

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DEJAN KRAJCAR

**UPORABA STRESNIH TESTOV ZA NAPOVEDOVANJE DOLGOROČNE
STABILNOSTI ZDRAVIL**

**USING STRESS TESTS FOR PREDICTION OF LONG-TERM STABILITY
OF DRUG PRODUCTS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo sem opravljal v Razvojnem centru podjetja Lek d.d. pod mentorstvom prof. Vojka Kmetca in somentorstvom mag. Brede Husu-Kovačević. Celotno eksperimentalno delo je bilo opravljeno v laboratorijih Razvojnega centra podjetja Lek d.d..

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Vojku Kmetcu in somentorici mag. Bredi Husu-Kovačević za vse nasvete, usmeritve, kritike in spodbudo pri ustvarjanju diplomskega dela. Zaradi obilice strokovnih nasvetov in pomoči pri načrtovanju študij, se iskreno zahvaljujem tudi Klemenu Naveršniku, hkrati pa tudi vsem sodelavcem v Razvojnem centru podjetja Lek, ki so mi kakorkoli olajšali ustvarjanje diplomskega dela.

Iskreno se zahvaljujem tudi moji družini ter Tanji z družino, ker so me podpirali in mi pomagali skozi vsa leta študija.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Vojka Kmetca in somentorstvom mag. Brede Husu-Kovačević.

VSEBINA

1. UVOD.....	1
1.1. Stabilnost zdravil in testiranje stabilnosti	1
1.2. Stresni testi.....	7
1.2.1. ICH vidik	7
1.2.2. Zbrani literaturni podatki o uporabi in načrtovanju stresnih testov.....	7
1.3. Kinetika kemijske reakcije v trdnih sistemih.....	15
1.3.1. Osnove kemijske kinetike.....	15
1.3.2. Teoretični in eksperimentalni kinetični modeli.....	17
1.3.3. Načelo izokonverzije	19
1.3.4. Vpliv vode na kemijsko kinetiko v trdnih sistemih.....	20
1.4. Arrheniusova odvisnost	22
1.4.1. Osnovna Arrheniusova enačba	22
1.4.2. Modificirana Arrheniusova enačba	23
2. NAMEN DIPLOMSKEGA DELA	24
3. MATERIALI in METODE	26
3.1. Modelne farmacevtske oblike	26
3.1.1. Modelna farmacevtska oblika 1.....	26
3.1.2. Modelna farmacevtska oblika 2.....	27
3.1.3. Modelna farmacevtska oblika 3.....	28
3.1.4. Modelna farmacevtska oblika 4.....	30
3.2. Analizne metode in aparature	31

4.	REZULTATI IN RAZPRAVA	34
4.1.	Načrtovanje in izvedba stresnega testa	34
4.2.	Izbira pogojev stresnega testa za posamezne modelne farmacevtske oblike.....	37
4.3.	Modelna farmacevtska oblika 1	44
4.4.	Modelna farmacevtska oblika 2	48
4.5.	Modelna farmacevtska oblika 3	57
4.6.	Modelna farmacevtska oblika 4	60
4.7.	Dodatne študije	64
5.	SKLEP	65
6.	VIRI IN LITERATURA:	70

KAZALO PREGLEDNIC:

Preglednica I.....	3
Preglednica II.....	6
Preglednica III	10
Preglednica IV	27
Preglednica V	28
preglednica VI	29
Preglednica VII.....	30
Preglednica VIII	32
Preglednica IX	37
Preglednica X	37
Preglednica XI	38
Preglednica XII.....	39
Preglednica XIII	39
Preglednica XIV	40
Preglednica XV.	41
Preglednica XVI	41
Preglednica XVII.....	42
Preglednica XVIII.	42
Preglednica XIX	42
Preglednica XX	43
Preglednica XXI	44
Preglednica XXII.....	45
Preglednica XXIII	46
Preglednica XXIV	47
Preglednica XXV.....	48
Preglednica XXVI	49
Preglednica XXVII.....	50
Preglednica XXVIII.....	51
Preglednica XXIX	53
Preglednica XXX.....	54
Preglednica XXXI	55
Preglednica XXXII.....	55

Preglednica XXXIII.....	57
Preglednica XXXIV	57
Preglednica XXXV.....	58
Preglednica XXXVI	59
Preglednica XXXVII.....	59
Preglednica XXXVIII.....	60
Preglednica XXXIX	60
Preglednica XL.....	61
Preglednica XLI.....	62
Preglednica XLII	63
Preglednica XLIII.....	63
Preglednica XLIV.....	64

POVZETEK

Pri razvoju zdravila želimo ustrezne informacije o njegovi kakovosti dobiti kar se da sproti in hitro. Pomemben del razvoja predstavljajo podatki o stabilnosti produkta. Stabilnostne študije so običajno dolgoročne, ključne spremembe kvalitete produktov pa se lahko pokažejo šele po daljšem času. Temu bi se v veliki meri lahko izognili s stresnimi študijami stabilnosti, s katerim bi uspeli v kratkem času relativno dobro napovedati dolgoročno stabilnost učinkovine in farmacevtske oblike. Dolgoročno stabilnost raztopin lahko napovedujemo z Arrheniusovo odvisnostjo, za napovedovanje stabilnosti trdnih farmacevtskih oblik pa je uporaba Arrheniusove odvisnosti še dokaj neraziskana in nezanesljiva.

Namen diplomskega dela je bil postaviti osnove za izvedbo stresnih študij za napovedovanje dolgoročne stabilnosti trdnih farmacevtskih oblik. V ta namen smo izbrali ustrezne modelne farmacevtske oblike, katerih dolgoročna in pospešena stabilnost je bila poznana. To nam je omogočilo hitrejše načrtovanje stresnih testov, hkrati pa smo na koncu dobljene napovedi lahko potrdili z realnimi rezultati dolgoročne stabilnosti. Pri posamezni modelni farmacevtski obliki smo se osredotočili na vrednotenje značilnega razgradnega produkta. Pri načrtovanju stresnih testov smo upoštevali nekatera načela za določanje intrinzične stabilnosti učinkovine in farmacevtskih produktov ter načela za izvedbo primerjalnih stresnih testov. S tem smo poskušali izbrati pogoje stresnih testov, s katerimi bi ostali v specifikacijskih mejah deležev razgradnih produktov (v mejah izokonverzije). To nam je v večini tudi uspelo. Delež na stresnih testih nastalih razgradnih produktov smo vrednotili z validiranimi analiznimi metodami tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC). Hkrati pa smo spremljali tudi videz farmacevtskih oblik in merili vodno aktivnost, ki sta nam omogočala ustreznejšo interpretacijo dobljenih rezultatov.

Pri vseh modelnih farmacevtskih oblikah smo uspešno potrdili napovedani 0.red kinetike nastajanja razgradnega produkta. S tem smo potrdili tudi nekatere literaturne podatke za kinetiko razpada v trdnih farmacevtskih oblikah. V posameznih primerih, kjer aplikacija 0.reda ni bila mogoča, smo poskušali poiskati razloge za tako obnašanje. Pri vseh modelnih farmacevtskih oblikah smo lahko relativno uspešno napovedali dolgoročno stabilnost zdravila, pri tem pa smo uporabili Arrheniusovo odvisnost in tako potrdili možnost njene uporabe za trdne farmacevtske sisteme. Kljub temu je prišlo do nekaterih odstopanj od

Arrheniusove odvisnosti, ki pa smo jih poskušali ustrezno razložiti s spremembo vodne aktivnosti in uporabo neustrezne temperature za izvedbo stresnega testa.

V diplomskem delu smo vrednotili tudi vpliv vlage na kinetiko nastajanja razgradnega produkta. Z uporabo modificirane Arrheniusove odvisnosti, podatkov znane dolgoročne in pospešene stabilnosti modelnih farmacevtskih oblik in merjenjem vodne aktivnosti smo najprej načrtovali stresne teste. Izvedli smo jih v komorah z izbrano konstantno relativno vlago, ki smo jih postavili v termostate z ustrezno temperaturo. Po določitvi deleža razgradnih produktov smo poskušali potrditi kinetiko 0. reda, pri tem pa smo imeli zaradi pogojev visokih relativnih vlag ponekod kar nekaj težav. Kljub temu smo uspeli pri treh modelnih farmacevtskih oblikah določiti parametre modificirane Arrheniusove odvisnosti (konstanto B). Pri eni od modelnih farmacevtskih oblik pa smo določili še neodvisnost B od temperature in s pomočjo modificirane Arrheniusove odvisnosti uspešno napovedali dolgoročno stabilnost.

ABSTRACT

For pharmaceutical development is important to evaluate the quality of samples as fast as possible.

Understanding the stability characteristics of the drug products is crucial for successful development process. Stability studies are usually time-consuming, various quality changes are determined late at the long-term stability studies.

During the development various stress tests are used to predict stability of the drug products in a short period of time. For some drug products stress test predictions do not correlate well enough with the real stability data. It is therefore useful to implement the stress tests methodology for reliable prediction of drug products stability.

Correlation between stress tests and long-term stability of the drug products are already known from the literature and they are usually evaluated through Arrhenius correlation for solutions. However implementation of Arrhenius predictions for complex multi phase formulation like tablets is unreliable and not often reported in professional literature.

The aim of the diploma work was to develop basic principles for stress tests for prediction of long-term stability. In order to speed up stress planning at the beginning and to confirm extrapolated long-term stability at the end, model formulations with known long-term and/or accelerated stability were chosen. For easier planning of stress test we considered the principles of intrinsic stability testing of substances and drug products and principles of comparison stress tests of drug products. Crucial for the suitability of stress test was to stay within the isoconversion principles and not to exceed the specification limits of degradation products. HPLC-UV method was used to determine level of specific degradation product, which was the selected factor for evaluating the long-term stability of model formulations. Determination of appearance and water activity was also carried out and considered in discussions and final conclusions.

Predicted zero order kinetic model was successfully confirmed on all model formulations. In some cases, zero order model was not applicable, due to exceeding the degradation limits and physical changes. Predictions of long-term stability of all four model formulations using Arrhenius equation were carried out relatively successfully. When deviations from the Arrhenius equation occurred, reasons, such as high water activity and exceeding temperature of stress test, were pointed out. Final conclusion was, that stress testing in

combination with Arrhenius equation can be used for the prediction of long-term stability of model formulations.

