pri priporočenih pogojih shranjevanja najmanj toliko časa, da pokrijemo čas roka uporabnosti za farmacevtsko obliko oziroma čas ponovnega preizkušanja za učinkovino. Pogoj dolgoročnega testiranja za farmacevtske oblike, ki se shranjujejo pri sobni temperaturi in so razvite za klimatski področji I in II, je 25 °C / 60 % RV. Za klimatski območji III in IV pa je pogoj dolgoročnega testiranja 30 °C / 65 % RV. V zadnjem času so se s strani nekaterih držav, ki spadajo v coni III in IV, pojavile zahteve po dolgoročnem testiranju pri pogoju 30 °C / 75 % RV (19). V primeru dolgoročnega testiranja pri pogoju 30 °C / 65 % ni predpisanega vmesnega testiranja. Časovni intervali analiz v prvem letu testiranja so na vsake tri mesece, v drugem letu na šest mesecev in nato na dvanajst mesecev, vse do izteka roka uporabnosti. Rezultati dolgoročnega testiranja se uporabijo za potrditev napovedanega roka uporabnosti in za predlaganje pogojev shranjevanja ter ustreznega načina označevanja zdravila. Ker proces registracije zdravila na tržišču poteka pred iztekom roka uporabnosti, lahko rok uporabnosti določimo s pomočjo statistične obdelave razpoložljivih podatkov (11).

5.1.4. Stresno testiranje stabilnosti

Stresno testiranje je testiranje stabilnosti učinkovin in/ali farmacevtskih oblik pod ostrejšimi pogoji, kot jih uporabljamo pri pospešenem, vmesnem in dolgoročnem testiranju (3, 20). S tem pospešimo različne kemične razgradne procese v učinkovini, kar nam omogoča hitro ocenitev stabilnosti velikega števila različnih vzorcev in s tem razvoj stabilne farmacevtske oblike v razmeroma kratkem času. Običajno najprej izvedemo stresno testiranje na učinkovini, kasneje, ko imamo znane dejavnike, ki najbolj vplivajo na stabilnost zdravilne učinkovine, pa še na farmacevtski obliki, v katero je preučevana učinkovina vgrajena.

Namen stresnega testiranja učinkovine je ugotoviti dejavnike, ki vplivajo na razgradnjo učinkovine (vlaga, temperatura, pH, kisik, svetloba, specifični vplivi topil, težkih kovin) in pridobiti prve okvirne informacije, ki jih potrebujemo za izbor sestave, tehnološkega postopka in ovojnine. Rezultate dobimo v nekaj dneh ali največ v enem mesecu.

5.2. OBDELAVA STABILNOSTNIH PODATKOV Z LINEARNO REGRESIJO

Linearna regresija je statistična metoda za obdelavo podatkov (21, 22). Gre za postopek prilagajanja eksperimentalnih podatkov matematičnemu modelu, to je premici. Najboljšo prilegajočo premico poiščemo z metodo vsote najmanjših kvadratov in ji določimo vrednost naklona in odseka na ordinatni osi.

Linearno regresijo v farmacevtskih raziskavah najpogosteje uporabljamo pri spremljanju procesov kinetike ničtega reda, kjer je odnos med odvisno in neodvisno spremenljivko linearen. V nekaterih primerih red kinetike ni natančno določen, vendar lahko kljub temu predpostavimo linearno zvezo med spremenljivkami in jo opišemo v obliki premice.

Pri raziskavah stabilnosti uporabljamo linearno regresijo za napovedovanje roka uporabnosti. Običajno testiramo tri proizvodne serije istega farmacevtskega izdelka. Po obdelavi dobljenih podatkov z linearno regresijo dobimo tri regresijske premice, ki jim

določimo spodnji in zgornji interval zaupanja srednje vrednosti. Na osnovi intervalov zaupanja določimo rok uporabnosti za vsako serijo. Če so vsi roki uporabnosti daljši od napovedanega roka uporabnosti, premice med seboj primerjamo in v primeru statistično neznačilnih razlik tudi združujemo. Ker je združena premica določena na osnovi večjega števila eksperimentalnih točk, je njen interval zaupanja v primerjavi s posameznimi premicami ožji. Iz tega razloga je rok uporabnosti, ki je določen na osnovi skupne premice, daljši.

5.2.1. Regresijska premica in interval zaupanja

Rezultate dolgoročne stabilnosti najpogosteje modeliramo s premico, saj je zveza med vrednostjo merjenega parametra in časom shranjevanja običajno linearna. Premico opišemo z enačbo:

$$y = a + b \cdot x \quad (1)$$

Kjer je y vrednost parametra, s katerim spremljamo stabilnost izdelka, spremenljivka x je čas shranjevanja, b je naklon premice in a odsek premice na ordinatni osi ($x = 0$).

Eksperimentalne točke, ki jih določa par spremenljivk x in y , med katerima sicer obstaja linearna zveza, običajno ne predstavljajo popolnoma ravne linije. Vzrok za odstopanja eksperimentalnih točk od ravne linije so lahko različne eksperimentalne napake. Ravno zato se za obdelavo podatkov poslužujemo statistične analize.

Najboljšo prilegajočo premico eksperimentalnim podatkom poiščemo z metodo vsote najmanjših kvadratov. Dobljeno premico imenujemo regresijska premica. Točke, ki ležijo na regresijski premici označimo z X in Y . Glede na to, da x predstavlja časovne intervale analiz, predpostavljamo, da med izmerjenim x in teoretičnim X ni razlike, saj je čas spremenljivka, ki jo merimo brez napake.

Vsote kvadratov razlik (SS) za spremenljivki x in y ter za mešani produkt obeh spremenljivk xy izračunamo s pomočjo formul:

$$SS_{xx} = \sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2 \quad (2)$$

$$SS_{yy} = \sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2 \quad (3)$$

$$SS_{xy} = \sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X}) \cdot (y_i - \bar{y}) \quad (4)$$

Kjer je N število eksperimentalnih točk, x_i in y_i pa vrednosti spremenljivk x in y v posameznih točkah. i zajema vrednosti pozitivnih celih števil, 1, 2, 3, 4, ..., N .

\bar{X} in \bar{y} sta povprečni vrednosti obeh spremenljivk. Izračunamo jih po enačbah:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^N X_i}{N} \quad (5)$$

$$\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^N y_i}{N} \quad (6)$$

Naklon b in odsek na ordinatni osi a regresijske premice izračunamo:

$$b = \frac{SS_{xy}}{SS_{xx}} = \frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2} \quad (7)$$

$$a = \bar{y} - b \cdot \bar{X} \quad (8)$$

Variabilnost spremenljivke y ocenimo z vsoto kvadratov razlike med eksperimentalno določeno vrednostjo y in vrednostjo Y na regresijski premici:

$$S_{Y.x}^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - Y_i)^2}{N-2} = \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2 - b^2 \left[\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2 \right]}{N-2} \quad (9)$$

$S_{Y.x}^2$ je varianca, ki je enaka kvadratu standardnega odmika. Računamo jo pri prostostni stopnji $N - 2$, saj premico določata dve vrednosti, naklon in odsek na ordinatni osi. Oznaka $Y.x$ pomeni, da je Y funkcija X .

Regresijski premici določimo spodnji in zgornji interval zaupanja srednje vrednosti merjenega parametra. Interval zaupanja je interval, za katerega z določeno gotovostjo verjamemo, da v njem leži resnična vrednost merjenega parametra. Značilnost intervala zaupanja je, da je v sredini merjenega območja najožji in se širi na obe strani od središča.

Formula za izračun intervala zaupanja srednje vrednosti za regresijsko premico v posameznih točkah i je:

$$Y = Y_i \pm t \cdot S_{Y.x} \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{(X_i - \bar{X})^2}{SS_{xx}}} \quad (10)$$

Kjer je t tabelarična vrednost t distribucije pri $N - 2$ prostostni stopnji.

Na podoben način lahko izračunamo tudi interval zaupanja za časovno točko X pri izbrani vrednosti spremenljivke Y , vendar je izračun kompleksnejši, saj je X po enačbi premice enak razmerju med $(Y - a)$ in b . Imenujemo ga napovedni interval zaupanja in ga izračunamo po naslednjih enačbah:

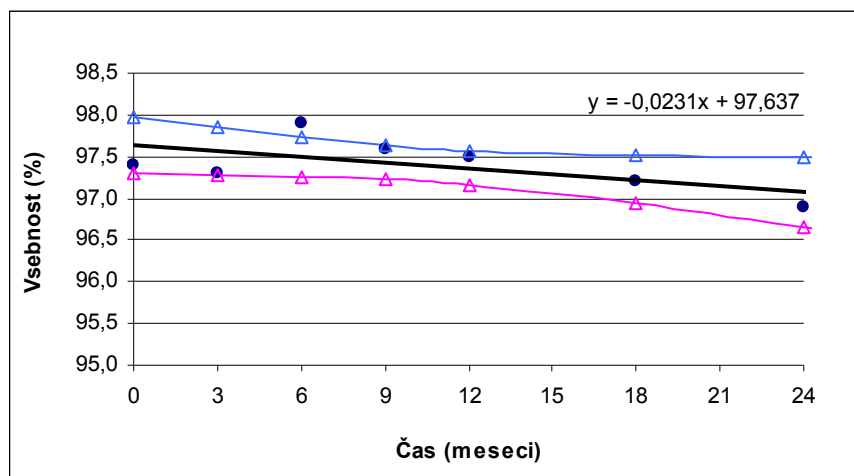
$$X = \frac{(X_i - g \cdot \bar{X}) \pm \left(\frac{t \cdot S_{Y.x}}{b} \right) \cdot \left[\sqrt{\frac{(1-g)}{N} + \frac{(X_i - \bar{X})^2}{SS_{xx}}} \right]}{1-g} \quad (11)$$

$$g = \frac{t^2 \cdot S_{Y.x}^2}{b^2 \cdot SS_{xx}} \quad (12)$$

Iz napovednega intervala zaupanja določimo rok uporabnosti. Izbrana vrednost Y je običajno 90% vrednost deklarirane vsebnosti učinkovine. Ker vsebnost učinkovine v večini primerov s časom shranjevanja pada (izjema so raztopine, pri katerih vsebnost učinkovine zaradi izhlapevanja topila narašča), rok uporabnosti izračunamo na podlagi spodnjega intervala zaupanja. Pri tem dobimo daljši rok uporabnosti, kot bi ga dobili na podlagi obojestranskega napovednega intervala zaupanja.

Velikost intervala zaupanja je odvisna predvsem od standardnega odmika $S_{Y,x}$ in števila eksperimentalnih točk N .

Slika 1 ponazarja primer linearne regresije in intervalov zaupanja. Na osi x so prikazane časovne točke v mesecih, na osi y pa merjeni parameter. Krivulja roza barve predstavlja mejo spodnjega intervala zaupanja, modra krivulja pa mejo zgornjega intervala zaupanja.



Slika 1: Spreminjanje vsebnosti v odvisnosti od časa z intervaloma zaupanja srednje vrednosti

5.3. ICH SMERNICE ZA OBDELAVO STABILNOSTNIH PODATKOV

Napotke za obdelavo stabilnostnih podatkov podaja ICH smernica Q1E: Vrednotenje stabilnostnih podatkov, ki je nadgradnja smernice Q1A(R2): Testiranje stabilnosti novih učinkovin in produktov (3, 10). Slednja se zelo na hitro in v zelo majhnem obsegu dotakne področja obdelave stabilnostnih podatkov. Kot primerno metodo za obdelavo

stabilnostnih podatkov za napovedovanje roka uporabnosti zdravilnih učinkovin in farmacevtskih oblik navaja linearno regresijo ter pri združevanju podatkov treh serij priporoča, da se hipotezo o razliki med serijami testira pri meji signifikantnosti 0,25.

Smernica Q1E opisuje vrednotenje stabilnostnih podatkov, ki smo jih pridobili v skladu s smernico Q1A(R2), z namenom določanja roka uporabnosti farmacevtskih izdelkov, ki se shranjujejo pri sobni temperaturi, v hladilniku, zamrzovalniku in temperaturi pod -20 °C. Poleg tega opisuje tudi uporabo ekstrapolacije razpoložljivih eksperimentalnih podatkov dolgoročne stabilnosti pri napovedovanju roka uporabnosti, ki je daljši od časa izvajanja dolgoročne stabilnosti. Pri tem predvideva, da se trend spreminjanja merjenega parametra s časom nadaljuje tudi v obdobju izven dolgoročnega testiranja stabilnosti. Zato je pomembno, da rok uporabnosti, ki ga napovemo s pomočjo ekstrapolacije, potrdimo z eksperimentalnimi podatki dolgoročnega testiranja takoj, ko so ti podatki na razpolago.

Uporabo linearne regresije priporoča pri enofaktorskih popolnih, večfaktorskih popolnih in večfaktorskih reduciranih stabilnostnih študijah.

V vseh primerih smernica priporoča določanje 95% intervala zaupanja srednje vrednosti, s pomočjo katerega določimo rok uporabnosti. Ko trend spreminjanja merjenega parametra s časom ni znan, določimo obojestranski 95% interval zaupanja. Če je znano, da merjeni parameter s časom pada (npr. vsebnost učinkovine), rok uporabnosti izračunamo na osnovi spodnjega intervala zaupanja in obratno, če merjeni parameter s časom narašča (npr. razkrojni produkti), rok uporabnosti izračunamo na osnovi zgornjega intervala zaupanja srednje vrednosti.