Influence of water content and humidity on the degradation kinetic was reviewed in second part of Diploma. Modified Arrhenius equation (introduced by Waterman and coworkers) known long-term and accelerated stability data, initial water activity values and other literature data on the developing stress tests were used for planning the experiments. Stress test were carried out in chambers with controled relative humidity and temperature. Some deviations from presumed zero order kinetic model, were relatively well explained with the exceeded degradation limits and extreme humidity conditions. Other cases, when zero order was applicable, showed relatively good corelation with modified Arrhenius equation. Furthermore, a succesfull attempt conforming independence of value B and temperature, was a basis for prediction of long-term stability with modified Arrhneius equation. Prediction was relatively acurate and conclusion was that modified Arrhenius equation is suitable for prediction of long-term stabilty of model formulation 2.

SEZNAM OKRAJŠAV :

FO - farmacevtske oblike

RU - rok uporabnosti

T - temperatura

RV - relativna vlaga

RRV – ravnotežna relativna vlaga

a_w - vodna aktivnost

SZO - svetovna zdravstvena organizacija

ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use

Ea - aktivacijska energija

HPLC - tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

UV- ultravijolični

NMR - nuklearna magnetna resonanca

MS - masna spektrometrija

m - mesec

d - dan

TLC - tankoplastna tekočinska kromatografija

GC - plinska kromatografija

1.UVOD

1.1. Stabilnost zdravil in testiranje stabilnosti

Stabilnost je pomembna lastnost zdravila. Preden pa se poglobimo v nadaljevanje definicije, pa se ustavimo pri besedah Thomas-a Cranmer-ja. »Človeški razum ni še nikoli ustvaril ali izumil nekaj, kar ne bi podleglo zobu časa.« Tudi zdravilo ni izjema, zato je potreba po ohranjanju njegove kakovosti, varnosti in učinkovitosti skozi čas zahteven proces v farmacevtski industriji [1].

Stabilnost je sposobnost farmacevtskega izdelka, da med rokom uporabnosti ohrani svoje karakteristike znotraj specificiranih meja [2]. To pomeni, da stabilnost ni nekaj nespremenljivega, ampak gre za kontrolirano, dokumentirano in sprejemljivo spremembo zdravila [1].

Spremembe v stabilnosti zdravila so lahko različne:

1. Lahko se spremeni **vsebnost učinkovine**, kar spremeni učinkovitost zdravila. Vsebnost učinkovine je eden od osnovnih parametrov pri določanju roka uporabnosti farmacevtskih produktov in v splošnem velja, da je spodnja meja vsebnosti za ustrezen izdelek 90-95%. Za zelo stabilne produkte je ta meja lahko tudi višja. Pri nekaterih farmacevtskih oblikah (poltrdne in tekoče) se nestabilnost kaže tudi v povišanju vsebnosti, ker s časom lahko prihaja do izgube vehikla.
2. S časom ali spremembo pogojev shranjevanja lahko pride do spremembe **biološke uporabnosti**, kar pa spremeni učinkovitost zdravila. Zato je kontroliranje disolucijskega profila pomemben del testiranja stabilnosti.
3. Neustrezna stabilnost se pokaže v porastu identificiranih **razgradnih produktov** nad specifikacijsko mejo ali nastanku še neidentificiranih in/ali toksičnih razgradnih produktov. Ti lahko zmanjšajo varnosti končnega produkta.
4. Neustrezna stabilnost se kaže še v spremembi **organoleptičnih lastnosti** (videz, vonj, barva, bistrost, okus...) in spremembi **homogenosti farmacevtskih pripravkov** (npr. suspenzij).

5. Tudi sama **ovojnina** je lahko vzrok sprememb v farmacevtskih pripravkih. Poleg tega, da se lahko spremenijo lastnosti ovojnine, kar zmanjša zaščito zdravila pred zunanjimi vplivi, lahko zdravilo kontaminirajo tudi snovi iz primarne ovojnine. To povzroča tako fizikalne kot kemijske spremembe v zdravilu.
6. Nestabilno je tudi zdravilo s spremenjenimi mikrobiološkimi lastnostmi. Mikrobiološka kvaliteta se ne preverja samo v sterilnih izdelkih in pripravkih za oči, ampak tudi v ostalih farmacevtskih pripravkih. Do sprememb lahko pride na dva načina. Lahko pride do rasti že na začetku prisotnih mikroorganizmov, ali pa le ti kontaminirajo farmacevtske oblike zaradi poškodovane ovojnine[1].

Testiranje stabilnosti zdravila zajema širok spekter sprememb, ki opredelijo:

1. kemijsko stabilnost,
2. fizikalno stabilnost ,
3. biološko (mikrobiološko) stabilnost zdravila.

Podrobneje bom opisal le pomen kemijske in fizikalne stabilnosti zdravil:

1. Kemijski vidik obravnava učinkovino in pomožne snovi, kot potencialne substrate za različne reakcije (organske in anorganske). Vrste organskih reakcij so odvisne od funkcionalnih skupin v strukturi učinkovine ali pomožne snovi oziroma od potencialni reaktivnih mest. Primeri nekaterih organskih reakcij, značilnih za posamezne funkcionalne skupine, so predstavljeni v preglednici I. Strukturna raznolikost učinkovin in pomožnih snovi, je razlog za širok spekter najrazličnejših reakcij, ki jih zasledimo ob kemičnem razpadu učinkovin. Obseg specifične reakcije razpada pa je odvisen od vrste farmacevtske oblike in od okolja, kateremu je učinkovina oz. farmacevtska oblika izpostavljena, torej od temperature, relativne vlage (RV) oz. vodne aktivnosti (a_w), kisika... [1].
2. Fizikalno stabilnost zdravila določajo spremembe fizikalnih lastnosti učinkovine, pomožne snovi, kot tudi celotne farmacevtske oblike.

Fizikalne spremembe v farmacevtskem pripravku so posledica sprememb v mikroskopskih fizikalnih stanjih, ko gre za prehode med amorfno in kristalno obliko, ter hidrati in solvati. Sčasoma se nestabilne oziroma metastabilne oblike spreminjajo v termodinamično najugodnejšo obliko.

Preglednica I: Pogoste reakcije nastanka razgradnih produktov v odvisnosti od funkcionalnih skupin učinkovine[3].

Funkcionalne skupine	Pogoste reakcije nastanka razgradnih produktov
estri, laktoni, karbamati, imidi	<u>hidrolize – v alkalnih in nevtralnih pogojih*</u> (primer: acetilsalicilna kislina do salicilne kisline)
amidi, laktami	kislinsko/bazične hidrolize, polimerizacije (primer: ampicilin)
karboksilne kisline	nukleofilne substitucije do nastanka estrov, anhidridov, amidov, dekarboksilacije, <u>dehidracije do nastanka laktonov*</u> , laktamov (primer: cefuroksim)
aldehidi, ketoni	keto-enol tautomerije, nukleofilne adicije, oksidacije (primer: aldehidi), aldolne kondenzacije
acetali, ketali	kislinske hidrolize
ciano skupine(CN)	hidrolize in sledeča tautomerije do amida, oksidacije
amino skupine	oksidacije in nastanek N-oksidov iz terciarnih aminov ter nitozo spojin iz primarnih aminov, nukleofilne reakcije (primera:Mailardova reakcija s reducirajočimi sladkorji, <u>1,4 Michaelova adicija s maleatom*</u>)
nitro skupine	fotokemijske reakcije
sulfonamidi	kislinske hidrolize, nukleofilne substitucije do nastanka sulfonskih estrov
sulfoksidne skupine	<u>Oksidacije*</u> , redukcije
tioli, etri, tioetri	kislinsko/bazične hidrolize, oksidacije

* V izbranih modelnih farmacevtskih oblikah smo opazovali podčrtane razpadne reakcije.

Hitrost in obseg prehoda med stanji sta odvisna od energijske bariere med njimi ter od faktorjev okolja (temperatura, vlaga...). Zato v fazi testiranja stabilnosti učinkovine izberemo polimorf z najustreznejšo stabilnostjo in tega kasneje vključimo v končno farmacevtsko obliko. Pri izbiri je potrebno upoštevati tudi druge fizikalne lastnosti oblike, kot so topnost, hitrost raztapljanja, pretočne lastnosti, stisljivost, površinsko energijo..., zato ne moremo vedno izbrati termodinamično najugodnejše oblike. Poleg prehodov med posameznimi stanji, se lahko pojavijo tudi ostale fizikalne spremembe, kot so rast kristalov in s tem večanje delcev, sprijemanje delcev zaradi vezave vlage (kapilarne sile), trdne učinkovine in pomožne snovi pa lahko preidejo tudi v drugo agregatno stanje (v talino ali

pa sublimirajo). Te spremembe se lahko izrazijo v spremembah organoleptičnih lastnosti (nastanejo grudice, pojav nehomogenosti prahu, sprememba barve...) ali pa vplivajo na topnost, hitrost raztapljanja... Organoleptične spremembe niso vedno posledica fizikalne nestabilnosti, temveč je sprememba videza, barve, okusa večkrat posledica kemijskih sprememb.

Fizikalno-kemijske spremembe v učinkovini in pomožnih snoveh so v tesni medsebojni odvisnosti.

Kako je torej potrebno razviti stabilno zdravilo? V grobem razdelimo testiranje stabilnosti v tri faze:

1. Razvojnna faza:

V prvi fazi se izvajajo stabilnostne študije z namenom pridobivanja podatkov o intrinzični stabilnosti same učinkovine in kompatibilnosti s pomožnimi snovmi. Tako omogočimo razvoj primernih procesnih pogojev za izdelavo učinkovine in farmacevtske oblike ter izbiro z učinkovino kompatibilnih pomožnih snovi za izdelavo testnih farmacevtskih oblik. Hkrati se vrednoti tudi kvaliteta vhodnih materialov. Glede na lastnosti farmacevtske oblike in način aplikacije je potrebno izbrati ustrezno primarno in kasneje še sekundarno ovojnino ter testirati stabilnost različnih farmacevtskih oblik. V prvi fazi se izberejo stabilnostno indikativne analize metode, ki so osnova za vsa nadaljnja stabilnostna testiranja izbrane farmacevtske farmacevtske oblike

2. Registracijska faza:

Druga faza razvoja je testiranje stabilnosti izbrane končne farmacevtske oblike za pripravo registracijskega dosjeja.

3. Faza trženja

Po izdaji dovoljenja za promet z zdravilom se začne tretja faza v kateri se z rednimi letnimi stabilnostnimi študijami periodično preverja stabilnost farmacevtske oblike (follow up stability). V tej fazi se lahko izvajajo dodatne študije, kadar pride do sprememb v proizvodnem procesu, do zamenjave dobavitelja vhodnih materialov ali do spremembe farmacevtske oblike.

ICH

Različne kulture in razvitost posameznih področij ter nenazadnje različni klimatski pogoji so povzročili, da je med regijami sveta prišlo do razhajanj v izvedbi stabilnostnih študij in postavljanju regulatornih zahtev. Za uporabo zdravila v različnih delih sveta je bilo potrebno podvajati dolgoročne študije. Proces poenotenja zahtev za testiranje stabilnosti zdravil so začeli leta 1980 v Evropi in ga kasneje prenesli še na ameriško in japonsko regulativo. Leta 1990 je bila v prizadevanjih za poenotenje zahtev za kakovost zdravil ustvarjena ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use), katere namen je bil in je še danes omogočiti bolj gospodarsko uporabo človeških, živalskih in materialnih virov pri testiranju in izdelavi zdravil, odpravljati nepotrebne zamude v razvoju, dajati zdravilu možnost mednarodnega jamstva kakovosti, varnosti in učinkovitosti, ter postavljati mednarodne regulatorne zahteve, vse naštetu z namenom zaščite javnega zdravja. Pod poglavjem kakovosti se skriva ogromno smernic, ki so danes v kombinaciji z specifičnimi regulatornimi zahtevami osnova za izvajanje v nadaljevanju predstavljenih stabilnostnih študij, z namenom pridobitve potrebne dokumentacije za sprostitev izdelka na željeno tržišče [4].

ICH v smernici »Testiranje stabilnosti novih farmacevtskih snovi in izdelkov« v časovnem poteku razvoja farmacevtske oblike omenja pet različnih stabilnostnih študij, ki se med seboj značilno razlikujejo:

Študije pospešene stabilnosti (Accelerated stability testing) načrtujemo in izvedemo pri kontroliranih predpisanih ekstremnih pogojih z namenom pospešitve kemijske in fizikalne spremembe v farmacevtski obliki. Pridobljeni podatki so skupaj z rezultati iz dolgoročnih študij del registracijske dokumentacije in jih uporabljamo za predvidevanje hitrosti nastajanja potencialnih sprememb farmacevtske oblike ob shranjevanju na predpisanih pogojih. Podatki pospešene stabilnosti so uporabni za ocenjevanje sprememb, kadar pogoji shranjevanja ne dosegajo predpisanih kriterijev (npr. v času transporta).

Študije vmesne pospešene stabilnosti (Intermediate stability testing) so prav tako načrtovane za pospešitev kemijske in fizikalne spremembe v farmacevtski obliki, vendar za izdelke, ki na pogojih pospešene stabilnosti izkažejo neustrezno stabilnost.

Študije dolgoročne stabilnosti (Long-term stability testing) so študije staranja učinkovine in končne farmacevtske oblike na predpisanih pogojih shranjevanja, z namenom potrjevanja in podaljševanja roka uporabnosti izdelka.

Pogoji omenjenih stabilnostnih študij so odvisni od regije sveta v kateri zaproščamo za dovoljenje za promet z zdravilom. V ta namen uporabljamo delitev sveta na 4 klimatske cone, ki jo je leta 1993 predlagal W.Grimm. V ICH smernici Q1A (R2) najdemo predstavljene splošne pogoje za izvedbo stabilnostnih študij v vsaki izmed štirih klimatskih con. Zaradi specifičnih zahtev nekaterih regij, pa je včasih potrebno upoštevati tudi nekatere regionalne in nacionalne predpise (ASEAN, ANVISA) [2][5].

Preglednica II: Pogoji in časovni potek stabilnostnega testa v odvisnosti od vrste stabilnostne študije, kot jih predlaga ICH smernica Q1A za klimatski con I. in II. Pogoji ne veljajo za učinkovine in končne farmacevtske oblike, ki se shranjujejo v hladilniku ali zamrzovalniku [5].

Vrsta stabilnostne študije	Pogoji shranjevanja	Časovni potek testiranja
Študije dolgoročne stabilnosti	25°C ± 2°C/60% RV ± 5% RV	0,3,6,9,12,24,36,48,60 mes
Študije vmesne pospešene stabilnosti	30°C ± 2°C/65% RV ± 5% RV	0,3,6,9,12 mes
Študije pospešene stabilnosti	40°C ± 2°C/75% RV ± 5% RV	0,3,6 mes

V ICH smernicah so omenjene še takoimenovane »in use« študije stabilnosti in študije stresne stabilnosti. [5].

1.2. Stresni testi

1.2.1. ICH vidik

ICH v smernici Q1A stresne teste definira, kot uporabno orodje za hitro napovedovanje ali oceno stabilnosti učinkovine in končne farmacevtske oblike. Poleg tega so stresni testi pomembni za razvoj stabilnostno indikativne analizne metode in odkrivanje mehanizma razpada učinkovine ter potencialnih razgradnih produktov [5].

Določanje intrinzične stabilnosti učinkovine:

ICH zahteva, da je za nove farmacevtske učinkovine in izdelke, informacije o intrinzični stabilnosti učinkovine potrebno vključiti v registracijsko dokumentacijo. V ta namen je v ICH smernici Q1A nekoliko opisan ta aspekt uporabe stresnih testov. Predlagani pogoji stresnih testov so relativne vlage višje od 75 % ter temperature, ki so običajno vsaj za 10°C višje od tistih za izvajanje testov pospešene stabilnosti. Smernica navaja tudi potrebo po stresnih testih z oksidacijskimi pogoji, pogoji, ki omogočajo preučitev hidrolizne stabilnosti in pogoji, ki povzročajo fotolizo. Fotostabilnostni stresni testi na novih učinkovinah pa so posebej opisani v istoimenski smernici z znako Q1B.

V sklopu ugotavljanja intrinzične stabilnosti s stresnimi testi je omenjena tudi potreba po ugotavljanju mehanizma razpada učinkovine. Če določen razgradni produkt nastaja samo pri stresnih pogojih ne pa tudi pri pogojih študij dolgoročne in/ali pospešene stabilnosti, mehanizem razpada ni vedno potrebno določati [5].

1.2.2. Zbrani literaturni podatki o uporabi in načrtovanju stresnih testov

Poleg omenjenih možnosti uporabe stresnih testov v ICH smernicah, imajo v realnosti te študije še veliko širši pomen in se jih uporablja tudi kot orodje za:

- izbiro ustreznih oblik učinkovine (ustrezne soli...), pomožnih snovi za pravilno izbiro in razvoj končne farmacevtske oblike,
- izbiro ustrezne zaščitne ovojnine,
- simulirano tvorbo in izolacijo razgradnih potencialnih toksičnih produktov (katerih sinteza ni mogoča) za predklinična toksikološka vrednotenja,
- izbiro in modifikacijo pogojev sinteze učinkovine in postopka farmacevtske oblike,

- študije absorpcije (ugotavljamo ali določena farmacevtska oblika potrebuje acidoresistentno obliko), distribucije, eliminacije in metabolizma (kadar nastali razgradni produkti predstavljajo metabolite, jih je za študije metabolizma lažje tvoriti s stresnimi testi, kot jih izolirati iz organizmov),
- pripravo referenčnih materialov,
- napovedovanje dolgoročne stabilnosti zdravil.

Vse omenjene možnosti uporabe niso zanimive za stabilnostne študije, zato le-teh v nadaljevanju ne bomo obravnavali. Poleg tega je spekter uporabe stresnih testov še mnogo širši, predstavil sem le nekaj dodatnih možnosti uporabe. Izpostaviti pa je potrebno dejstvo, ki ga ICH smernica ne poudarja dovolj, in sicer, da se stresne stabilnostne študije izvajajo v vseh fazah razvoja zdravila, tudi na zdravilih, ki so že na tržišču ali šele pripravljene za vstop v klinično fazo razvoja. Prav informacije o slednjih stresnih študijah zahtevajo tudi nekatere regulatorne ustanove [3][6][7].

ICH smernice ne dajejo natančnih navodil za način izvedbe stresnih testov [3][6]. Veliko podatkov pa lahko najdemo v ostalih literaturnih virih, ki nam lahko pomagajo pri načrtovanju stresnih testov. V farmacevtskih podjetjih imajo marsikje že razvite standardne postopke in predpisujejo protokole za izvedbo stresnih stabilnostnih študij. Poleg tega imajo formirane posebne skupine za načrtovanje in izvajanje stresnih testov, s čimer zagotavljajo izmenjavo izkušenj in znanja [7].

Glede na informacije, ki jih želimo s stresnimi testi dobiti, moramo le-te tudi ustrezno načrtovati. Ob ustreznem načrtovanju in izvedbi stresnih študij lahko pravilno vrednotimo intrinzično stabilnost učinkovine ali farmacevtske oblike in hkrati razvijemo stabilnostno indikativne analitske metode za testiranje stabilnosti učinkovine, zmesi učinkovine in pomožnih snovi ter farmacevtske oblike [6]. Zaradi kompleksnosti in raznolikosti farmacevtskih oblik pa načrtovanje stresnih testov zahteva včasih tudi popolnoma nove pristope.

V nadaljevanju bomo najprej predstavili nekaj bolj podrobnih navodil za načrtovanje in izvedbo posameznih stresnih študij, pri čemer se bomo bolj posvetili kemijski stabilnosti zdravil.

1.2.2.1. DOLOČANJE INTRINZIČNE STABILNOSTI

Namen določanja intrinzične stabilnosti je spoznati potencialne razpadne poti, kinetiko razpada in identificirati potencialne razgradne produkte, predvsem pa določiti pogoje, ki vodijo v razpad učinkovine (mešanic s pomožnimi snovmi, farmacevtske oblike) [3].