Glede na to, da se rok uporabnosti običajno določa na vzorcih treh serij, je potrebno ugotoviti homogenost serij. To naredimo s primerjavo naklonov in odsekov regresijskih premic posameznih serij, za kar smernica Q1E navaja analizo kovariance (ANCOVA). To je metoda, ki združuje analizo variance z linearno regresijo in se uporablja za primerjavo več skupin med seboj neodvisnih podatkov (22). Pri tem uvede kovariat, od katerega je enako odvisen vsak merjen parameter, ne glede na to, v katero skupino podatkov spada. V primeru določanja roka uporabnosti iz podatkov treh serij za kovariat

vzamemo čas. Če ugotovimo homogenost serij, lahko podatke vseh treh serij združimo in tako dobimo skupno regresijsko premico.

Postopamo tako, da najprej za vsako serijo po principu linearne regresije in intervalov zaupanja določimo rok uporabnosti. Če so roki uporabnosti vseh serij daljši od napovedanega roka uporabnosti, potem ta rok uporabnosti potrdimo. Če je rok uporabnosti ene ali več serij krajši od napovedanega, izvedemo analizo kovariance (ANCOVA), kjer primerjamo naklone in odseke na ordinatni osi s testom signifikantnosti pri nivoju signifikantnosti 0,25. S tem potrdimo ali zavržemo predpostavko o enakih naklonih oziroma odsekih. Pomembno je, da najprej primerjamo naklone in šele nato odseke.

Analizo kovariance ponavadi izvajamo s pomočjo ustreznih statističnih računalniških programov, saj je izračunavanje posameznih parametrov ANCOVA precej kompleksen in dolgotrajen proces (22).

Pri primerjavi regresijskih premic posameznih serij so možni trije različni rezultati:

1. S testom signifikantnosti zavrnemo hipotezo o enakosti naklonov, kar pomeni, da se nakloni regresijskih premic med seboj bistveno razlikujejo. Združevanje regresijskih premic ni smiselno. Rok uporabnosti določimo iz serije, katere premica daje najkrajši rok uporabnosti.
2. S testom signifikantnosti potrdimo hipotezo o enakosti naklonov, vendar zavrnemo hipotezo o enakosti odsekov, kar pomeni, da med nakloni ni bistvenih razlik, so pa bistvene razlike med odseki. Premice prilagodimo tako, da jim določimo skupen naklon, pri čemer dobimo vzporedne premice z različnimi odseki. Rok uporabnosti določimo iz serije, katere premica daje najkrajši rok uporabnosti.
3. S testom signifikantnosti potrdimo hipotezi o enakosti naklonov in enakosti odsekov, kar pomeni, da med nakloni in odseki posameznih premic ni bistvenih razlik. Premice združimo in rok uporabnosti določimo na osnovi intervala zaupanja srednje vrednosti skupne regresijske premice.

Rok uporabnosti, ki ga določimo iz skupne regresijske premice, je običajno daljši kot tisti, ki ga določimo iz posameznih premic. Zaradi združevanja premic, se namreč poveča število podatkov, kar se kaže v ožjem intervalu zaupanja.

Podobno ravnamo tudi pri večfaktorski popolni in večfaktorski reducirani stabilnostni študiji, kjer lahko poleg serij primerjamo tudi različne faktorske kombinacije. V vseh primerih pa je pomembno, da pred izvajanjem statistične analize eksperimentalne podatke sistematično ovrednotimo. Rezultate predstavimo tabelarično in/ali grafično za vsako serijo, pogoj ali kak drug faktor posebej in jih ovrednotimo po zaporedju, kot je navedeno v smernici Q1E. Za farmacevtske izdelke, ki se shranjujejo pri normalnih pogojih, najprej ovrednotimo podatke pospešenega testiranja, nato, če je smiselno, podatke vmesnega testiranja in končno še podatke dolgoročnega testiranja. Če rezultati pospešenega testiranja ne pokažejo bistvenih sprememb, rok uporabnosti določimo iz podatkov pospešenega in dolgoročnega testiranja, v nasprotnem primeru uporabimo še podatke vmesnega testiranja. Šele ko ugotovimo trend spreminjanja merjenega parametra s časom in ko rezultati ne kažejo večjih variabilnosti, izvedemo statistično analizo podatkov, na podlagi katere določimo rok uporabnosti farmacevtskega izdelka. Napovedan rok uporabnosti lahko s pomočjo ekstrapolacije razpoložljivih eksperimentalnih podatkov dvakrat podaljšamo, vendar ne za več kot 12 mesecev od obdobja izvajanja dolgoročnega testiranja. V primeru, ko rok uporabnosti določamo iz rezultatov vmesnega in dolgoročnega testiranja, lahko napovedan rok uporabnosti podaljšamo do 1,5-krat, vendar ne za več kot šest mesecev od obdobja izvajanja dolgoročnega testiranja.

6. DEJAVNIKI RAZGRADNJE UČINKOVINE

Na stabilnost učinkovine ali farmacevtskega izdelka največkrat vpliva več dejavnikov hkrati. Faktorji razgradnje, ki lahko močno vplivajo na stabilnost zdravil, so temperatura, vlaga, oksidirajoče snovi in svetloba (2). Posledice delovanja teh faktorjev so lahko izguba učinkovine, zvišanje koncentracije učinkovine, sprememba biološke uporabnosti farmacevtske oblike, izguba enakomernosti vsebnosti, upad mikrobiološke kakovosti, sprememba izgleda farmacevtske oblike ali poškodba ovojnine, nastanek toksičnih razpadnih produktov in spremembe drugih karakteristik. Glede na to ločimo več tipov nestabilnosti, in sicer kemično, fizikalno, mikrobiološko, terapevtsko in toksikološko nestabilnost.

Zgoraj našteje nestabilnosti so lahko posledica kemijske ali fizikalne spremembe učinkovine in/ali pomožnih snovi. Pri kemijski razgradnji nastanejo nove spojine, pri fizikalni pa se spremenijo fizikalne lastnosti zdravila. Najpomembnejši kemijski reakciji, ki vplivata na stabilnost zdravil, sta solvoliza in oksidacija, pride pa lahko tudi do fotolize, dehidracije, racemizacije, konjugacije in drugih reakcij. Pri solvolizah poteče razgradnja učinkovine v prisotnosti topila, ki je v večini primerov voda. Med fizikalnimi razpadi največkrat srečamo vezavo ali izhlapevanje vode, polimorfizem, izparevanje učinkovine, adsorpcijo le-te na površino ovojnine in sedimentacijo (23).

6.1. POVIŠANA TEMPERATURA

Temperatura je glavni dejavnik, ki vpliva na hitrost procesov. Hkrati lahko določa prevladujoč mehanizem reakcij v določenem temperaturnem območju. V splošnem velja, da hitrost razpadnih procesov narašča z naraščanjem temperature. To je osnova pospešenih in stresnih testov stabilnosti, ki temeljijo na pospešitvi razpadnega procesa. Rezultate pospešenih in stresnih testov lahko uporabimo za napovedovanje roka uporabnosti in ocenjevanje stabilnosti pri normalnih pogojih shranjevanja. Poleg tega je lahko uporaba povišane temperature del formalnih stabilnostnih testov, s katerimi dokazujemo, da je pripravek neobčutljiv na odstopa od predpisanih pogojev shranjevanja.

Glede na to, ali imamo konstantno povišano temperaturo ali pa jo med eksperimentom spreminjamo, poznamo izotermične in neizotermične pospešene teste ter ciklična testiranja (2). Pospešeno in stresno stabilnostno testiranje se navadno izvaja izotermično v skladu z ICH in FDA priporočili tako, da vzorce hranimo na izbranih temperaturah in jih analiziramo v določenih časovnih intervalih.

Odnos med temperaturo in hitrostjo kemijske reakcije podaja Arrheniusova enačba, s pomočjo katere iz hitrostnih konstant pri različnih temperaturah za določen proces izračunamo aktivacijsko energijo E_a in frekvenčni faktor A (2, 23). Z ekstrapolacijo Arrheniusove premice lahko, ob določenih predpostavkah in izpolnjenih pogojih, določimo konstanto reakcijske hitrosti pri izbrani temperaturi in izračunamo koncentracijo oziroma vsebnost učinkovine pri tej temperaturi. Na ta način lahko iz rezultatov pospešenega testiranja ocenimo stabilnost pripravka pri predpisanih pogojih shranjevanja in tako precej skrajšamo čas stabilnostnega testiranja.

6.2. VLAGA

Voda oziroma vlaga ima zelo velik pomen v farmacevtskih sistemih, saj vpliva na fizikalno kemijske lastnosti farmacevtskih izdelkov, interakcije med posameznimi učinkovinami in pomožnimi snovmi ter v povezavi s tem tudi na stabilnost zdravil. Voda se v farmacevtskih sistemih nahaja v vsaj dveh termodinamskih stanjih, in sicer kot kemijsko (kristalno) vezana voda in prosta (adsorbirana) voda, ki je prisotna zaradi različnih tehnoloških procesov ali zaradi izpostavljenosti farmacevtskega izdelka okoliški atmosferi. In prav prosta voda lahko povzroči številne fizikalne in kemijske spremembe (23). Med fizikalne spremembe uvrščamo spremembo barve, kristalne strukture, spremembo agregatnega stanja, stopnje hidratacije, reoloških lastnosti, topnosti in razpadnosti. Med kemijske spremembe štejemo razpad učinkovine zaradi vrste kemijskih reakcij, kot so kemijske in encimske hidrolize, oksidacije, racemizacije optično aktivnih spojin in druge.

6.2.1. Mehanizmi vezave vlage na trdne snovi

Mero proste vode v farmacevtskih sistemih imenujemo tudi aktivnost vode, ki odraža kombinacijo različnih interakcij med vodo in snovjo ter s tem omogoča oceno vpliva na kemično, fizikalno in mikrobiološko stabilnost (24).

Vsakršna interakcija vodnih molekul z molekulami trdne snovi je povezana z njenim kemijskim potencialom in njegovo spremembo v primerjavi s tekočo obliko vode (25). Kemijski potencial tekoče vode pri določeni temperaturi T je opisan z enačbo:

$$\mu = \mu_0 + RT \ln P_0 \quad (13)$$

Kjer je P_0 parni tlak vode pri tej temperaturi, μ_0 standardni kemijski potencial in R splošna plinska konstanta (8,314 J/molK).

Pri isti temperaturi T je kemijski potencial vode v vodni raztopini neke snovi μ_s enak:

$$\mu_s = \mu_0 + RT \ln P_s \quad (14)$$

Kjer je P_s parni tlak vode nad površino raztopine in je manjši od P_0 . Razlika obeh potencialov je:

$$\mu_s - \mu = RT \ln P_s/P_0 \quad (15)$$

Iz enačbe je razvidno, da je kemijski potencial vode v raztopini nižji za vrednost $RT \ln P_s/P_0$, pri čemer je razmerje P_s/P_0 vedno manjše od 1 in ga imenujemo aktivnost vode, relativni tlak vodnih par ali kar relativna vlažnost (RV).

Znižanje aktivnosti vode v raztopini je temelj delikvescence, ki jo srečamo pri hidrofilnih kristaliničnih snoveh (soli, saharidi, vitamini, polialkoholi), ko pride do raztapljanja trdne snovi na njeni površini, če je parni tlak v okolju višji od parnega tlaka vode nad površino raztopine te snovi (P_s). Vrednost parnega tlaka v okolju, pri oziroma nad katerim pride do raztapljanja trdne snovi na površini, imenujemo kritična relativna vlažnost RH_0 in je enaka parnemu tlaku nasičene raztopine te snovi. Kritična relativna vlažnost za večino farmacevtskih substanc je nad 70 % in zato ne predstavlja težav pri

običajnih pogojih. Pomembno pa je, da se pri kombiniranju trdnih snovi kritična relativna vlažnost znižuje. Če pade pod vrednost relativne vlažnosti okolja, pride do delikvescence in posledično do fizikalnih in kemijskih sprememb farmacevtskega pripravka.

Kombinacije učinkovin in pomožnih snovi so torej bolj higroskopne kot posamezne sestavine. Če so v zmesi prisotne pore in kapilare, se higroskopnost še poveča zaradi kapilarne kondenzacije.

Drugi pomembni mehanizmi vezave vode, poleg delikvescence in kapilarne kondenzacije, so še adsorpcija po površini v enem ali več slojih, tvorba kristalohidratov in absorpcija v notranjost ("bulk fazo") amorfne snovi.

6.2.2. Dejavniki, ki vplivajo na vsebnost vode v trdnih farmacevtskih oblikah

Vsebnost vlage v trdnih farmacevtskih oblikah in s tem hitrost razgradnje učinkovine je odvisna od začetne količine vlage vezane na sestavine farmacevtske oblike, hidrofilnih lastnosti učinkovine in pomožnih snovi, ovojnine, relativne vlažnosti okolja pri pakiranju in relativne vlažnosti okolja v času shranjevanja, transportiranja ter distribucije končne farmacevtske oblike (8).

Začetna količina vlage vezane na sestavine farmacevtskega izdelka je odvisna od kakovosti posameznih sestavin, tehnološkega postopka proizvodnje izdelka in relativne vlažnosti, kateri je bil izdelek izpostavljen med pakiranjem.