I. Pogoji stresnih testov

Kot navaja tudi Q1A ICH smernica je naš cilj spoznati 4 osnovne mehanizme razpada, in sicer termolizni, hidrolizni, oksidativni in fotolizni razpad učinkovine. V tem poglavju bomo razširili vidik intrinzične stabilnosti tudi na farmacevtske oblike.

Podatke o omenjenih razpadih lahko dobimo z izbiro ustreznih stresnih pogojev. Vrsta vzorca pa nam približno pove, katere vrste stresnih pogojev moramo izbrati, da bomo dobili zadostno informacijo o razpadu. Dosedanja spoznanja farmacevtskih raziskovalnih skupin o specifičnih pogojih za izvedbo stresnih testov (ob upoštevanju ICH in FDA smernic) so predstavljena v preglednici 3. Predstavljeni pogoj so splošni (združeni iz predlogov pogojev v literarnih virih [3][6][7]) in pomagajo pri začetnih načrtovanjih, kasneje pa se o potrebnih pogojih odločamo glede na naravo vzorca. Osredotočili se bomo na pogoje, ki povzročajo termolizni in oksidacijski razkroj, saj bomo v diplomskem delu opazovali samo ti dve vrsti razpadnih reakcij.

TERMOLIZNI RAZPAD pri kontrolirani in nekontrolirani relativni vlagi

Učinkovine v raztopinah ali suspenzijah in tekočih končnih farmacevtskih oblikah ponavadi izpostavljammo manj ekstremnim termoliznim pogojem kot trdno substanco. Pogoje za testiranje zmesi pomožnih snovi in učinkovine ter njihovih raztopin izbiramo glede na že znane rezultate s stresnega testiranja substance. Pogoje kombinirane relativne vlage in termoliznih pogojev uporabljamo pri testiranju trdne substance in trdnih farmacevtskih oblik. Za zelo stabilne vzorce pa je za doseganje razkroja včasih potrebna aplikacija ekstremnejših pogojev (glej preglednico III). V literaturi zaradi večje možnosti napačne interpretacije (sprememba mehanizma razpada, spremenjena kinetika) navajajo posebno previdnost pri uporabi ekstremnejših pogojev. Da lahko razlikujemo med termoliznim in fotoliznim razpadom, termolizne stresne teste s kontrolirano ali nekontrolirano relativno vlago, največkrat izvajamo v temi.

Preglednica III: Zbrani pogoji stresnih študij za določanje intrinzične aktivnosti substance v trdni obliki in raztopinah ter trdnih in tekočih farmacevtskih oblik.

Vrsta pogojev	Pogoj (čas stresnega testa)
Termolizni	50-70°C (nekaj dni do 3 mesece) 70-90°C <i>za zelo stabilne vzorce</i>
Termolizni/RV	40-70°C / 51-75% 70-90°C / >75% <i>za zelo stabilne vzorce</i>
Hidrolizni	pH 1-13, možen dodatek sotopil (ACN), pri sobni T (do 14 dni)
Oksidacijski	0,03-3% H ₂ O ₂ , Cu ²⁺ , Fe ³⁺ , O ₂ atmosfera, Pri T do 40°C (do nekaj tednov)
Fotolizni	2-10-kratna doza vidne in/ali UV svetlobe, ki jo navaja Q1B ICH smernica

Pod termolizni razpad štejemo vse s temperaturo pogojene razpadne reakcije. Te so najpogostejše hidroliza/dehidracija, izomerizacije/epimerizacije, dekarboksilacije, premestitve, polimerizacije in še druge. V ta sklop ponavadi ne prištevamo fotoliznih reakcij in oksidacij, ker so te primarno odvisne od drugih dejavnikov in ne od temperature.

Za napovedovanje dolgoročnega termoliznega razpada je možno konstruiranje Arrheniusove odvisnosti, katere uporabo in omejitve bomo predstavili v nadaljevanju [3][6][7].

OKSIDACIJSKI RAZPAD

Oksidacije v raztopinah preverjamo z dodatkom raztopin H₂O₂ ali ionov kovin (npr. Fe²⁺). Oksidacijsko odpornost trdne substance, zmesi s pomožnimi snovmi in trdnih farmacevtskih oblik pa preverjamo z zapiranjem vzorcev pod O₂ atmosfero. Stresni testi posnemanja oksidacijskih pogojev se največkrat izvajajo v temi in pri temperaturi, ki pri vzorcih v raztopinah ne presega 40°C, pri trdnih vzorcih pa 60°C.

V splošnem oksidacijskega razpada torej ne štejemo med termično pogojene reakcije, toda oksidacije v trdnem stanju so zaradi zmanjšane mobilnosti molekul različne-počasnejše od klasičnih avtooksidacijskih reakcij v raztopini, ki imajo spremenljivo kinetiko razpada. To omogoči uporabo povišanih temperatur in Arrheniusove odvisnosti (ker je kinetika bolj

konstantna), problem pa se lahko pojavi, kadar se zaradi povišanih temperatur razgrajujejo primarni oksidacijski razgradni produkti v sekundarne [3][6][7].

II. Identifikacija razgradnega produkta

Razgradni produkti spadajo med organske nečistote. Za določitev mehanizma razpada je nujna identifikacija (določitev strukture) razgradnega produkta. Pri odločanju katere razgradne produkte bomo identificirali, se odločamo po dveh načelih:

- Upoštevanje ICH smernic o nečistotah v novih učinkovinah in novih farmacevtskih produktih (Q3A(R2) in Q3B(R2)), ki predpisujejo identifikacijo tistih nečistot (torej tudi razgradnih produktov), ki presežejo predpisan identifikacijski prag.
- Kemijsko voden pristop, pri katerem je naš namen identificirati vse razgradne produkte, ki so prisotni v relativno visokem deležu, četudi ne presegajo meje identifikacije.

Kadar želimo spoznati vse razpadne poti in hkrati potrditi ustreznost analizne metode, je bolje, če se ravnamo po drugem načelu. Sam proces določanja strukture zahteva veliko znanja organske, fizikalne in analizne kemije in uporabo širokega spektra analiznih metod. Nekateri splošni postopki identifikacije so:

- Izolacija razgradnega produkta s pomočjo HPLC-UV ter analiza na masnem spektrometru (MS) ali tandemskem masnem spektrometru (MS/MS). S tem dobimo informacijo o molski masi molekule, ki, če jo primerjamo z molskimi masami potencialnih razgradnih produktov, ponavadi že zadostuje za ustrezno identifikacijo.
- Identifikacija lahko poteka samo z uporabo HPLC-UV tehnike, kadar imamo na razpolago standard znanega razgradnega produkta.
- Za potrditev strukture razgradnih produktov ali kadar omenjene analizne tehnike identifikacije odpovejo, pa se uporablja NMR [3][8][9].

III. Določanje mehanizma razpada

Določitev mehanizma razpada je ključna za končno razumevanje intrinzične stabilnosti in nadaljno validacijo stabilnostno indikativne-metode.

Za določanje mehanizma razpada je nujno poznavanje glavnih razgradnih produktov. Pri tem igrata pomembno vlogo načrtovanje in ustrezna interpretacija rezultatov študij stresne

stabilnosti. Paziti moramo, da med glavne produkte ne prištevamo sekundarnih razgradnih produktov, ki bi nam dali napačno informacijo o glavnem mehanizmu razpada. Zato je pomembno, da za načrtovanje stresnega testa upoštevamo smernice za pogoje predstavljene v preglednici 3 in s tem nekoliko zmanjšamo možnost napačne interpretacije dobljenih podatkov [3][6][7].

IV. Kinetika razpada

Kinetike razpada primarno ne določamo pri intrinzični stabilnosti učinkovine in nas potencialna spremenjena kinetika niti ne moti veliko, če le ostajajo mehanizmi razpada enaki. Kinetika nas zanima predvsem v smislu izbire ustreznega časa staranja vzorcev pri izbranih pogojih, s katerimi dosežemo željen raskroj učinkovine oziroma željen procent razgradnega produkta. Postavlja pa se vprašanje, kakšen naj bi bil ta procent. Kot navajajo viri [3][6][7] je maksimalna vrednost raskroja učinkovine, ki jo želimo doseči 5 do 15 oziroma 20%. V tem območju raskroja naj bi dosegali najrealnejše mehanizme razpada in se izognili nastanku sekundarnih razgradnih produktov. Maksimalni čas staranja in pogoje moramo tako prilagoditi ciljanemu procentu raskroja [3][6][7].

1.2.2.2. RAZVOJ STABILNOSTNO INDIKATIVNE ANALIZNE METODE

Stresne teste za razvoj stabilnostno indikativne analize metode načrtujemo in razvijamo na podoben način kot stresne teste za določanje intrinzične stabilnosti učinkovine. Idealna kromatografska analizna metoda za določanje nečistot v vzorcu, bo od učinkovine ločila in hkrati zaznala vse razgradne produkte in sorodne snovi, pri tem pa bodo poznani tudi faktorji odzivnosti razgradnih produktov in sorodnih snovi glede na učinkovino. Pred poznavanjem intrinzične stabilnosti učinkovine ali končne farmacevtske oblike, je potrditev idealnosti neke metode oziroma označitev le-te za stabilnostno indikativno praktično nemogoča.

Najpogostejša kromatografska metoda, ki se jo uporablja za proučevanje kemijske stabilnosti učinkovine in farmacevtskih oblik, je HPLC. Običajno gre za reverzno fazno različico analize, ker je največkrat primerna ločitvena tehnika za večino zdravilnih učinkovin in njihovih analogov. Alternative so normalnofazna HPLC, TLC ali celo GC. Ločitev s HPLC je lahko izokratska ali gradientna, slednja je bolj primerna za začetne razvojne analize, kadar še ne poznamo celotnega spektra nečistot v vzorcu, ter za določanje vsebnosti sorodnih snovi in razgradnih produktov. Za detekcijo je najpogosteje uporabljen

UV spektrofotometer, možne pa so tudi druge detekcijske tehnike: fluorescenčni detektor, refraktometer, MS...

Ko razvijemo primerno metodo, jo je potrebno še validirati. ICH v smernici Q2(R1) postavlja parametre, ki jih je potrebno upoštevati pri validaciji metode. Ti so točnost, natančnost, specifičnost, meja detekcije, meja kvantifikacije, linearnost in območje linearnosti. Validacijske parametre je dobro preverjati že v fazi razvoja metode, seveda pa v primerno manjšem obsegu, kot pri validaciji končne analizne metode. [3].

1.2.2.3. UPORABA STRESNIH STABILNOSTNIH ŠTUDIJ ZA NAPOVEDOVANJE DOLGOROČNE STABILNOSTI IN IZVEDBO PRIMERJALNIH ŠTUDIJ

Podrobnih opisov, kako načrtovati in izvajati stresne študije za dolgoročna napovedovanja porastov deleža razgradnih produktov (ali padca deleža učinkovine) v literaturi nismo zasledili. Ponekod ta možnost uporabe sploh ni omenjena [5][10][11]. Tam, kjer je ta možnost uporabe omenjena, pa navajajo potrebo po dodatnih potrditvenih študijah metodologije [6], oziroma potrebo po vključitvi podatkov pospešene stabilnosti v takšne študije, z namenom bolj zanesljivega napovedovanja dolgoročne stabilnosti [3]. V literaturnih virih [12] [13] lahko zasledimo že veliko podatkov o uporabi pospešenih stabilnostnih študij za napovedovanje dolgoročne stabilnosti in z njimi si lahko pomagamo pri načrtovanju podobnih stresnih testov (kinetični vidik in vpliv vlage na kinetiko bosta tako predstavljena v nadaljevanju).

V tem sklopu študij omenimo še primerjalne stresne teste, ki jih v fazi trženja zdravila ali v razvojni fazi izvajamo z namenom hitre potrditve nespremenjene pospešene ali dolgoročne stabilnosti končne farmacevtske oblike, kateri smo spremenili sintezo ali ponudnika učinkovine, postopek formulacije, postopek pakiranja...[3]. Poglejmo si nekaj za nas aktualnih aspektov načrtovanja takih stresnih študij.

Uporabiti je potrebno že znane informacije iz študij stresne, pospešene in dolgoročne stabilnosti na učinkovini ali končni farmacevtski obliki, saj nam lahko zelo olajšajo načrtovanje. Predvsem pa moramo zaenkrat, dokler stresni testi še nimajo dokazane ustrezne metodologije za namene napovedovanja, vse napovedi preveriti z realnimi rezultati in tako potrditi ustreznost stresne študije ter **reprezentativnost rezultatov stresnih študij** [3][6]. Doseganje slednje je glavni cilj, a hkrati tudi naš glavni problem. Kot pri ugotavljanju intrinzične stabilnosti, je za reprezentativnost vzorca nujen

nespremenjen mehanizem razpada pri stresnih in dolgoročnih pogojih, v tem primeru tudi med dvema primerjanima vzorcema. Predlagan maksimalni **delež nastalega razgradnega produkta** za primerjalne študije ima vrednost nekje nad specifikacijsko mejo za določen razgradni produkt. Ob predpisani uporabi validirane stabilnostno indikativne analitske metode, je izpostavljena potreba po **spremljanju porasta deleža razgradnih produktov**, in ne padca deleža vsebnosti učinkovine, ker tako izkoristimo večjo točnost metod, ko gre za opazovanje manjših sprememb. Zaradi opazovanja zelo nizkih deležev razgradnih produktov, pa moramo poseben poudarek postaviti tudi na mejo detekcije in kvantifikacije analizne metode. **Vsebnik**, ki ga uporabimo za primerjalne stresne teste, naj bi bil enak, razen, če je naš namen dokazati enako stabilnost v različnih vsebnikih. Poudarja se še možna potreba po **kontroli relativne vlage** (odvisno od vsebnosti vode v farmacevtski obliki, sorpcijskih lastnosti in vpliva vode na reakcijo razpada) in potreba po enakih pogojih relativne vlage v primerjanih vzorcih. Dodaten vidik, glede na stresne teste za ugotavljanje intrinzične stabilnosti, ki ga moramo upoštevati, pa je kinetika razpadne reakcije. Potrebno je postaviti in potrditi kinetični model, ki pa se med stabilnostno študijo ne sme spreminjati. Le tako lahko namreč upravičimo uporabo Arrheniusove odvisnosti. Kinetične modele bomo opisali v nadaljevanju. Poudarja se še pomembnost statistično načrtovane stresne študije, ker se le tako na koncu razlike med vzorci lahko opredelijo za signifikantne ali pač ne. V ta namen je potrebno študije izvajati na večih serijah, poleg tega je potrebno za konstruiranje in dokazovanje linearnosti uporabiti vsaj 4 točke (torej 4 časovne točke, ko govorimo o določanju kinetike) [3].

Kljub določenim smernicam je področje uporabe stresnih testov za napovedovanje dolgoročne stabilnosti še dokaj neraziskano.

1.3. Kinetika kemijske reakcije v trdnih sistemih

Učinkovina lahko v produktu razpada po eni ali več razpadnih poteh, katerih kemijska kinetika je lahko zelo različna. Poznavanje te kinetike je ključnega pomena za kakršnokoli napovedovanje porasta razgradnih produktov oz. ekstrapolacijo kinetike na daljše časovno obdobje in/ali druge reakcijske pogoje (pogoje shranjevanja).

1.3.1. Osnove kemijske kinetike

Hitrost kemijske reakcije lahko opišemo s členom dx/dt , kjer dx predstavlja zelo malo spremembo v koncentraciji (deležu, masi) v zelo kratkem času (dt). Za hitrost kemijske reakcije velja, da je sorazmerna koncentraciji nastalega produkta, kakor tudi potenciranim koncentracijam reaktantov (vrednost potence je odvisna od števila molekul, ki vplivajo na hitrost reakcije). Seštevek omenjenih potenc na koncentracijah reaktantov imenujemo tudi *red* reakcije [14].

Enačba 1: Splošna enačba za hitrost reakcije: $aA + bB + \dots + nN \rightarrow \text{Produkt}$.

$$v = -\frac{1}{a} \frac{dA}{dt} = -\frac{1}{b} \frac{dB}{dt} = k \times (A^a) \times (B^b) \times \dots \times N^n$$

v ... hitrost reakcije, a, b, n ... število molekul udeležentih v reakciji.

dA, dB ... sprememba koncentracije reaktantov.

dt ... sprememba časa, k ... konstanta hitrosti reakcije.

A, B, N ... koncentracija reaktantov

Konstanta reakcije k , je specifična konstanta določene reakcije in je odvisna od:

- prisotnosti katalizatorjev,
- temperature (T)
- in topila v katerem reakcija poteka.

Vse naštetje spremenljivke lahko posledično tudi močno vplivajo na hitrost reakcije [14].

V farmaciji se srečamo z najrazličnejšimi kinetikami reakcij, najbolj pogoste, lahko razložljive in zaradi tega uporabne, pa so sledeče:

Reakcije 0.reda

Za reakcije ničtega reda je značilno, da je njihova hitrost neodvisna od koncentracije reaktantov in se zato s časom ne spreminja [14].

Enačba 2: Enačba hitrosti reakcije za 0.red.

$$v = \frac{dX}{dt} = k$$

v ... hitrost reakcije, dX ... sprememba koncentracije,

dt ... sprememba časa, k ... konstanta hitrosti reakcije

Reakcije psevdo 0.reda

Za reakcije psevdo-ničtega reda je značilno, da je njihova hitrost odvisna od koncentracije enega reaktanta, ki pa je skozi neko časovno obdobje konstantna. Hitrost reakcije lahko zato opišemo z enako enačbo kot pri ničtem redu, razlika je le v tem, da se moramo zavedati, da imamo v tem primeru opravka z navidezno konstanto kinetike [14].

Enačba 3: Enačba hitrosti reakcije za psevdo 0.red.

$$v = \frac{dX}{dt} = k(nav) = k \times (A)$$

v ... hitrost reakcije, dX ... sprememba koncentracije,

dt ... sprememba časa, k (nav) ... navidzna konstanta hitrosti reakcije,

k ... prava konstanta hitrosti reakcije, A ... konstantna koncentracija reaktanta.

Reakcije 1.reda

Za reakcije prvega reda je značilno, da je njihova hitrost sorazmerna koncentraciji reaktanta in se zato s časom spreminja [14].

Enačba 4: Enačba hitrosti reakcije za 1.red.

$$v = \frac{dX}{dt} = k \times (A^1)$$

v ... hitrost reakcije, dX ... sprememba koncentracije,

dt ... sprememba časa, k ... konstanta hitrosti reakcije,

A^1 ... spremnljajoča koncentracija reaktanta.

Reakcije psevdo 1.reda

Za reakcije psevdo prvega reda je značilno, da je njihova hitrost sicer sorazmerna koncentraciji dveh reaktantov, vendar pa je koncentracija enega reaktanta v prebitku glede na drugo, zato ima le slednja signifikanten vpliv na hitrost reakcije. Hitrost opišemo z enačbo za 1. red, spet pa imamo opraviti z navidezno konstanto [14].

Enačba 5: Enačba hitrosti reakcije za psevdo 1.red.

$$v = \frac{dX}{dt} = k(\text{nav}) \times (B) = k \times (A) \times (B)$$

v ... hitrost reakcije, dX ... sprememba koncentracije,

dt ... sprememba časa, k (nav) ... navidzena konstanta hitrosti reakcije,

k ... prava konstanta hitrosti reakcije, B ... koncentracija reaktanta v prebitku,

A ... ničja koncentracija reaktanta

Reakcije 2.reda

Za reakcije drugega reda je značilno, da je njihova hitrost odvisna od koncentracije dveh reaktantov [14].

Enačba 6: Enačba hitrosti reakcije za 2.red.

$$v = \frac{dX}{dt} = k \times (A^1) \times (B^1)$$

v ... hitrost reakcije, dX ... sprememba koncentracije,

dt ... sprememba časa, k ... konstanta hitrosti reakcije,

A^1, B^1 ... koncentracije reaktantov,

1.3.2. Teoretični in eksperimentalni kinetični modeli

Kadar imamo opraviti z učinkovinami v raztopinah kot končnih formulacijah so modeli, ki opisujejo kemijsko kinetiko, relativno jasni in jih precej dobro opišemo z 1.redom. Podobno lahko za učinkovino v suspenziji napovemo reakcijo razpada po kinetiki ničtega oziroma psevdo ničtega reda [14]. Nas pa je zanimala kinetika razpada v trdnih

heterogenih sistemih, ki pa je precej bolj kompleksna. V tabletah se lahko spreminjajo fizikalno-kemijske karakteristike učinkovine in tudi karakteristike pomožnih snovi.