Glede na dejstvo, da vlaga v okolju predstavlja enega bistvenih dejavnikov, ki vplivajo na stabilnost farmacevtskih oblik, moramo pri oblikovanju in proizvodnji zdravil upoštevati tudi to, kateremu tržišču je namenjeno. Prav iz tega razloga je Mednarodna organizacija za harmonizacijo svet razdelila v štiri klimatske cone (3, 26):

1. zmerna klima (Severna Evropa, Rusija, Kanada)
2. mediteranska ali subtropska klima (pretežni del Evrope, ZDA, Japonska)
3. vroča suha klima (Severna Afrika, Bližnji vzhod, Avstralija)
4. vroča vlažna ali tropska klima (srednja Afrika, srednja Azija in Srednja Amerika).

Vzrok delitve sveta na klimatske cone je standardizacija pogojev shranjevanja, pri katerih se izvajajo stabilnostne študije. Standardni pogoji shranjevanja za posamezno cono so bili določeni na osnovi srednje kinetične temperature, ki so jo izračunali iz klimatskih podatkov iz obdobja enega leta. Tako večina držav Evrope, ZDA in Japonska spadajo v klimatsko cono II, za katero je predpisan pogoj dolgoročnega testiranja 25 °C / 60 % RV. Medtem ko države Severne Afrike in Bližnjega vzhoda spadajo v cono III, države srednje Afrike, Azije in Amerike pa v cono IV. Za obe coni je predpisan pogoj dolgoročnega testiranja 30 °C / 65% RV ali celo 30 °C / 75 % RV.

Pomožne snovi lahko zaradi svoje higroskopnosti prispevajo k večji začetni količini vlage v izdelku in s tem na večjo nestabilnost izdelka. Po drugi strani pa lahko stabilizirajo učinkovino tako, da vežejo vodo, ki bi se drugače vezala na učinkovino.

Še posebej velik pomen pri omejevanju hitrosti razgradnih procesov učinkovine zaradi vlage ima izbira ustrezne ovojnine (7). Eden izmed kriterijev za določanje kakovosti ovojnine je prepustnost ovojnine za vlogo. Prehod vlage skozi ovojnino je glavni faktor, ki vpliva na relativno vlago znotraj ovojnine in vsebnost vode v izdelku. Količina vode, ki se veže na farmacevtsko obliko, je odvisna od kemijske identitete in polarnosti posameznih sestavin ter temperature in relativne vlažnosti okolja.

6.2.3. Analiza vode v farmacevtskih sistemih

Poznamo več različnih analiznih tehnik za kvalitativno in kvantitativno vrednotenje vsebnosti vode v farmacevtskih sistemih, ki so v večini opisane v farmakopejah (27). Najpogostejši tehniki za določanje vlage v končnih farmacevtskih oblikah sta izguba pri sušenju in metoda Karl Fischer. Druge metode so še termogravimetrija, določanje relativne ravnotežne vlage, dinamična sorpcija-desorpcija vode (DVS), destilacija in spektroskopske metode IR, NMR ter NIR.

Izguba pri sušenju je metoda, s katero določamo predvsem površinsko vezano vodo, vendar poleg vode iz vzorca izhlapevajo tudi druga topila, kar povzroča neselektivnost te metode. Za določevanje izgube pri sušenju uporabljamo različne tipe sušilnikov, pogoje sušenja pa izberemo glede na kemijsko fizikalne lastnosti vzorca.

Določanje vode z metodo KF je zelo hitro in uporabno, saj lahko z ustreznimi tehnikami (npr. ekstrakcijo) in različnimi mešanicami topil določamo vodo v skoraj vseh materialih (trdnih, tekočih, plinastih) (27, 28). Metoda temelji na reakciji med vodo, žveplovim dioksidom in jodom v nevodnem mediju ob prisotnosti baze z ustrežno pufrsko kapaciteto. Končna točka titracije se pokaže s pribitkom joda v raztopini. S KF določamo celokupno vsebnost vode v vzorcu. Ločimo volumetrično in kulometrično metodo. Volumetrična metoda je primerna za določanje vsebnosti vode med 1 mg in 100 mg, pri čemer je vsebnost vode sorazmerna porabi titranta. S kulometrično metodo pa določamo vsebnosti vode med 10 µg in 10 mg, pri čemer vsebnost vode izračunamo z meritvijo potenciala.

Termogravimetrija je analizna tehnika, ki spremlja izgubo mase vzorca v odvisnosti od temperature. Temperaturni profil razpada vzorca je odvisen od narave vzorca in hitrosti segrevanja. Če poznamo strukturo vzorca, lahko glede na obliko termogravimetrične oblike sklepamo na prisotnost vode v vzorcu.

Z merjenjem relativne ravnotežne vlage določamo tisti del vlage v vzorcu, ki se pri normalnih pogojih izmenjuje med vzorcem in okoljem. Povezava med relativno ravnotežno vlago in vsebnostjo vode v vzorcu je kompleksna, vendar v splošnem velja, da z naraščanjem relativne ravnotežne vlage narašča tudi vsebnost vode v vzorcu.

Merjenje vsebnosti vlage z DVS aparaturo temelji na gravimetričnem sistemu, ki meri adsorpcijo in desorpcijo izredno majhnih količin vode v odvisnosti od relativne vlažnosti. Z DVS analizo dobimo kvalitativne in kvantitativne podatke o vezavi vode, kot na primer tvorbo ali izgubo hidratov, raztapljanje na površini vzorca ali pojav kapilarne kondenzacije.

Med spektroskopskimi metodami za določanje vode se v farmaciji največ uporabljata IR in NIR. Ti dve metodi sta primerni predvsem za organske molekule, ki ne vsebujejo alkoholov ali drugih OH skupin, ki bi povzročile prekrivanje karakterističnih pikov za vodo z drugimi OH nihanji.

6.2.4. Zaščita trdne farmacevtske oblike pred vlago

Farmacevtski izdelki so najbolj izpostavljeni zunanjim vplivom med transportiranjem in shranjevanjem, pri čemer lahko pride do precejšnjih sprememb temperature in vlažnosti okolja ter tudi do mehanskih poškodb. Mehanske vplive lahko zmanjšamo tako, da prazne prostore v vsebniku zapolnimo z inertnim polnilom, običajno z bombažno vato ali poliestrom, vendar pa lahko na ta način v vsebnik vnesemo dodatno vlago, ki se nahaja v polnilu (tudi do 10 % teže polnila je lahko vlaga).

Spremembe trdne farmacevtske oblike zaradi prisotnosti vlage lahko upočasnimo ali celo preprečimo predvsem z uporabo ustrezne ovojnine in dodatkom sušilnih sredstev v ovojnino.

Izbira ovojnine je odvisna od stabilnosti farmacevtske oblike, namena uporabe, klimatskega območja in prodajne strategije. Optimalno farmacevtsko obliko izberemo na podlagi rezultatov testiranja pospešene stabilnosti. Za dokončno potrditev ali podaljšanje roka uporabnosti potrebujemo tudi ustrezne rezultate dolgoročne stabilnosti farmacevtske oblike v izbrani stični ovojnini.

Trdne farmacevtske oblike pakiramo v pretisne omote, stekleničke in plastenke. Materiali za pretisne omote so aluminij, polivinilklorid (PVC), polivinilidenklorid (PVDC), polietilen (PE), Aclar laminati (poliklorotrifluoroetilen), polipropilen (PP) in drugi. Kot osnovni material za izdelavo plastenk uporabljamo predvsem polietilen visoke ali nizke gostote (HDPE in LDPE), polivinil klorid (PVC), polipropilen (PP), polietilen tetraftalat (PET) in druge. Pri izbiri materiala ovojnine upoštevamo občutljivost farmacevtske oblike na vlago, svetlobo, oksidacijo in druge zunanje vplive.

Med najpomembnejše zahteve za kakovostno ovojnino spada neprepustnost ovojnine za vlago. Glede na prepustnost ovojnine za vlago delimo ovojnino v štiri razrede, in sicer neprepustna, skoraj neprepustna, prepustna in zelo prepustna ovojnina (26).

Prepustnost vlage določamo tako, da vsebnik dobro zapremo in stehtamo. Nato ga dva tedna hranimo na kontroliranih pogojih (običajno 20 ± 2 °C in 75 ± 3 °C RV) in ponovno stehtamo. Glede na maso vsebnika pred in po testu ter glede na velikost

vsebnika izračunamo količino vlage (g), ki je prešla v ali iz vsebnika skozi določeno površino (m^2), v enem dnevu (d), kar izrazimo v enotah $[g / m^2 \cdot d]$. Prepustnost ovojnine za vlogo je odvisna predvsem od materiala in površine ovojnine (9).

Poleg uporabe neprepustne ovojnine za vlogo, lahko farmacevtski izdelek dodatno zaščitimo s pomočjo sušilnih sredstev (9). Sušilno sredstvo veže vlogo, ki zaradi prepustnosti ovojnine za vodo prihaja iz okolice, in tako vzdržuje nizko relativno vlažnost znotraj ovojnine, hkrati tudi veže vodo iz farmacevtske oblike in jo tako posuši. Kapaciteta sušilnega sredstva, to je količina vlage, ki jo sušilno sredstvo lahko veže, je odvisna od narave interakcij med vodo in sušilnim sredstvom (kemisorpcija, fizikalna adsorpcija), vrste in količine sušilnega sredstva, količine že vezane vode in temperature.

Kot sušilna sredstva največkrat uporabljamo silikagel, molekularna sita ali kombinacijo obeh. Mehanizem vezave vode tako pri silikagelu kot molekularnih sitih temelji na fizikalni adsorpciji. Intramolekularne vezi, ki se vzpostavijo med površino sušilnega sredstva in vlogo, so relativno šibke (van der Waalove vezi in elektrostatske interakcije). Nastanek teh interakcij je tipično eksotermnega značaja, zato moč interakcij določamo z merjenjem toplote, ki se sprosti pri adsorpciji. Večja kot je adsorpcijska toplota, močnejše so interakcije in težja je odstranitev vlage. Sušilna sredstva s svojo porozno strukturo odstranjujejo vlogo iz okolice z večplastno adsorpcijo na površini in kapilarno kondenzacijo. Pri večplastni adsorpciji se vodne molekule v tankih plasteh adsorbirajo na površino sušilnega sredstva, ki je zaradi porozne zgradbe zelo velika. Kapilarna kondenzacija je posledica padca tlaka v porah zaradi površinske napetosti, kar povzroči vdor vode v pore. Zaradi kapilarne kondenzacije se lahko voda nabira tudi v porah in razpokah farmacevtske oblike.

Silikagel je kemijsko silicijev dioksid z amorfnno porozno zgradbo. Pore so oblikovane iz naključno urejenih kanalčkov. Adsorbira lahko do 40 % vode glede na svojo celotno maso. Je izredno učinkovit pri temperaturah nižjih od 25 °C, z višanjem temperature pa se njegova adsorpcijska kapaciteta zmanjša. Hitrost adsorpcije narašča s povečevanjem vlažnosti okolja. Zaradi različno velikih por lahko poleg vode adsorbira tudi nekatere druge snovi, na primer amoniak, alkohole, aromate, parafine. Silikagel se kot sušilno

sredstvo pogosto uporablja tudi zato, ker je netoksičen in nekoroziven. Varnost njegove uporabe je potrjena tudi s strani FDA.

Molekularna sita so kemijsko natrijev aluminijev silikat s tridimenzionalno kristalinično porozno zgradbo. Pore so oblikovane iz urejenih kanalčkov in so po velikosti enake, kar omogoča adsorpcijsko selektivnost molekularnih sit. Adsorpcijska kapaciteta je zelo velika in praktično ni odvisna od vlažnosti okolja, zavisi pa od temperature, vendar v manjši meri kot pri silikagelu. Molekularna sita ponavadi vlago adsorbirajo hitreje kot silikagel in lahko odstranijo vso vlago iz sistema, medtem ko silikagel deluje bolj počasi in v sistemu pusti nekaj odstotkov rezidualne vlage.

Pri uporabi sušilnih sredstev moramo paziti na optimalno količino le teh, saj lahko prevelika količina izsuši farmacevtsko obliko, kar negativno vpliva na njene fizikalne lastnosti (krušljivost, razpadnost, hitrost sproščanja učinkovine), premajhna količina pa lahko slabo vpliva na kemijsko stabilnost zdravila. Upoštevati moramo kapaciteto sušilnega sredstva, velikost vsebnika in količino ter vlažnost vzorca.

7. NAMEN NALOGE

Osnovni namen študij stabilnosti je določanje roka uporabnosti in načina shranjevanja učinkovin in farmacevtskih izdelkov na osnovi testiranja kritičnih parametrov kakovosti, za katere menimo, da se lahko spreminjajo tekom shranjevanja, transportiranja in distribucije. Do sprememb prihaja zaradi delovanja različnih dejavnikov, ki lahko vplivajo na kakovost, varnost in učinkovitost farmacevtskega izdelka.

Namen diplomske naloge je preučiti vpliv različnih dejavnikov na vsebnost vode v trdnih farmacevtskih oblikah. V našem primeru so to pelete, polnjene v kapsule. Omejili se bomo na pogoje shranjevanja, velikost oziroma polnost plastenke in vsebnost učinkovine v kapsuli. V ta namen bomo vrednotili rezultate testiranja vzorcev treh jakosti, pakiranih v plastenke z različno velikostjo oziroma številom kapsul in staranih na različnih pogojih shranjevanja.

Najprej bomo preučevali vpliv pogojev shranjevanja na vsebnost vode v kapsulah. V ta namen bomo tabelarično prikazali rezultate vzorcev treh serij, za kapsule z 20 mg jakostjo, pakirane v DUMA plastenkah s 50-imi kapsulami in hranjene na pogojih pospešenega, vmesnega in dolgoročnega testiranja. V nadaljevanju bomo rezultate vmesnega in dolgoročnega testiranja stabilnosti obdelali z linearno regresijo in dobljene premice med seboj primerjali. S tem bomo preverili homogenost serij. V primeru homogenosti serij bodo vse nadaljnje ugotovitve pridobljene iz podatkov ene serije veljale tudi za drugi dve seriji. Hkrati bomo lahko premice posameznih serij vsakega pogoja združili v skupno regresijsko premico. Vpliv posameznega pogoja shranjevanja na vsebnost vode bomo tako ocenjevali na večjem številu podatkov, kar bo dalo večjo kredibilnost končni oceni. Na podlagi istih rezultatov bomo ugotavljali tudi, če obstaja korelacija med rezultati pospešenega, vmesnega in dolgoročnega testiranja.

Kot drugi kritični dejavnik bomo preučevali vpliv števila kapsul v plastenki na vsebnost vode, in sicer DUMA plastenk s 7-imi, 50-imi, 56-imi in 100-imi kapsulami. Vsaka plastenka, ne glede na velikost oziroma polnost, v pokrovu vsebuje enako količino sušilnega sredstva, katerega glavna naloga je vzdrževanje nizke relativne vlage v plastenki. Predvidevamo, da bo sušilno sredstvo najbolj učinkovito ravno v plastenkah z

najmanjšim številom kapsul in bo zato vsebnost vode v teh najnižja. Ovrednotili bomo rezultate s pogoja pospešenega testiranja, saj je na podlagi teh rezultatov najlažje oceniti določene spremembe. Uporabili bomo rezultate, pridobljene iz kapsul z 10 mg jakostjo in pakirane v DUMA platenke s 7-imi kapsulami. Z namenom potrditve ugotovitev iz rezultatov pospešenega testiranja bomo z linearno regresijo obdelali rezultate vmesnega in dolgoročnega testiranja za kapsule z 20 mg jakostjo, pri čemer bomo izdelali regresijske premice za platenke treh različnih polnosti (DUMA platenke s 7-imi, 50-imi in 100-imi kapsulami) in jih, če bo možno, med seboj primerjali.

Tretji kritični dejavnik, ki ga bomo preučevali, bo vsebnost učinkovine v kapsulah. Testirali bomo kapsule z 10 mg, 20 mg in 40 mg jakostjo. Rezultate vsebnosti vode v kapsulah posameznih jakosti, polnjenih v DUMA platenkah s 50-imi kapsulami in hranjenih na različnih pogojih, bomo tabelarično predstavili. Na podlagi teh rezultatov bomo ocenili vpliv vsebnosti učinkovine na vsebnost vode v kapsulah. Poleg tega bomo s primerjavo regresijskih premic, ki jih bomo izdelali za 10 mg, 20 mg in 40 mg jakost kapsul, pakiranih v DUMA platenke s 7-imi in 50-imi kapsulami in hranjenimi pri različnih pogojih, ugotavljali vpliv vsebnosti učinkovine na vsebnost vode v odvisnosti od polnosti platenke in pogojev shranjevanja. S tem bomo ovrednotili vplive vseh treh kritičnih dejavnikov na vsebnost vode v kapsulah hkrati, kar bo podkrepilo vse prejšnje ugotovitve.

Ker je učinkovina, vgrajena v pelete, zelo občutljiva na vlago, predvidevamo, da bo stabilnost kapsul odvisna predvsem od vsebnosti vode. Da bi potrdili naša predvidevanja, bomo ugotavljali korelacijo med razkrojnimi produkti in vsebnostjo vode v kapsulah, in sicer za vsako jakost kapsul posebej. Uporabili bomo 6-mesečne rezultate pospešenega testiranja (pogoj 40/75) treh serij kapsul posameznih jakosti, pakiranih v DUMA platenke s številom kapsul 7, 50, 56 in 100.

Pričakujemo, da bomo z obdelavo podatkov vmesne in dolgoročne stabilnosti z linearno regresijo potrdili oceno vplivov posameznih dejavnikov na stabilnost farmacevtske oblike, ki smo jo dobili na podlagi pospešenega testiranja. S tem bomo potrdili pomen oziroma smiselnost izvajanja pospešenega testiranja stabilnosti.

8. MATERIALI IN METODE

8.1. MATERIALI

8.1.1. Podatki o učinkovini in testiranih vzorcih

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili učinkovino, ki je, vgrajena v farmacevtsko obliko, zelo občutljiva na vlago in povišano temperaturo. Vgrajena je v pelete, ki so polnjene v kapsule iz hidroksipropil metilceluloze (HPMC).

Testiranje smo izvajali na kapsulah z različno vsebnostjo učinkovine, in sicer 10 mg, 20 mg in 40 mg. Testirali smo po tri serije vsake jakosti.

Kapsule so bile pakirane v polietilenske (HDPE) platenke novega proizvajalca (DUMA platenke) po 7, 50, 56 in 100 kapsul v platenki s sušilnim sredstvom v pokrovu. Skupna masa sušilnega sredstva v platenki je 2 g, in sicer 1g molekularnih sit in 1g silikagela.

8.1.2. Reagenti in topila

Uporabljali smo reagente in topila različnih proizvajalcev:

- Metanol (Merck, Fluka)
- Formamid (Merck)
- Hydranal pufer (reagent za pripravo topila za določanje vode s KF metodo, Riedel-deHaën)
- Karl – Fischer reagent 5 (Riedel-deHaën)

8.2. APARATURE

- Aparatura za določanje vsebnosti vode 784 KFP TITRINO
- Tehnica (Mettler Toledo)

- Klimatske komore, ki vzdržujejo nadzorovane pogoje $40 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C} / 75 \pm 5 \text{ \% RV}$, $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C} / 75 \pm 5 \text{ \%}$ in $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C} / 65 \pm 5 \text{ \% RV}$
- Klimatiziran prostor z nadzorovanimi pogoji $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C} / 60 \pm 5 \text{ \% RV}$

8.3. POGOJI TESTIRANJA IN PRIPRAVA VZORCEV

Testiranje pospešene, vmesne in dolgoročne stabilnosti smo izvajali vzporedno na vseh vzorcih v skladu z ICH smernicami, stabilnostnim protokolom in specifikacijo. Termini analiz so bili določeni v skladu z ICH smernicami (3). Vsa dolgoročna testiranja se bodo izvajala do treh let, vendar so v nalogo vključeni le 12-mesečni rezultati. Pogoji testiranja in časovni intervali analiz, ki smo jih v nalogi obdelali, so navedeni v razpredelnici I.

Razpredelnica I: Pogoji testiranja in časovni intervali analiz

| Vrsta testiranja stabilnosti | Pogoj testiranja | Časovni interval analiz |
|------------------------------|--|-------------------------|
| Pospešeno | $40 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C} / 75 \pm 5 \text{ \% RV}$ | 0, 3, 6 mesecev |
| Dolgoročno – cona IVb | $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C} / 75 \pm 5 \text{ \% RV}$ | 0, 3, 6, 9, 12 mesecev |
| Dolgoročno – cona III in IVa | $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C} / 65 \pm 5 \text{ \% RV}$ | 0, 3, 6, 9, 12 mesecev |
| Dolgoročno – cona I in II | $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C} / 60 \pm 5 \text{ \% RV}$ | 0, 3, 6, 9, 12 mesecev |

Vzorci oziroma platenke smo označili z nalepkami, na katere smo navedli ime učinkovine, dozo, farmacevtsko obliko, identifikacijsko številko in datum pričetka staranja. Vzorci smo po določenem času (glej časovni interval analiz) vzeli iz pogojev shranjevanja in jim določili vsebnost vode.

8.4. METODE

8.4.1. Določanje vsebnosti vode po Karl Fischerju

Vsebnost vode v peletah smo določili s Karl Fischer titracijo, ki omogoča določanje vode v tekočinah. Preden smo začeli z meritvami, smo izvedli kalibracijo aparature za določanje vode po KF, pri čemer smo kot topilo uporabili metanol. V titrno celico smo

vnesli približno 30 µg demineralizirane vode in izvedli titracijo s titrnim reagentom Karl Fischer reagent 5. To smo ponovili še štirikrat. Titrator je samodejno izračunal relativni standardni odmik (RSD) vseh petih vrednosti, ki ni smel presegati 1,0 %. Po uspešni kalibraciji smo pričeli z določanjem vsebnosti vode v vzorcih. Kot topilo smo uporabili mešanico metanola, formamida in hydranal pufra. Natehtali smo približno 500 mg pelet in jih vsuli v titrno celico s topilom. Titracijo smo izvedli z istim titrnim reagentom kot kalibracijo. Ekstrakcijski čas smo naravnali na 800 sekund. Po končani titraciji je titrator avtomatsko izračunal vsebnost vode v peletah. Rezultate smo vrednotili po zadnji interni specifikaciji (predpis USP, Lek). Vsebnost vode ne sme presegati 1,5 % celotne mase vzorca.

8.4.2. Obdelava stabilnostnih podatkov z linearno regresijo

Za obdelavo stabilnostnih podatkov smo uporabili program STAB_LEK (29). Gre za validiran Excelov program, ki omogoča določanje roka uporabnosti po principu linearne regresije, intervalov zaupanja srednje vrednosti in primerjave regresijskih premic. Rezultate prikaže tabelarično in grafično. Značilnost programa je velika prožnost, saj lahko izpise, grafične predstavitve, posamezne parametre in izračune prilagajamo trenutnim potrebam. Ta program sicer ni regulatorno potrjen, vendar je bilo ugotovljeno, da daje enake rezultate kot validiran in zaščiten Excelov program STAT_FDA, ki je skladen z FDA priporočili.

Program uporabljamo tako, da v za to namenjena polja vnesemo vrednosti x (časovne točke), vrednosti y (merjen parameter) in specifikacijsko mejo ter definiramo polja, ki so potrebna za izračun roka uporabnosti. Na osnovi teh podatkov program izračuna rok uporabnosti za posamezne premice in s testom signifikantnosti primerja naklone in odseke premic. Če se ti med seboj bistveno ne razlikujejo, premice združi v skupno regresijsko premico in na osnovi te izračuna rok uporabnosti. Po priporočilih ICH smernic smo premicam določali 95% interval zaupanja srednje vrednosti, nivo signifikantnosti pa nastavili na 0,25.

9. REZULTATI IN RAZPRAVA

Vrednotenje stabilnostnih podatkov vsebnosti vode v kapsulah vključuje tabelarični in, če je smiselno, tudi grafični prikaz rezultatov ter obdelavo podatkov dolgoročne in vmesne stabilnosti z linearno regresijo. Podatki pospešene stabilnosti so nam služili za hitro oceno vplivov posameznih dejavnikov, ki smo jih potrdili z linearno regresijo oziroma primerjavo premic, dobljenih na osnovi podatkov dolgoročne in vmesne stabilnosti.

Ovrednotili smo naslednje dejavnike:

- pogoj shranjevanja (40/75, 30/75, 30/65, 25/60)
- število kapsul v enoti ovojnine (DUMA plastenke s številom kapsul 7, 50, 56, 100)
- vsebnost učinkovine v eni kapsuli (10, 20, 40 mg)

Poleg vrednotenja kritičnih dejavnikov smo glede na to, da smo testirali po tri serije vsakega vzorca, preverili tudi homogenost serij.

Končno smo iz dobljenih rezultatov ugotavljali še vpliv vode na stabilnost izdelka, in sicer tako, da smo poiskali korelacijo med vsebnostjo vode in razpadnimi produkti učinkovine.

9.1. VSEBNOST VODE V ODVISNOSTI OD POGOJEV SHRANJEVANJA

9.1.1. Primerjava rezultatov pri pogojih 40/75, 30/75, 30/65 in 25/60

Eden izmed namenov shranjevanja vzorcev pri različnih pogojih glede na temperaturo in relativno vlažnost je ugotoviti, kolikšen vpliv imata ta dva dejavnika na vsebnost vode v peletah. Poleg tega nas zanima, če so rezultati pospešenega testiranja stabilnosti primerljivi z rezultati dolgoročnega in vmesnega testiranja. Vsebnost vode naj ne bi v nobenem primeru presegla vrednosti 1,5 % celotne mase.

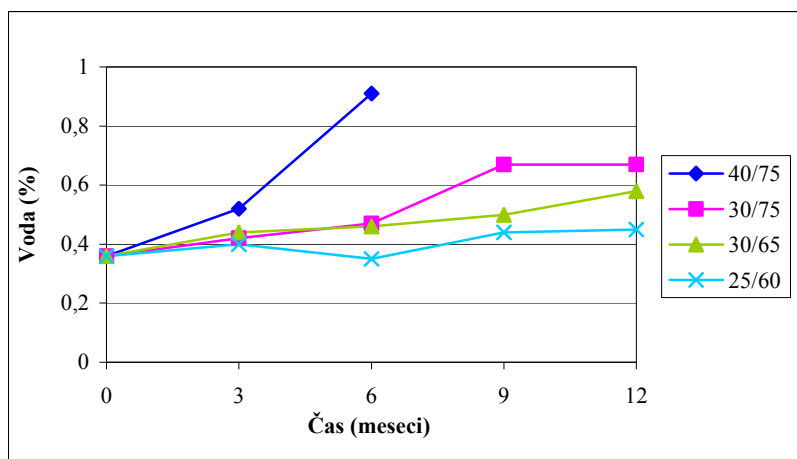
Rezultati testiranja, izvedenega na treh serijah, pod pogoji navedenimi v poglavju 8.3., so zbrani v razpredelnici II.