V literaturi [3] in [15] je opisanih več modelov, ki jih je težko predpostaviti vnaprej, v vsakem primeru pa je potrebno izbrano kinetiko potrditi z eksperimentalnimi podatki za vsak posamezen produkt.

Nekateri primeri kinetičnih modelov so: **Janderjeva enačba** (model uporaben za farmacevtske oblike, kjer je en reaktant shranjen v drugemu in je reakcija razpada kontrolirana z difuzijo), **Bawnova enačba** (model za razpadne reakcije, kjer se tvori tekoč ali plinast produkt), **Leeson–Mattockova enačba** (model je uporaben, kadar učinkovina razpada v adsorbiranem sloju vode) [3][15], **Avrami Erofejeva enačba**, **Prout Thompkinsonsonova enačba** (model je uporaben, kadar hočemo upoštevati vpliv relativne vlage) in **avtokatalitični model**, ki ga lahko opišemo z več enačbami in za katerega velja, da lahko z njim opišemo kinetiko razpada kar 70% vseh malih molekul učinkovine kot take ali vgrajene v farmacevtsko obliko.

Avtokatalitični model

Z nastajanjem razgradnega produkta lahko nastajajo kristalizacijska jedra ali nepravilnosti v kristalni sestavi produkta, ki pogojujejo nadaljnje reakcije razpada učinkovine. Pri takem načinu razpada ima krivulja prirastka razgradnega produkta v odvisnosti od časa običajno S – obliko (slika 1), splošna enačba te krivulje pa je *enačba 7* [3][15].

Enačba 7: Enačba hitrosti reakcije za avtokatalitični model.

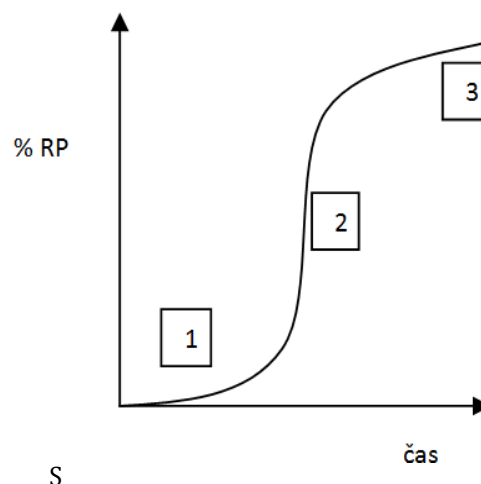
$$\frac{dx}{dt} = kx^l \times (1-x)^m \times t^n,$$

l, m, n ... konstante,

x ... delež razgradnega produkta,

t ... čas,

k ... konstanta razpada [15].



S

Slika 1: Shematski prikaz razpada po avtokatalitičnem modelu

Nastajanje razgradnega produkta lahko razdelimo v tri faze. V začetni fazi velja, da je kinetika tvorbe razgradnega produkta premosorazmerna s številom nastalih jeder in nepravilnosti v kristalni strukturi. Torej več kot jih je večji je vpliv na kinetiko razpada. Začetne faze ne moremo opisati z eno enačbo ampak s splošno, ki jo lahko modificiramo glede na eksperimentalne podatke [15].

Enačba 8: Enačba hitrosti, ki opisuje 1.fazo avtokatalitičnega modela.

$$\frac{dX}{dt} = k \times t^n$$

X .. koncentracija razgradnega produkta,

t .. čas,

k .. kinetika hitrosti kemijske reakcije,

n .. eksperimentalno določeno število

V literaturi nismo našli enačb, ki bi lahko opisovale fazo 2. hitrega naraščanja in fazo 3. upočasnjene prirasta razgradnega produkta. Avtokatalitični model opisujejo tudi druge enačbe, ki izhajajo iz splošne enačbe 7 [15].

Za večino omenjenih modelov velja, da prikazujejo relativno linearno kinetiko (0.red) vse nekje do meje 10 % razpada učinkovine. To nazorno prikaže tudi opisan avtokatalitični model. V primeru, da je eksperimentalno število n enako 0, *enačba 8* opisuje kinetiko 0.reda (glej *enačbo 2*) [3]. Glede na to, da se specifikacijske vrednosti za maksimalen prirast razgradnih produktov gibljejo v precej nižjih mejah (povprečno dodatnih 0,2 ali 0,5 % glede na začetno vrednost), smemo sklepati, da ti modeli največkrat v za nas relevantnem območju razkroja prikažejo kinetiko 0.reda [3][13]. Do podobnega sklepa bi prišli tudi v primeru, če bi se reakcija razpada v trdni farmacevtski obliki obnašala po kinetiki 1.reda. Do 2 % razpada učinkovine, bi kinetiko prav tako lahko obravnavali kot kinetiko 0.reda [12].

1.3.3. Načelo izokonverzije

Bolj podroben pregled kinetike v trdnih farmacevtskih oblikah, za namene napovedovanja dolgoročne stabilnosti s pospešenimi stabilnostnimi študijami, pa so se pripravili Waterman s sodelavci in poleg potrditve uporabe 0.reda predstavili še načelo izokonverzije. **Izokonverzija** v osnovi pomeni doseganje enakih deležev razkroja, samo načelo, pa je predpis, kako naj tak razkroj dosežemo. Z uporabo različnih časov in pogojev pospešenih stabilnostnih študij, se posnema realna kinetika in mehanizem razpada izbrane

trdne farmacevtske oblike. Izhaja pa iz predpostavke, da so različne mikroskopske fizikalne oblike in deformacije učinkovine in pomožnih snovi v končni farmacevtski obliki različno reaktivne. Poglejmo si primer. V farmacevtski obliki s kristalno obliko učinkovine imamo majhen delež amorfne ali deformirane kristalne oblike, ki je bolj reaktivna in predstavlja delež učinkovine, ki bo hitreje razpadel v naš razgradni produkt pri realnih pogojih shranjevanja. Če bomo pri bolj ekstremnih pogojih pospešenih študij, presegli ta procent razkroja, pa bo dobljena kinetika opisovala tudi razpad manj reaktivne kristalne oblike. Napovedi realnega razkroja z Arrheniusovo odvisnostjo bi v tem primeru zelo odstopale od dejanskih vrednosti. Če se torej držimo tega načela in čas staranja pri pogojih pospešene stabilnosti izbiramo tako, da bomo dosegali le procente razkroja, ki predstavljajo razpad bolj reaktivne oblike, bomo uspeli zmanjšati napake pri napovedi dolgoročne stabilnosti s pomočjo Arrheniusove odvisnosti. V realnosti primeri niso tako enostavni, vendar je bila uporaba načela izokonverzije eksperimentalno potrjena. Kot izhodiščna zgornja meja za željen razkroj v farmacevtski obliki je predstavljena specifikacija, ki omeji maksimalen dovoljen delež razgradnega produkta [3] [13]

1.3.4. Vpliv vode na kemijsko kinetiko v trdnih sistemih

Trdne snovi vedno vsebujejo nekaj vode. Vodo prisotno v trdni snovi lahko delimo na vezano (kemijsko-kristalohidrati) in nevezano (fizikalno- adsorbirana, kapilarna, delikvescentna). Količina fizikalno vezane vode je odvisna od higroskopnosti trdne snovi in od količine prisotne vlage v okolju. Nevezani obliki vode rečemo tudi prosta ali celo aktivna voda. Količina nevezane vode v sistemu najbolj pogojuje fizikalno-kemijske in mikrobiološke spremembe učinkovine in trdne farmacevtske oblike. Kvantitativno merilo proste vode v sistemu je vodna aktivnost (a_w), ker le-ta direktno vpliva na potencial vode, ki je merilo katerihkoli interakcij vode v sistemu. V ravnotežnem sistemu velja, da je vodna aktivnost enaka kar relativni vlagi okolja, kar izhaja iz enakosti potencialov pare in tekoče vode v ravnotežju. Vodno aktivnost lahko v ravnotežnih sistemih enostavno merimo s higrometri in tako na enostaven način ocenimo sposobnost vode do spremembe sistema [16].

Absolutna vlaga je količina vode v določenem volumnu zraka. Enota za podajanje absolutne vlage je g/m^3 .

Relativna vlaga (RV) je enaka kvocientu parcialnega tlaka vode v zmesi zraka in parcialnega tlaka vode v z vodno paro nasičeni zmesi zraka pri določeni temperaturi. Izraža se v procentih.

Vodna aktivnost (a_w) je enaka kvocientu parnega tlaka vode nad snovjo in parnega tlaka vode nad čisto vodo.

Zveza med **ravnotežno RV (RRV)** in a_w : $RRV = a_w \times 100\%$

Z vidika stabilnosti je pomembno poznati tendenco sistema po vezavi vode in posledice, ki jih prisotna voda povzroča. Poleg spremembe mikroskopskih fizikalnih stanj (kristalizacije...) in mikrobioloških sprememb lahko voda sodeluje na različne načine tudi pri kemijski spremembi farmacevtskih izdelkov. Z zagotavljanjem mobilnosti molekul (plastifikacijo trdne snovi) je lahko voda medij za kemijske reakcije ali pa je vključena vanje kot reagent (hidroliza). S tem opazimo pomemben vpliv vode na kinetiko tako kemičnih kot fizikalnih procesov. Nekateri že omenjeni kinetični modeli (Leeson-Mattockov, Prout-Thompsonsonov...) upoštevajo vpliv vode. Določanje vseh parametrov teh modelov, pa je lahko problematično [16]. S spremembo kinetike reakcije, lahko spremenjena a_w povzroči odstopanja od Arrheniusove odvisnosti. Vpliv vode na kinetiko pa lahko upoštevamo tudi posredno brez tvorbe posebnega kinetičnega modela. Z namenom napovedovanja dolgoročne stabilnosti in določanja občutljivosti konstante kinetike razkroja na vlago, lahko konstruiramo modificirano Arrheniusovo odvisnost, ki jo bomo opisali v sledečem poglavju [12][13].

Določanje kemijske kinetike je torej osnova za določanje RU ali kakršnokoli napovedovanje porasta razgradnih produktov farmacevtske oblike.