Razpredelnica II: Vsebnost vode v 20 mg kapsulah, pakiranih v plastenkah DUMA 50, hranjenih pri različnih pogojih

| | | | | | |
|--------------|-----------|----------|-----------|-----------|------------|
| 40/75 | 0 mesecev | 3 meseci | 6 mesecev | 9 mesecev | 12 mesecev |
| Seriya 1 | 0,37 % | 0,43 % | 0,86 % | | |
| Seriya 2 | 0,35 % | 0,55 % | 0,71 % | | |
| Seriya 3 | 0,36 % | 0,52 % | 0,91 % | | |
| 30/75 | 0 mesecev | 3 meseci | 6 mesecev | 9 mesecev | 12 mesecev |
| Seriya 1 | 0,37 % | 0,36 % | 0,43 % | 0,66 % | 0,62 % |
| Seriya 2 | 0,35 % | 0,38 % | 0,43 % | 0,52 % | 0,66 % |
| Seriya 3 | 0,36 % | 0,42 % | 0,47 % | 0,67 % | 0,67 % |
| 30/65 | 0 mesecev | 3 meseci | 6 mesecev | 9 mesecev | 12 mesecev |
| Seriya 1 | 0,37 % | 0,33 % | 0,42 % | 0,46 % | 0,59 % |
| Seriya 2 | 0,35 % | 0,36 % | 0,34 % | 0,60 % | 0,60 % |
| Seriya 3 | 0,36 % | 0,44 % | 0,46 % | 0,50 % | 0,58 % |
| 25/60 | 0 mesecev | 3 meseci | 6 mesecev | 9 mesecev | 12 mesecev |
| Seriya 1 | 0,37 % | 0,35 % | 0,31 % | 0,43 % | 0,43 % |
| Seriya 2 | 0,35 % | 0,35 % | 0,29 % | 0,45 % | 0,40 % |
| Seriya 3 | 0,36 % | 0,40 % | 0,35 % | 0,44 % | 0,45 % |

Iz razpredelnice je razvidno, da imajo vzorci, ki so bili hranjeni pri pogoju 40/75, najvišje vsebnosti vode. Vzorci, hranjeni pri pogojih 30/75 in 30/65, imajo nižje vsebnosti vode kot vzorci pospešenega testiranja, vendar nekoliko višje kot vzorci dolgoročnega testiranja (25/60), ki imajo najnižje vsebnosti vode. Naraščanje vsebnosti vode s časom v odvisnosti od pogojev shranjevanja za serijo 3 prikazuje Slika 2. Ti rezultati potrdijo vpliv temperature in relativne vlažnosti na vsebnost vode. In sicer, ostrejši kot so pogoji, večja je relativna vlažnost v plastenki in posledično večja je vsebnost vode v peletah.

Dobljeni rezultati so med drugim tudi posledica prisotnosti sušilnega sredstva, ki vzdržuje nizko relativno vlažnost znotraj ovojnine in hkrati posuši kapsule ter tako zmanjša vpliv začetne vsebnosti vlage v peletah (9). Tako pri vzorcih iz pogoja 25/60 po šestih mesecih testiranja, v primerjavi z začetnimi vrednostmi, opazimo celo padec vsebnosti vode. Najbolj viden porast vode je pri vzorcih iz pogoja 40/75 po šestih mesecih. Zaradi ostrejših pogojev sušilno sredstvo veže večje količine vode, zaradi česar se njegova učinkovitost sušenja hitro zmanjša ali celo izgubi. Posledica je večja relativna vlažnost znotraj plastenke in povečana vezava vode v peletah.

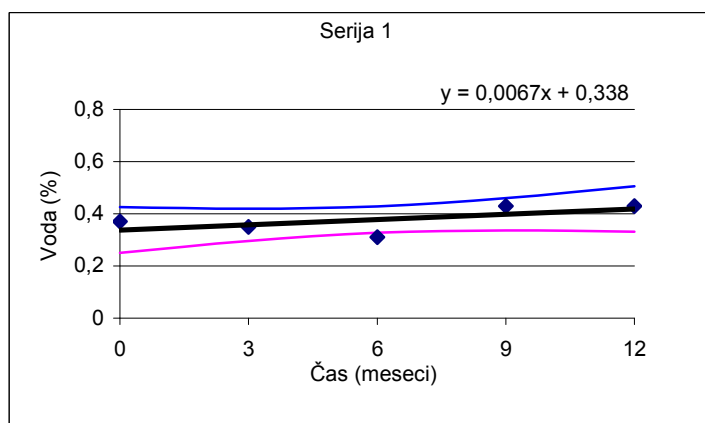


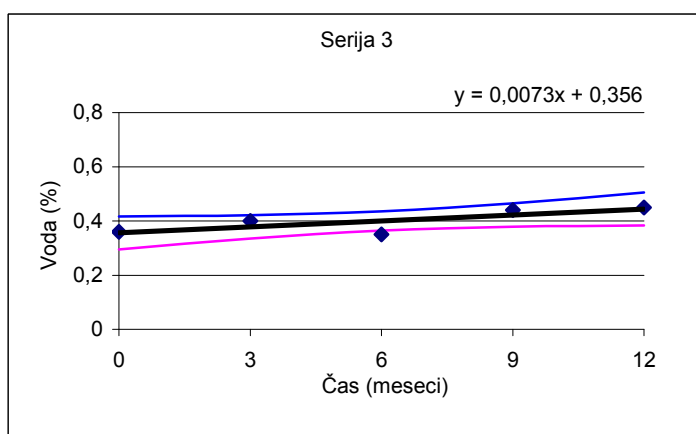
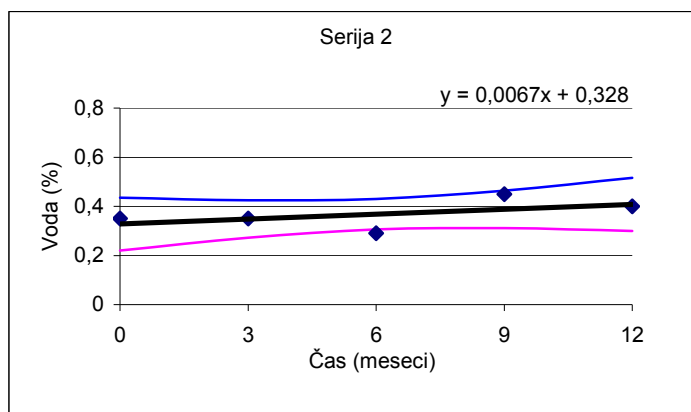
Slika 2: Vsebnost vode v peletah pri različnih pogojih shranjevanja – serija 3

Podoben trend naraščanja vsebnosti vode v odvisnosti od pogoja shranjevanja smo dobili tudi pri 10 mg in 40 mg jakosti kapsul in pri drugih ovojninah (DUMA plastenke s številom kapsul 7, 56, 100). Iz razpredelnice je razvidna tudi primerljivost rezultatov med posameznimi serijami, kar lahko preverimo s statistično obdelavo podatkov s pomočjo linearne regresije. Glede na to, da med nakloni in odseki regresijskih premic posameznih serij ni bistvenih razlik, potrdimo homogenost testiranih serij.

9.1.2. Linearna regresija: primerjava premic pri pogoju 25/60

Z linearno regresijo smo obdelali rezultate serij 1, 2 in 3, za kapsule z 20 mg jakostjo, pakirane v DUMA plastenke s 50-imi kapsulami in hranjene pri pogoju dolgoročnega testiranja (25/60). Slika 3 prikazuje regresijske premice z intervali zaupanja za vsako serijo posebej.





Slika 3: Regresijske premice za posamezne serije 1, 2 in 3 (pogoj 25/60)

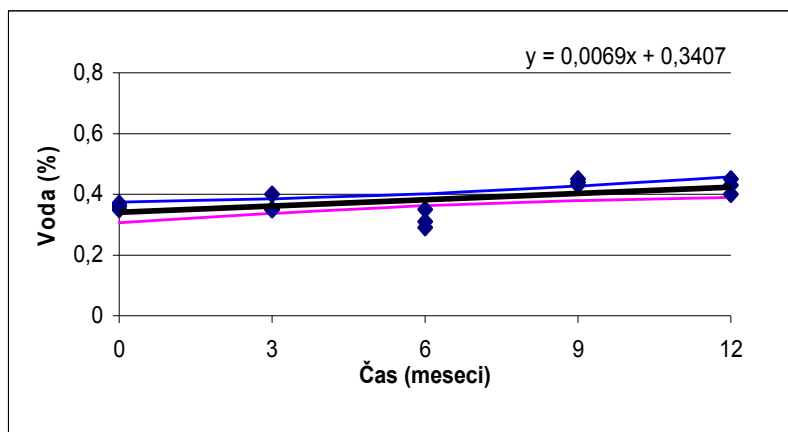
Program STAB_LEK je avtomatsko primerjal regresijske premice tako, da je določil enačbe posameznih premic ($y = b \cdot x + a$) in primerjal njihove naklone b in odseke na ordinatni osi a :

$$\begin{array}{lll}
 y_1 = 0,0067x_1 + 0,338 & b_1 = 0,0067 & a_1 = 0,338 \\
 y_2 = 0,0067x_2 + 0,328 & b_2 = 0,0067 & a_2 = 0,328 \\
 y_3 = 0,0073x_3 + 0,356 & b_3 = 0,0073 & a_3 = 0,356
 \end{array}$$

Pri primerjavi naklonov smo dobili izračun vrednosti $F_b = 0,006$ in $F_{teor} = 1,624$. Verjetnost F-porazdelitve za izračunano vrednost F_b je $p = 0,994$, kar je večje od nivoja signifikantnosti 0,25, torej velja, da med nakloni ni bistvenih razlik.

Pri primerjavi odsekov smo dobili naslednje vrednosti: $F_a = 0,710$, $F_{teor} = 1,577$ in $p = 0,513$, kar je večje od mejne vrednosti 0,25, torej tudi med odseki ni bistvenih razlik.

Primerljivost naklonov in odsekov omogoča združitvev premic v skupno regresijsko premico, na osnovi katere lahko določimo rok uporabnosti (Slika 4).



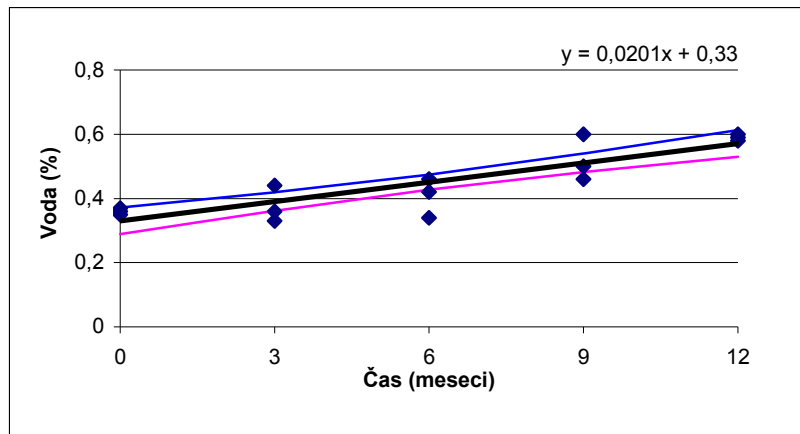
Slika 4: Skupna regresijska premica podatkov iz pogoja 25/60

Ker vsebnost vode s časom narašča, rok uporabnosti določimo na osnovi zgornjega intervala zaupanja srednje vrednosti skupne regresijske premice. Po smernici Q1E je čas roka uporabnosti enak točki na x-osi, kjer zgornji interval zaupanja seka zgornjo specifikacijsko mejo (11). Naša analiza je obsegala obdobje enega leta, kar je premalo za določanje roka uporabnosti, kar pa tudi ni namen diplomske naloge. Je pa iz primerjave intervalov zaupanja posameznih in skupne premice možno ugotoviti, da je interval zaupanja skupne premice ožji od intervala zaupanja vsake od posameznih premic, kar vodi do daljšega roka uporabnosti. Poleg tega se iz Slike 4 lepo vidi, da zgornji interval zaupanja še dolgo časa ne bo sekal specifikacijske meje 1,5 %, kar kaže na zelo dolg rok uporabnosti. Ne glede na rezultate pa regulativa ne dovoljuje podaljšanja napovedanega roka uporabnosti za več kot 12 mesecev od obdobja izvajanja dolgoročnega testiranja stabilnosti.

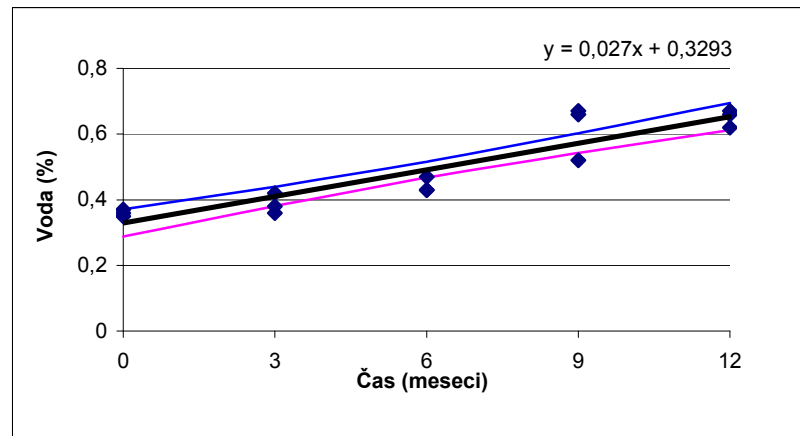
Z linearno regresijo smo obdelali tudi podatke, pridobljene na vzorcih, shranjenih pri pogojih 30/65 in 30/75.

9.1.3. Linearna regresija: primerjava premic pri pogojih 30/65 in 30/75

Statistična obdelava podatkov, ki smo jih pridobili z analizo vzorcev treh serij, hranjenih pri pogojih 30/65 in 30/75, je pokazala, da tudi v teh dveh primerih med nakloni in odseki premic posameznih serij ni bistvenih razlik. To nam omogoča združitev premic v skupno regresijsko premico, kar prikazuje Slika 5 za pogoj 30/65 in Slika 6 za pogoj 30/75.



Slika 5: Skupna regresijska premica podatkov iz pogoja 30/65



Slika 6: Skupna regresijska premica podatkov iz pogoja 30/75

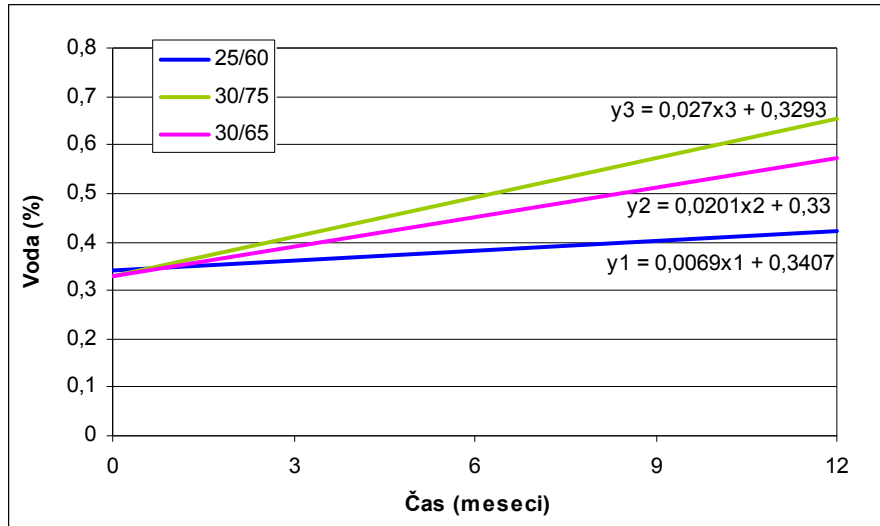
9.1.4. Primerjava skupnih premic pri različnih pogojih

V točki 9.1.1. smo ugotovili, da vsebnost vode v peletah narašča z višanjem temperature in relativne vlažnosti, pri katerih vzorce hranimo. To želimo potrditi tudi s primerjavo skupnih regresijskih premic pri različnih pogojih shranjevanja.

| | | | |
|---------------|----------------------------|----------------|----------------|
| 25/60: | $y_1 = 0,0069x_1 + 0,3407$ | $b_1 = 0,0069$ | $a_1 = 0,3407$ |
| 30/65: | $y_2 = 0,0201x_2 + 0,3300$ | $b_2 = 0,0201$ | $a_2 = 0,3300$ |
| 30/75: | $y_3 = 0,0270x_3 + 0,3293$ | $b_3 = 0,0270$ | $a_3 = 0,3293$ |

Pri primerjavi naklonov vidimo, da naklon premic s pogojem narašča ($b_3 > b_2 > b_1$). Večji kot je naklon, bolj strma je premica, kar pomeni hitrejše naraščanje vsebnosti vode v peletah v odvisnosti od časa. Torej, pri pogoju 30/75 je naklon največji in premica najbolj strma, kar pomeni, da vsebnost vode s časom narašča hitreje kot pri

pogojih 30/65 in 25/60. Najmanjši naklon ima premica pri pogoju 25/60, kjer vsebnost vode v 12-ih mesecih najmanj naraste. Trend naraščanja vsebnosti vode v odvisnosti od pogoja kaže Slika 7.



Slika 7: Primerjava skupnih regresijskih premic pri različnih pogojih shranjevanja

Dobljeni rezultati so potrdili homogenost serij in korelacijo med pogoji. Velja naslednja zveza med rezultati: vrednosti rezultatov 6-mesečnega pospešenega testiranja (40/75) so višji od 12-mesečnega vmesnega testiranja pri pogoju 30/75, ti so višji od 12-mesečnih rezultatov vmesnega testiranja pri pogoju 30/65 in ti so višji od rezultatov 12-mesečnega dolgoročnega testiranja (25/60). To se odraža tudi v vrednostih vsebnosti vode (primer serije 1): 0,86 % > 0,62 % > 0,59 % > 0,43%, pri čemer vidimo, da je najvišja vrednost ravno dvakrat večja od najnižje. Iz tega sledi, da lahko na podlagi pospešenega testiranja napovemo, kolikšne vrednosti lahko pričakujemo po dvanajstih mesecih dolgoročnega in tudi vmesnega testiranja vsebnosti vode v kapsulah.

9.2. VSEBNOST VODE GLEDE NA ŠTEVILO KAPSUL V PLASTENKI

Vsebnost vode smo določali peletam, ki so bile polnjene v različno velike plastenke z različnim številom kapsul, in sicer v DUMA plastenke s 7-imi, 50-imi, 56-imi in 100-imi kapsulami. Glede na to, da ima vsaka plastenka ne glede na volumen in število kapsul enako količino sušilnih sredstev v pokrovu, lahko med plastenkami z različnim

številom kapsul pričakujemo različne rezultate. V tabeli III so prikazani volumni platenk in pripadajoče število kapsul z različno vsebnostjo učinkovine.

Razpredelnica III: Volumen v ml za platenke z vsebnostjo učinkovine 10 mg, 20 mg in 40 mg

| Število kapsul | 7 | 50 | 56 | 100 |
|----------------|----|----|----|-----|
| 10 mg | 15 | 35 | 50 | 75 |
| 20 mg | 15 | 60 | 50 | 75 |
| 40 mg | 15 | 75 | 75 | |

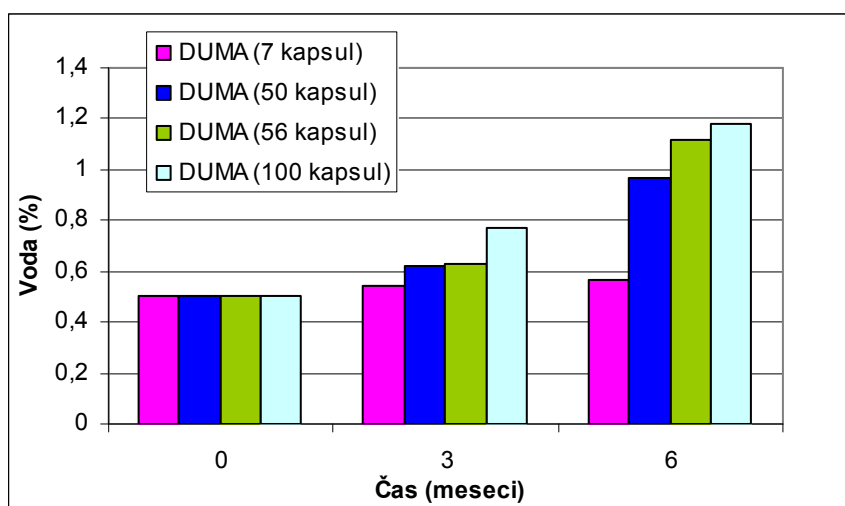
9.2.1. Pregled rezultatov pri pogoju 40/75

Vpliv števila kapsul v enoti ovojnine na vsebnost vode smo določali na kapsulah vseh treh jakosti, vendar smo predstavili in vrednotili le rezultate kapsul z vsebnostjo učinkovine 10 mg (serija 2), hranjenimi na pogoju 40/75, saj so ti rezultati najbolj reprezentativni. Vse platenke, v katere so polnjene 10 mg kapsule, se namreč razlikujejo po volumnu in večje kot je število kapsul v platenki, večji je volumen platenke (Razpredelnica III). Rezultati so zbrani v razpredelnici IV.

Razpredelnica IV: Vsebnost vode v 10 mg kapsulah serije 2, hranjenih pri pogoju 40/75 v različnih platenkah

| Število kapsul | 0 mesecev | 3 meseci | 6 mesecev |
|----------------|-----------|----------|-----------|
| 7 | 0,50 % | 0,54 % | 0,57 % |
| 50 | 0,50 % | 0,62 % | 0,97 % |
| 56 | 0,50 % | 0,63 % | 1,12 % |
| 100 | 0,50 % | 0,77 % | 1,18 % |

Iz tabele vidimo, da vsebnost vode narašča s številom kapsul na platenko. Največje vrednosti smo določili v platenkah s 100-imi kapsulami, najmanjše vrednosti pa v platenkah, v katerih je le 7 kapsul. Boljši pregled nam daje Slika 8, ki prikazuje stolpični diagram, na katerem se lepo vidi trend naraščanja vsebnosti vode s številom kapsul na platenko.



Slika 8: Vpliv števila kapsul v enoti plastenke na vsebnost vode

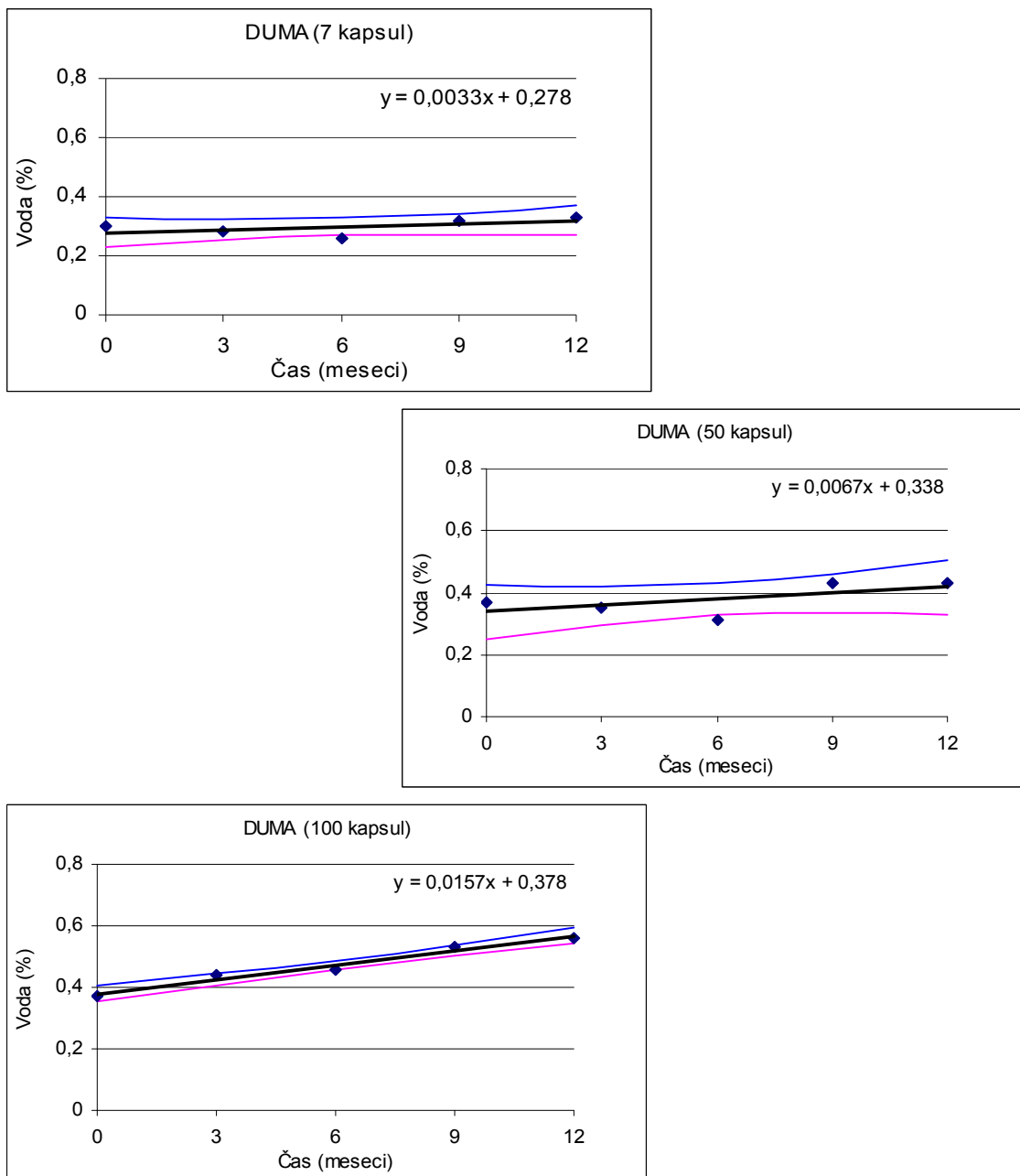
Vzrok naraščanja vsebnosti vode s številom kapsul na plastenko je izraba sušilnega sredstva. Sušilno sredstvo ima dvojno delovanje, in sicer, da veže vodo iz kapsul in vodo, ki prehaja v plastenko iz okolice zaradi prepustnosti ovojnine za vlago. S časom se učinkovitost vezave vode na sušilno sredstvo zmanjša oziroma izgubi, saj sušilno sredstvo izrabi svojo kapaciteto vezave vode (9).