1.4. Arrheniusova odvisnost

1.4.1. Osnovna Arrheniusova enačba

Hitrost reakcije je torej odvisna od temperature. Če izhajamo iz osnovne teorije o trkih (Collision Theory of Reaction Rates), je najprej za potek reakcije pomembno, da molekule reaktantov med seboj trčijo. Informacijo o trkih nosi frekvenčni faktor A v enačbah 9 in 10. Kot je razložil Arrhenius, pa le trk ni dovolj. Za reakcijo morajo te molekule nositi s seboj tudi dovolj presežne energije, ki mora biti velikosti najmanj aktivacijske energije določene reakcije. Ko povišamo T , pa se število molekul, z energijo enako ali večjo od aktivacijske, poveča (in obratno), s čimer se poveča (zmanjša) tudi hitrost reakcije.

Enačba 9: Arrheniusova enačba in njena logaritmirana oblika [9].

$$k = A \times \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) \Rightarrow \ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT}$$

k ... konstanta hitrosti reakcije,

A ... frekvenčni faktor,

E_a ... aktivacijska energija,

R ... plinska konstanta $\left(8,314 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}\right)$,

T ... temperatura,

Omenjeni faktorji so povezani v Arrheniusovi enačbi (*enačba 9*) [14]. Enačbo lahko modificiramo do stopnje, kjer lahko iz nje enostavno računamo konstanto hitrosti reakcij pri posameznih temperaturah.

Zaradi spremenljive kinetike pri konstantni temperaturi so se v praksi pokazala določena odstopanja od Arrheniusove odvisnosti. Zato obstajajo določeni pogoji

za uporabo Arrheniusove enačbe:

1. Ekstrapolacije so dovoljene **znotraj nekega predpisanega sistema** oziroma med podobnima sistemoma (npr. uporaba za različne serije)
2. V sistemu **ne sme priti do fizikalnih sprememb**, poleg tega pa nobena sprememba ne sme biti posledica mehanske obremenitve ali kontaminacije sistema
3. Potrebna je ustrezna **aktivacijska energija (E_a)** razpadne reakcije (za termično pogojene reakcije naj bo ta **med 40 in 150 kJ/mol**)
4. Pri izbranih temperaturah **ne sme prihajati do spremembe mehanizma in kinetike razpada.**

5. V sistemu moramo vzdrževati **konstantno** a_w (oziroma konstantno ravnotežno relativno vlago (RRV)) [3][12][16][17].

1.4.2. Modificirana Arrheniusova enačba

Namen modifikacije Arrheniusove enačbe je bil razširitev možnosti pri izbiri pogojev pospešenih stabilnostnih študij. Enačba nam omogoča namreč aplikacijo spremenljive, a kontrolirane RV (v ravnotežnem sistemu je enaka a_w), s katero bomo lažje dosegli pogoje načela izokonverzije. Efekt kontrolirane relativne vlage na konstanto reakcije (v našem primeru konstanto razpada) v trdnih farmacevtskih oblikah je izražen z dodatkom člena $B \times RRV$ v logaritmirano obliko osnovne Arrheniusove odvisnosti.

Enačba 10: Modificirana Arrheniusova odvisnost.

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} + B \cdot RRV$$

k ... konstanta hitrosti reakcije,

A ... frekvenčni faktor,

E_a ... aktivacijska energija,

R ... plinska konstanta $(0,314 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}})$,

T ... temperatura,

B ... konstanta,

RRV ... relativna vlažnost

Enačbo so razvili na osnovi opažanj linearne odvisnosti logaritma konstante razpada od različnih RV pri konstantni temperaturi. Naklon te premice predstavlja konstanta B, katere velikost je odvisna od občutljivosti reakcije razpada posamezne farmacevtske oblike v odvisnosti od relativne vlage. V referenčnem članku je Waterman s sodelavci pokazal, da je B v večini primerov neodvisna od temperature. Pri specifičnih učinkovinah pa so kljub temu dokazali določene spremembe, zato je potrebna posebna previdnost pri računanju s konstanto B pri različnih temperaturah.

Pri načrtovanju stresnih testov na učinkovini, zmesi s pomožnimi snovmi in farmacevtski obliki ponavadi še ne poznamo konstante B. Takrat si lahko pomagamo z uporabo povprečne vrednosti B (0,04), ki so jo izračunali s študijami na večjem številu različnih učinkovin. S to enačbo nismo dobili samo razširitev možnosti pri izbiri pogojev za načrtovanje študij za napovedovanje dolgoročne stabilnosti, ampak tudi dobro kvantitativno orodje za določanje občutljivosti hitrosti razpadne reakcije na različne RV, katerim je lahko med transportom ali uporabo izpostavljeno zdravilo [13].

2. NAMEN DIPLOMSKEGA DELA

Za nekatere izdelke so napovedi stresnih testov prevelik približek realnega stanja dolgoročne stabilnosti, včasih pa le-te zaradi spremenljive kinetike razpada sploh ne moremo napovedati. Zato je smiselno razviti metodologijo stresno stabilnostnih študij, ki bi zadovoljivo napovedovala stabilnost našega produkta.

Spoznati kinetiko razpada oz. kako se ta spreminja s pogoji, je eden od osnovnih ciljev stresnih študij tako na učinkovinah kot na končnih farmacevtskih oblikah. Korelacije med stresnimi pogoji in kinetiko razpada večine učinkovin in njihovih raztopin so precej raziskane ter bolj ali manj sledijo Arrheniusovi odvisnosti. Uvedba Arrheniusove odvisnosti na kompleksnejših večkomponentnih sistemih pa je problematična in predstavlja izziv. Diplomsko delo bomo posvetili iskanju korelacije, ki nam bo pomagala napovedovati stabilnost enoodmernih trdnih farmacevtskih oblik (tablet).

Poskušali bomo postaviti nekaj osnov za načrtovanje stresnih testov, ter jih izvesti in potrditi na modelnih farmacevtskih oblikah. Naš namen bo pokazati, da lahko s stresnimi testi določimo ustrezno kinetiko razpada (0. red) in z uporabo (modificirane) Arrheniusove odvisnosti napovemo hitrost nastajanja razgradnega produkta pri realnih pogojih shranjevanja. Omejili se bomo na določanje značilnih razgradnih produktov učinkovin v posameznih modelnih farmacevtskih oblikah. Hkrati bomo opazovali tudi njihov videz.

Posebno poglavje bomo posvetili tudi vplivu vlage, ki lahko signifikantno vpliva na kinetiko razpada v farmacevtskih oblikah. V ta namen bomo merili vodno aktivnost (enaka RV v ravnotežnem sistemu) modelnih farmacevtskih oblik. Poskušali bomo zagotoviti tudi konstantne pogoje stresnih testov, ki bodo posnemali pogoje dolgoročnih študij stabilnosti.

Z uporabo modificirane Arrheniusove enačbe bomo:

- izračunali konstanto B , ter tako za posamezne učinkovine v modelnih farmacevtskih formulacijah pokazali občutljivost hitrosti razpada od RRV (a_w),
- pokazali neodvisnost konstante B od temperature,
- pokazali možnost uporabe omenjene enačbe za napovedovanje roka uporabnosti.

Na podlagi dobljenih rezultatov, bomo na koncu oblikovali splošna navodila za načrtovanje podobnih stresnih testov.

3. MATERIALI in METODE

3.1. Modelne farmacevtske oblike

Pri izbiri modelnih farmacevtskih oblik smo upoštevali sledeče splošne kriterije:

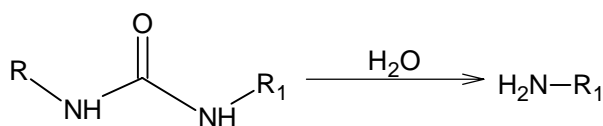
- učinkovina v končni farmacevtski obliki spada med nizkomolekularne sintezno pridobljene molekule,
- gre za trdno enodimenzionalno farmacevtsko obliko,
- retrospektivna študija zahteva izbiro končnih farmacevtskih oblik z že znanimi informacijami o pospešeni in dolgoročni stabilnosti,
- učinkovina v izbrani končni farmacevtski obliki se je v dosedanjih študijah pokazala za občutljivo na vlago,
- opazovani razgradni produkti nastajajo v različnih končnih farmacevtskih oblikah z različnimi reakcijami,
- izbran opazovan razgradni produkt posamezne farmacevtske oblike se je v dosedanjih študijah pokazal za kritičnega pri doseganju željene kvalitete izdelka ob roku uporabnosti oziroma običajno po 24 mesečni dolgoročni stabilnosti.

Pri izbiri niso bili pomembni:

- sestava končne farmacevtske oblike in deklarirana vsebnost učinkovine (jakost zdravila)
- vrsta razpadne reakcije.

3.1.1. Modelna farmacevtska oblika 1

Modelna farmacevtska oblika 1 vsebuje modelno učinkovino 1. Reakcija razpada je predstavljena na sliki 2, v osnovi pa gre za hidrolizo sečninskega dela aktivne molekule do amina. Obseg reakcije smo določili z merjenjem vsebnosti razgradnega produkta R_1-NH_2 .



Slika 2: Hidroliza sečninskega dela molekule, ki vodi v nastanek razgradnega produkta R1

Originalna ovojnina: Alu-Alu pretisni omot

Ovojnina za stresno testiranje: Alu-Alu pretisni omot

Shranjevanje do uporabe za stresno testiranje: 25°C/60% RV(3 mes) v originalni ovojnini.

Pri stresnem testu je ta vzorec veljal kot začetni vzorec (čas 0). Delež razgradnega produkta tega smo določili hkrati ob analizi vzorcev stresnega testiranja

Priprava za stresno testiranje: Modelno FO v originalni ovojnini smo postavili v komore z izbranimi stresnimi pogoji.

Fizikalna oblika učinkovine v končni farmacevtski obliki: Kristalna oblika.