V primeru manjšega števila kapsul je začetna količina vode manjša, zato sušilno sredstvo počasneje izrablja svojo kapaciteto vezave vode. Posledica tega je manjša relativna vlaga znotraj plastenke. V primeru večjega števila kapsul na plastenko sušilno sredstvo veže večjo količino začetne vode, zaradi česar se njegova zmogljivost vezave vode hitreje zmanjšuje in manj časa vzdržuje minimalno relativno vlažnost v obojnini. Večja relativna vlažnost znotraj ovojnine pa pomeni večjo vsebnost vode v peletah. Pri dani količini sušilnega sredstva torej vsebnost vode narašča s številom kapsul v plastenki.

Relativna vlaga znotraj plastenke je odvisna tudi od prepustnosti plastenke za vlago (30). Raziskave, ki so bile izvedene na podobnih plastenkah (enak material, različni volumni), kot smo jih uporabili v diplomski nalogi, so pokazale, da na prepustnost plastenk vpliva površina plastenke (31). Plastenke z večjim volumnom imajo večjo površino in večjo prepustnost za vlago. Razlike so sicer majhne, vendar lahko večji volumen ovojnine prispeva svoj delež k porastu vode v peletah.

9.2.2. Linearna regresija rezultatov pri pogoju 25/60

Vpliv velikosti oziroma polnosti plastenke smo ovrednotili tudi z linearno regresijo. Uporabili smo rezultate serije 1 kapsul z vsebnostjo učinkovine 20 mg, iz pogoja 25/60, in sicer za DUMA plastenke s številom kapsul 7, 50 in 100 (Slika 9).



Slika 9: Posamezne regresijske premice dolgoročne stabilnosti (25/60) za različno velike plastenke

S pomočjo enačb posameznih premic smo primerjali naklone b in odseke na ordinatni osi a .

| | | | |
|---------------------------|---------------------------|----------------|---------------|
| DUMA (7 kapsul): | $y_1 = 0,0033x_1 + 0,278$ | $b_1 = 0,0033$ | $a_1 = 0,278$ |
| DUMA (50 kapsul): | $y_2 = 0,0067x_2 + 0,338$ | $b_2 = 0,0067$ | $a_2 = 0,338$ |
| DUMA (100 kapsul): | $y_3 = 0,0157x_3 + 0,378$ | $b_3 = 0,0157$ | $a_3 = 0,378$ |

Pri primerjavi naklonov smo dobili izračun vrednosti $F_b = 3,382$, $F_{teor} = 1,624$ in $p = 0,080$, kar je manjše od meje signifikantnosti 0,25. To pomeni, da med nakloni posameznih premic obstajajo bistvene razlike. Hkrati se razlikujejo tudi odseki ($F_a = 24,431$, $F_{teor} = 1,577$ in $p = 0,000$, kar je manjše od 0,25). Premic ne združujemo v skupno regresijsko premico.

Bistvene razlike med nakloni in odseki so prisotne tudi pri pogoju 30/65. Statistične analize z linearno regresijo za pogoj 30/75 nismo izvajali, saj smo pri tem pogoju shranjevali le DUMA plastenke s 7-imi in 50-imi kapsulami.

Dobljeni rezultati so bili glede na ugotovitve v točki 9.2.1. pričakovani. Število kapsul na platenko bistveno vpliva na vsebnost vode v peletah. Na to kažejo tudi vrednosti naklonov posameznih premic. Največji naklon ima premica za DUMA platenko s 100-imi kapsulami ($b_3 = 0,0157$), manjšega premica za DUMA platenko s 50-imi kapsulami ($b_2 = 0,0067$) in najmanjšega premica za DUMA platenko s 7-imi kapsulami ($b_1 = 0,0033$). V praktičnem smislu to pomeni najhitrejši porast vsebnosti vode pri DUMA platenkah s številom kapsul 100 in najpočasnejši porast pri DUMA platenkah s številom kapsul 7, kar potrjuje ugotovitev, da vsebnost vode v peletah narašča s številom kapsul na platenko pri dani količini sušilnega sredstva.

9.3. VSEBNOST VODE V ODVISNOSTI OD VSEBNOSTI UČINKOVINE V PELETAH

9.3.1. Pregled rezultatov vsebnosti vode v 10, 20 in 40 mg kapsulah

Stabilnostne teste smo izvajali na vzorcih z različnimi vsebnostmi učinkovine, in sicer 10 mg, 20 mg in 40 mg. Zanimalo nas je, ali vsebnost učinkovine vpliva na vsebnost vode v peletah in kako.

Vedeti moramo, da 20 mg kapsula vsebuje dvakrat večjo količino enakih pelet kot 10 mg kapsula, zato je tudi prostornina 20 mg kapsule večja. Tako je v 10 mg kapsuli 125 mg pelet in v 20 mg kapsuli 250 mg enakih pelet. 40 mg kapsula pa se od 10 mg in 20 mg kapsule razlikuje po sestavi pelet. 40 mg kapsula vsebuje 265 mg pelet, od tega 40 mg učinkovine in 225 mg polnila. Se pravi, da je v primerjavi z 20 mg kapsulo v njej 20 mg več učinkovine in 5 mg manj polnila, in sicer laktoze. Količina ostalih pomožnih sredstev je enaka. Zaradi velike občutljivosti učinkovine na vlago, so bile vse pomožne snovi predhodno sušene, s čimer zmanjšamo začetno vsebnost vode v peletah. Dodatno so bile posušene tudi polnjene kapsule.

Rezultati določanja vsebnosti vode v kapsulah različnih jakosti, polnjenih v DUMA plastenkah s 50-imi kapsulami, serije 1, so zbrani v razpredelnici V.

Razpredelnica V: Vsebnost vode v 10 mg, 20 mg in 40 mg kapsulah, hranjenih v DUMA plastenkah s 50-imi kapsulami, pri različnih pogojih in porast vsebnosti vode v primerjavi z začetno vrednostjo

| 40/75 | 0 mesecev | 3 meseci | 6 mesecev | | | Porasti |
|--------------|-----------|----------|-----------|-----------|------------|----------------|
| 10 mg | 0,50 % | 0,61 % | 0,69 % | | | 0,19 % |
| 20 mg | 0,37 % | 0,43 % | 0,86 % | | | 0,49 % |
| 40 mg | 0,40 % | 0,66 % | 1,03 % | | | 0,63 % |
| 30/75 | 0 mesecev | 3 meseci | 6 mesecev | 9 mesecev | 12 mesecev | |
| 10 mg | 0,50 % | 0,56 % | 0,58 % | 0,56 % | 0,68 % | 0,18 % |
| 20 mg | 0,37 % | 0,36 % | 0,43 % | 0,66 % | 0,62 % | 0,25 % |
| 40 mg | 0,40 % | 0,59 % | 0,65 % | 0,79 % | 1,03 % | 0,63 % |
| 30/65 | 0 mesecev | 3 meseci | 6 mesecev | 9 mesecev | 12 mesecev | |
| 10 mg | 0,50 % | 0,56 % | 0,54 % | 0,62 % | 0,57 % | 0,07 % |
| 20 mg | 0,37 % | 0,33 % | 0,42 % | 0,46 % | 0,59 % | 0,22 % |
| 40 mg | 0,40 % | 0,51 % | 0,65 % | 0,67 % | 0,97 % | 0,57 % |
| 25/60 | 0 mesecev | 3 meseci | 6 mesecev | 9 mesecev | 12 mesecev | |
| 10 mg | 0,50 % | 0,55 % | 0,53 % | 0,56 % | 0,56 % | 0,06 % |
| 20 mg | 0,37 % | 0,35 % | 0,31 % | 0,43 % | 0,43 % | 0,06 % |
| 40 mg | 0,40 % | 0,54 % | 0,60 % | 0,54 % | 0,69 % | 0,29 % |

Iz rezultatov začetnih vsebnosti vode v kapsulah različnih jakosti opazimo velike razlike, ki so posledica neenakomernega sušenja sestavin in/ali končne farmacevtske oblike. To nam otežuje primerjavo dejanskih vrednosti vsebnosti vode, zato je smiselna primerjava porastov vsebnosti vode. Porasti so prav tako podani v preglednici V. Pri pogoju 40/75 je vsebnost vode v šestih mesecih pri 10 mg kapsulah narasla za 0,19 %, pri 20 mg za 0,49 % in pri 40 mg za 0,63 %. Največji porast vsebnosti vode imamo torej

pri 40 mg kapsulah, nekoliko manjši pri 20 mg kapsulah in najmanjši pri 10 mg kapsulah. Podobno velja tudi za ostale pogoje. Iz tega lahko sklepamo, da večja kot je masa pelet oziroma vsebnost učinkovine v kapsuli, več vlage se veže in višje vrednosti vode določimo. Povedano drugače, vsebnost vode narašča z vsebnostjo učinkovine v peletah, kar je povezano s higroskopnostjo učinkovine v prisotnosti pomožnih snovi.

9.3.2. Linearna regresija rezultatov 10, 20 in 40 mg kapsul pri pogojih 25/60, 30/65 in 30/75

Z linearno regresijo smo obdelali podatke prve serije kapsul vseh treh jakosti, pakiranih v DUMA platenke s 7-imi in 50-imi kapsulami, hranjenih pri pogojih 30/75, 30/65 in 25/60. Pri tem smo izdelali posamezne premice za kapsule z 10 mg, 20 mg in 40 mg jakostjo in primerjali njihove naklone in odseke. Namen tega je bilo ugotavljanje vpliva vsebnosti učinkovine v kapsulah na vsebnost vode v odvisnosti od pogojev shranjevanja in vrste ovojnine. Naše ugotovitve prikazuje razpredelnica VI.

Razpredelnica VI: Primerjava naklonov in odsekov regresijskih premic za kapsule 10 mg, 20 mg in 40 mg jakosti za platenke DUMA 7 in DUMA 50, hranjenih pri različnih pogojih

| | 25/60 | 30/65 | 30/75 |
|------------------|----------|----------|----------|
| Nakloni | | | |
| DUMA (7 kapsul) | Enaki | Različni | Različni |
| DUMA (50 kapsul) | Različni | Različni | Različni |
| Odseki | | | |
| DUMA (7 kapsul) | Različni | Različni | Različni |
| DUMA (50 kapsul) | Različni | Različni | Različni |

Nakloni in odseki se v vseh primerih razlikujejo, razen pri kapsulah iz pogoja 25/60, pakiranih v najmanjših platenkah s 7-imi kapsulami. V tem primeru so nakloni enaki, odseki pa se razlikujejo. Že prej smo ugotovili, da vsebnost vode narašča s pogojem in številom kapsul v platenki. Pri pogoju 25/60 in DUMA platenkah s 7-imi kapsulami torej vsebnost vode najpočasneje narašča, saj imamo sobne pogoje shranjevanja in najmanjše platenke, v katerih sušilno sredstvo dobro in dolgo časa ohranja nizko relativno vlažnost, ne glede na vsebnost učinkovine v kapsulah. Razlike v vsebnosti vode zaradi višje vsebnosti učinkovine v kapsulah v tem primeru ne pridejo do izraza, kar se kaže v enakih naklonih. Odseki so različni predvsem zaradi različnih začetnih vrednosti vode.

Pri ostrejših pogojih shranjevanja in večjem številu kapsul v platenkah pa so razlike v vsebnosti vode v odvisnosti od vsebnosti učinkovine v kapsulah vse bolj očitne. Nakloni in odseki so različni. Razpredelnica VII kaže spreminjanje naklonov v odvisnosti od vsebnosti učinkovine v kapsulah, pogoja shranjevanja in števila kapsul na platenko.

Razpredelnica VII: Primerjava naklonov posameznih regresijskih premic za kapsule z 10 mg, 20 mg in 40 mg vsebnostjo učinkovine

| | | 10 mg | 20 mg | 40 mg |
|-------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| DUMA (7 kapsul) | 25/60 | 0,002 | 0,003 | 0,005 |
| | 30/65 | 0,003 | 0,012 | 0,014 |
| | 30/75 | 0,004 | 0,005 | 0,029 |
| DUMA (50 kapsul) | 25/60 | 0,004 | 0,007 | 0,015 |
| | 30/65 | 0,007 | 0,019 | 0,043 |
| | 30/75 | 0,012 | 0,027 | 0,049 |

Iz tabele se lepo vidi, da večja kot je doza učinkovine v kapsulah, večji je naklon, ostrejši kot je pogoj shranjevanja, večji je naklon in večje kot je število kapsul v platenki, večji je naklon. Večji kot je naklon, hitrejša je naraščanje vsebnosti vode s časom oziroma večje so vrednosti vsebnosti vode v kapsulah v določenih časovnih intervalih.

S tem še enkrat potrdimo prejšnje ugotovitve:

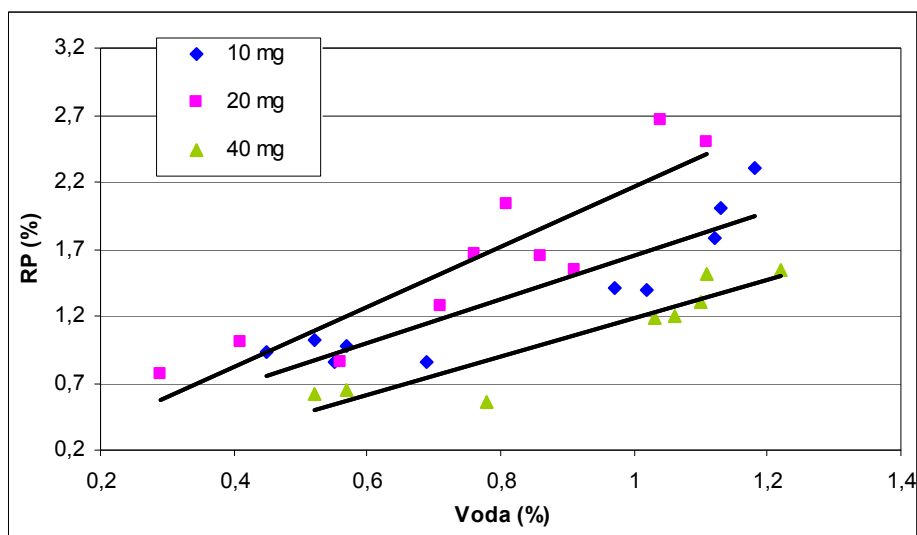
1. Vsebnost vode narašča s temperaturo in relativno zračno vlago.
2. Vsebnost vode narašča s številom kapsul v enoti ovojnine.
3. Vsebnost vode narašča z vsebnostjo učinkovine v peletah.

9.4. KORELACIJA MED VSEBNOSTJO VODE IN STABILNOSTJO FARMACEVTSKE OBLIKE

Prisotnost vode v farmacevtski obliki lahko močno pospeši razgradnjo učinkovine in s tem negativno vpliva na stabilnost farmacevtske oblike. Posledica razgradnje učinkovine pa je porast vsote razkrojnih produktov. Iz tega razloga nas je zanimala zveza med vsebnostjo vode in vsoto RP v peletah. Vsota RP je bila določena s kromatografsko metodo HPLC (High Performance Liquid Chromatography) po USP

analitskem postopku, rezultati pa vrednoteni po zadnji veljavni interni specifikaciji (predpis USP, Lek).

Odvisnost vsote RP od vsebnosti vode v peletah smo ugotavljali na podlagi grafične obdelave podatkov iz pogoja 40/75, po šestih mesecih shranjevanja (Slika 10).



Slika 10: Grafični prikaz korelacije med vsebnostjo vode in vsoto RP za kapsule z vsebnostjo učinkovine 10, 20 in 40 mg

Izdelali smo premice za posamezne jakosti kapsul (10, 20 in 40 mg), pri čemer smo za vsako premico uporabili podatke treh serij in različnih plasten (DUMA plaste s številom kapsul 7, 50, 56, 100). Že prej smo pokazali, da med serijami ni bistvenih razlik, so pa razlike med plastenkami. Tudi število podatkov med jakostmi se razlikuje. Pri kapsulah s 40 mg jakostjo imamo manj podatkov, saj kapsule te jakosti niso bile pakirane v DUMA plaste s 100-imi kapsulami. Zaradi teh razlik je premice težko natančno primerjati. Že sam položaj posameznih premic na grafu se razlikuje, odvisen pa je od začetne vsebnosti vode oziroma razkrojnih produktov. Kljub temu iz Slike 10 vidimo, da imajo vse tri premice trend naraščanja in da so med seboj bolj ali manj vzporedne. To pomeni, da z naraščanjem vsebnosti vode narašča tudi vsota RP.

10. SKLEP

Osnovni namen diplomske naloge je bil preučiti vpliv različnih dejavnikov na vsebnost vode v peletah, polnjenih v kapsule in posledično tudi na stabilnost kapsul. Razvojne študije so namreč pokazale, da je učinkovina, vgrajena v pelete, zelo občutljiva na vlago in na kombinacijo povišane temperature in vlage, kar lahko vpliva na stabilnost farmacevtskega izdelka.

Pri dejavnikih, ki vplivajo na vsebnost vode v peletah, smo se osredotočili na pogoje shranjevanja, količino kapsul v enoti ovojnine in vsebnost učinkovine v kapsuli. Na podlagi podatkov pospešenega, vmesnega in dolgoročnega testiranja smo ugotovili, da vsebnost vode v peletah narašča z višanjem temperature in relativne vlage okolja, kar je zelo pomembno za določitev najustreznejših pogojev shranjevanja.

Rezultati so pokazali tudi, da se vsebnost vode v peletah večja s številom kapsul v plastenki. Najnižje vrednosti vsebnosti vode smo določili v plastenkah s 7-imi kapsulami, najvišje pa v plastenkah s 100-timi kapsulami. Iz tega lahko sklepamo, da je DUMA plastenka s 7-imi kapsulami najprimernejša ovojnina za shranjevanje testiranih kapsul med HDPE plastenkami novega proizvajalca, saj najbolje ščiti kapsule pred vlago in tako ohranja njihovo stabilnost. Vendar pa so tudi DUMA plastenke s 50-imi, 56-imi in 100-imi kapsulami primerne kot optimalna ovojnina za naše kapsule, saj ni v nobenem primeru vsebnost vode presegla zgornje specifikacijske meje.

Pri preučevanju vpliva vsebnosti učinkovine v kapsulah smo ugotovili, da večja kot je vsebnost učinkovine, večja je vsebnost vode, vendar so bili tudi v tem primeru vsi rezultati pod zgornjo specifikacijsko mejo, to je 1,5 % vode na celotno maso pelet.

Če združimo zgoraj navedene ugotovitve, je logično, da smo najvišjo vsebnost vode določili po šestih mesecih staranja pri kapsulah, ki so bile polnjene v DUMA plastenkah s 100-imi ali 56-imi kapsulami in shranjene na pogoju pospešene stabilnosti (40/75). Visoka relativna vlažnost in povišana temperatura namreč pospešita razgradnjo učinkovine, poleg tega pa povzročita tudi fizikalne spremembe farmacevtske oblike, kar

se je pokazalo s spremembo barve pelet. Opazili smo, da so bile pelete z relativno visoko vsebnostjo vode po izgledu nekoliko temnejše od tistih z nižjo vsebnostjo vode.

Pri določanju korelacije med vsebnostjo vode v kapsulah in stabilnostjo kapsul, smo ugotovili, da z naraščanjem vsebnosti vode narašča tudi vsota razkrojnih produktov. Voda namreč povzroči hidrolizo učinkovine, katere vsebnost v farmacevtski obliki pade, naraste pa vsota razkrojnih produktov.

Testiranje vsebnosti vode pri različnih pogojih shranjevanja je pokazalo tudi, da obstaja korelacija med rezultati pospešenega, vmesnega in dolgoročnega testiranja stabilnosti, in sicer: vrednosti rezultatov 6-mesečnega pospešenega testiranja (40/75) so višje od vrednosti 12-mesečnega vmesnega testiranja na pogoju 30/75, te vrednosti so višje od vrednosti 12-mesečnega vmesnega testiranja na pogoju 30/65 in te višje od vrednosti 12-mesečnega dolgoročnega testiranja (25/60). Predvidevamo, da bodo rezultati pospešenega in vmesnega testiranja korelirali tudi z rezultati 24-mesečnega in 36-mesečnega dolgoročnega testiranja, kar bo omogočalo napovedovanje stabilnosti naše farmacevtske oblike skozi celoten rok uporabnosti.

Na podlagi linearne regresije in primerjave regresijskih premic smo potrdili homogenost testiranih serij. Hkrati se je metoda linearne regresije izkazala uporabna za vrednotenje kritičnih dejavnikov stabilnosti, saj smo z obdelavo podatkov vmesne in dolgoročne stabilnosti z linearno regresijo potrdili oceno vplivov posameznih dejavnikov na stabilnost naših kapsul, ki smo jo dobili na podlagi pospešenega testiranja. S tem, ko smo z linearno regresijo obdelali podatke vmesne stabilnosti, smo pokazali možnost aplikacije njene uporabe tudi na podatke dolgoročne stabilnosti za coni III in IV (30/65 ali 30/75).

Ker lahko s pomočjo linearne regresije in primerjave premic ovrednotimo in določimo najbolj kritične dejavnike, ki vplivajo na stabilnost nekega izdelka, lahko izberemo tako kombinacijo kritičnih dejavnikov, pri kateri je izdelek najmanj stabilen. V našem primeru so bile to kapsule s 40 mg jakostjo, pakirane v DUMA platenki s 100-imi kapsulami in hranjene pri pogoju 30/75. Glede na obdelavo podatkov in zaključke lahko napovemo, da bo naš izdelek stabilen tudi v vseh drugih kombinacijah dejavnikov (jakost - DUMA platenka - pogoj shranjevanja), če bo stabilen pri kombinaciji 40 mg -

DUMA plastenka s 100-imi kapsulami - 30/75. Na ta način lahko zmanjšamo število potrebnih stabilnostnih študij za določanje stabilnosti farmacevtskega izdelka in posredno tudi stroške razvoja nekega izdelka.

Glede na to, da se bo dolgoročno testiranje stabilnosti naših kapsul nadaljevalo do 36 mesecev, bodo vsebnosti vode še naraščale. Tudi te podatke bi lahko obdelali z linearno regresijo. S primerjavo naklonov in odsekov posameznih regresijskih premic bi lahko ugotovili, kdaj oziroma če v času roka uporabnosti pride do tistih signifikantnih razlik, ki onemogočajo združevanje regresijskih premic.

Opisano metodologijo bi bilo smiselno preizkusiti tudi na drugih farmacevtskih oblikah in drugih stabilnostnih parametrih.

11. LITERATURA

1. Zakon o zdravilih, Uradni List RS 31/2006, marec 2006
2. J.T. Carstensen: Drug Stability; Principles and Practices, 3rd Edition, Marcel Dekker Inc., New York, 2000
3. ICH Guideline Q1A(R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products, February 2003
4. FDA Guidance for Industry: Submitting Documentation for the Stability of Human Drugs and Biologics, 1987
5. FDA Guidance for Industry: Stability testing of Drug Substance and Drug Products-Draft, 1998
6. CHMP Guideline on declaration of storage conditions: A – In the product information of medicinal products, B – For active substances, November 2007
7. D. A. Dean, E. R. Evans, I. H. Hall: Pharmaceutical packaging technology, Taylor & Frances, London, New York, 2000
8. S. Srčič: Pharmaceutical Packaging; Postgraduate European radiopharmacy course, Block 1: Pharmacy, Ljubljana, September 15 – 27, 2003
9. R. L. Dobson: Multifunctional Desiccants; Protection of pharmaceutical and diagnostic products through desiccant technology, Journal of Packaging Technology, Vol. 1, No. 4, Technical Publications, Inc, August 1987
10. S. Bohanec: Obdelava podatkov, Slovenski kemijski dnevi '00, objavljen referat, Maribor, 28. in 29. september 2000, 341-346
11. ICH Guideline Q1E: Evaluation of Stability Data, February 2003
12. S. Bohanec, T. Rozman, A. Kanalec: Testiranje stabilnosti farmacevtskih izdelkov; Zbornik referatov Slovenski kemijski dnevi '01, objavljen referat, Maribor, 20. in 21. september 2001, 96-101
13. V. Kmetec: Predavanja predmeta Stabilnost zdravil, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2004
14. Dostopno na internetni strani: www.ich.org; The official web site for ICH
15. ICH Guideline Q2(R1): Validation of Analytical Procedures; Text and Methodology, October 1994
16. ICH Guideline Q3A(R2): Impurities in New drug Substances (Revised Guideline), October 2006

17. ICH Guideline Q3B(R2): Impurities in New Drug Products (Revised Guideline), June 2006
18. ICH Guideline Q1B: Photostability Testing of New Drug Substances and Products, November 1996
19. ICH Guideline Q1F: Stability data Package for Registration Applications in Climatic Zones III and IV, June 2006
20. V. Titan, Diplomaska naloga: Uporaba stresnega testiranja in faktorske analize za vrednotenje ovojnine za trdne farmacevtske oblike, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2006
21. S. Bohanec, A. Kanalec: Statistična analiza stabilnostnih podatkov; Določitev roka uporabnosti farmacevtskim izdelkom, Farm Vestn, 2001; 52: 25-31
22. S. Bolton: Pharmaceutical statistics, Practical and clinical applications, 3rd Ed., Vol. 80, Swarbrick, AAI, Inc.
23. V. Kmetec, R. Roškar: Vaje iz stabilnosti zdravil, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2002
24. V. Kmetec: Vpliv vode na stabilnost farmacevtskih sistemov, 19. simpozij Sekcije farmacevtskih tehnologov, Voda v farmacevtskih oblikah: nujna, zelena ali neželena sestavina, Ljubljana, 14. junij 2007, 84-93
25. S. Srčič: Delikvescenca in kapilarna kondenzacija, 19. simpozij Sekcije farmacevtskih tehnologov, Voda v farmacevtskih oblikah: nujna, zelena ali neželena sestavina, Ljubljana, 14. junij 2007, 94-106
26. Dostopno na internetni strani: www.gmp-manual.com, 14.G
27. M. Stergar: Analiza vode v farmacevtskih sistemih, 19. simpozij Sekcije farmacevtskih tehnologov, Voda v farmacevtskih oblikah: nujna, zelena ali neželena sestavina, Ljubljana, 14. junij 2007, 24-34
28. Evropska farmakopeja, PhEur 5th Ed., 2.5.32. Water: micro determination, 137-138
29. S. Vidrih, Diplomaska naloga: Statistična obdelava in vrednotenje stabilnostnih podatkov, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Maribor, december 2006
30. S. I. Farag Badavy, A. J. Gawronski, F. J. Alvarez: Application of sorption-desorption moisture transfer modeling to the study of chemical stability of a moisture sensitive drug product in different packaging configurations, DuPont Pharmaceuticals Company, Pharmaceutical R&D, Experimental Station; International Journal of Pharmaceutics 223 (2001), 1-13

31. K. Naveršnik: Testiranje prepustnosti ovojnine za vodne pare, interno poročilo,
Lek, RR, Stabilnost formulacij, junij 2006