Pogoji stresnega testa:

Preglednica IV: Pogoji stresnega testa

Sklop 1

<i>T (°C)</i>	40	50	60
<i>RV (%)</i>	*	*	*
<i>Čas (dan)</i>	7,14,31	7,14,21	7,10,14

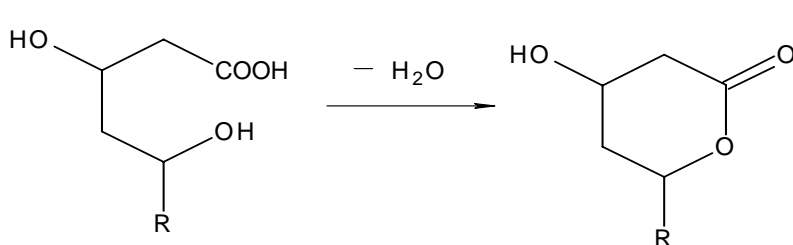
* začetna relativna vlaga (je enaka a_w) je enaka kot pri študijah dolgoročne stabilnosti (29,4%)

Meja kvantifikacije validirane HPLC metode za določanje izbranega razgradnega produkta R1: 0,02%

Specifikacijska meja za delež opazovanega razgradnega produkta R1: 0,4%

3.1.2. Modelna farmacevtska oblika 2

Modelna farmacevtska oblika 2 vsebuje modelno učinkovino 2. Shematska reakcija razpada je predstavljena na sliki 3 pri kateri gre za reakcijo dehidracije do



intramolekularnega laktona (razgradni produkt R2). Obseg reakcije smo določali z merjenjem vsebnosti laktona.

Slika 3: Reakcija dehidracije – nastali lakton je razgradni produkt R2.

Originalna ovojnina: HDPE plastenka s silikagelom

Ovojnina za stresno testiranje: steklena viala z gumijastim zamaškom, zaprta s kovinsko zaporko

Shranjevanje do uporabe za stresno testiranje: 25°C/60% RV (24 mes) v originalni obojnini. Pri stresnem testu je ta vzorec veljal kot začetni vzorec (čas 0). Začetni delež razgradnega produkta smo določili hkrati ob analizi vzorcev stresnega testiranja.

Priprava za stresno testiranje: Modelno FO iz originalne ovojnine na dan pričetka testiranja na ustrezen način prestavimo v ovojnino za stresne teste in postavimo v komore z izbranimi pogoji.

Fizikalna oblika učinkovine v končni farmacevtski obliki: Amorfn oblika.

Pogoji stresnega testa:

Preglednica V: pogoji stresnega testa

	Sklop 1				Sklop 2		
<i>T (°C)</i>	50	60	70	80	50	50	50
<i>RV (%)</i>	*	*	*	*	21	51	74
<i>Čas (dan)</i>	32,45,58	14,31,45	14,31,45	10,21	14,32,45	14,32,45	14,21
<i>T (°C)</i>	60	60	60		70	70	70
<i>RV (%)</i>	21	50	75		22	50	76
<i>Čas (dan)</i>	14,31,45	10,21	7,14		14,31,45	10,31	1,2

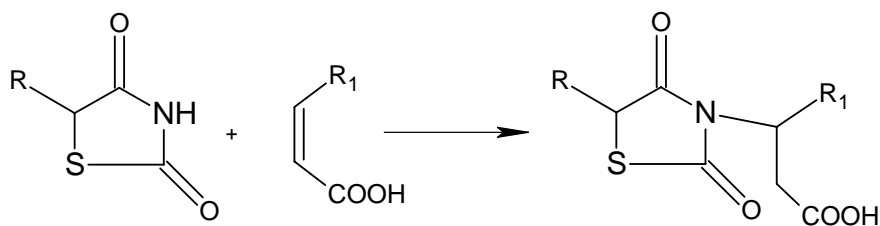
* začetna relativna vlaga (je enaka a_w) je enaka kot pri študijah dolgoročne stabilnosti (7,2%)

Meja kvantifikacije validirane HPLC metode za določanje izbranega razgradnega produkta R2: 0,03%

Specifikacijska meja za delež opazovanega razgradnega produkta R2: 0,9%

3.1.3. Modelna farmacevtska oblika 3

Modelna farmacevtska oblika 3 vsebuje modelno učinkovino 3. Reakcija razpada je predstavljena na sliki 4. Gre za nukleofilno adicijo aktivne substance na protion, produkt reakcije pa je razgradni produkt R3. Obseg reakcije bomo določali z merjenjem vsebnosti razgradnega produkta R3.



Slika 4: Nukleofilna adicija, ki vodi v nastanek razgradnega produkta R3.

Originalna ovojnina: HDPE plastenka s silikagelom

Ovojnina za stresno testiranje: steklena viala z gumijastim zamaškom, zaprta s kovinsko zaporko

Shranjevanje do uporabe za stresno testiranje: 25°C/60% RV (12 mes) v originalni obojnini. Pri stresnem testu je ta vzorec veljal kot začetni vzorec (čas 0). Začetni delež razgradnega produkta smo določili hkrati ob analizi vzorcev stresnega testiranja.

Priprava za stresno testiranje: Modelno FO iz originalne ovojnine na dan pričetka testiranja na ustrezen način prestavimo v ovojnino za stresne teste in postavimo v komore z izbranimi pogoji.

Fizikalna oblika učinkovine v končni farmacevtski obliki: Polimorfna oblika.

Pogoji stresnega testa:

preglednica VI: Pogoji stresnega testa

	Sklop 1			Sklop 2		
<i>T</i> (°C)	50	60	70	50	50	50
<i>RV</i> (%)	*	*	*	21	51	74
Čas (dan)	7,14,21	3,4,7	1,2	7,14,21	2,4,7	1,2

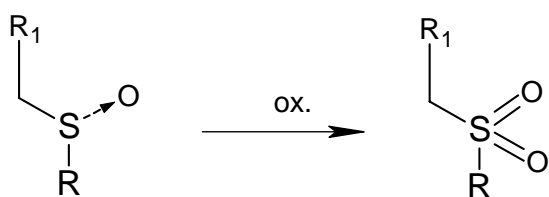
* začetna relativna vlaga (je enaka a_w) je enaka kot pri študijah dolgoročne stabilnosti (38,3%)

Meja kvantifikacije validirane HPLC metode za določanje izbranega razgradnega produkta R3: 0,01%

Specifikacijska meja za delež opazovanega razgradnega produkta R3: 0,5%

3.1.4. Modelna farmacevtska oblika 4

Modelna farmacevtska oblika 4 vsebuje modelno učinkovino 4. Reakcija razpada je predstavljena na sliki 5.



Gre za reakcijo oksidacije, pri kateri se tvori sulfonski analog učinkovine (razgradni produkt R4). Obseg reakcije bomo določali z merjenjem vsebnosti sulfonskega analoga.

Slika 5: Oksidacija učinkovine in nastanek sulfonskega analoga – razgradni produkt R4.

Originalna ovojnina: HDPE plastenka s silikagelom

Ovojnina za stresno testiranje: steklena viala z gumijastim zamaškom, zaprta s kovinsko zaporko

Shranjevanje do uporabe za stresno testiranje: (12 ali 18 mes) v originalni obojnini. Pri stresnem testu je ta vzorec veljal kot začetni vzorec (čas 0). Začetni delež razgradnega produkta smo določili hkrati ob analizi vzorcev stresnega testiranja.

Priprava za stresno testiranje: Modelno FO iz originalne ovojnine na dan pričetka testiranja na ustrezen način prestavimo v ovojnino za stresne teste in postavimo v komore z izbranimi pogoji.

Fizikalna oblika učinkovine v končni farmacevtski obliki: Polimorfna oblika.

Pogoji stresnega testa:

Preglednica VII: Pogoji stresnega testa

	Sklop 1			Sklop 2		
T (°C)	60	70	80	60	60	60
RV (%)	*	*	*	21	50	75
Čas (dan)	7,10,14	3,4,7	0,5,2,3	7,10,14	2,3,4	1,2,3

* začetna relativna vlaga (enaka a_w) je enaka kot pri študijah dolgoročne stabilnosti (39,0%)

Meja kvantifikacije validirane HPLC metode za določanje izbranega razgradnega produkta R4: 0,02%

Specifikacijska meja za delež opazovanega razgradnega produkta R4: 0,70%

3.2. Analizne metode in aparature

a) HPLC

Za določitev deleža posameznega razgradnega produkta smo uporabili HPLC-UV aparaturo znamke Waters (Slika 6).

Analizne metode so bile razvite za vsako posamezno modelno farmacevtsko obliko in uporabili smo identične metode, kot so jih uporabljali pri določanju pospešene in dolgoročne stabilnosti posameznih modelnih farmacevtskih oblik. Ko govorimo o identičnosti uporabljenih metod, to pomeni enake kromatografske pogoje (kolone, vrsto mobilne faze, pretok in gradient mobilne faze, temperature kolone, volumne injiciranja...) in enako pripravo vzorca (koncentracije, topila, načine raztapljanja in homogenizacije vzorca, filtracijo...). Le



Slika 6: Watersov Alliance® HPLC sistem [18].

tako smo lahko zagotovili primerljivost rezultatov stresnih testov z rezultati pospešene in dolgoročne stabilnosti. Ustreznost kromatografskih pogojev smo dokazali s preverjanjem TUKS (test ustreznosti kromatografskega sistema) parametrov, ki so del klasičnega postopka potrditve ustreznosti kromatografske metode pred vsako analizo.

Vse uporabljene HPLC-UV aparature so bile validirane, tako so imele ustrezno natančnost, točnost, linearnost, meje kvantifikacije in detekcije ter ostale parametre protokola validacije.

b) ELEKTRIČNI HIGROMETER

Za merjenje vodne aktivnosti (ravnotežne relativne vlage) smo uporabili električni higrometer znamke TESTO 650 (slika 7). Deluje na principu določanja temperature rosišča in temperature zraka iz česar lahko izračuna vodno aktivnost. Rosišče določa s pomočjo ploščice, na kateri pride ob ohlajanju do kondenzacije vodne pare, pojav pa se zazna, kot sprememba v prevodnosti električnega toka. Za določanje vodne aktivnosti smo uporabili kalibriran higrometer.



Slika 7: Električni higrometer TESTO 650 [19].

c) KOMORE Z USTREZNIMI NASIČENIMI VODNIMI RAZTOPINAMI ZA USTVARJANJE OKOLJA S ŽELJENO KONSTANTNO RELATIVNO VLAGO

Pripravili smo nasičene raztopine KF, NaBr in NaCl, ter jih zaprli v komore (Slika 8). Komore smo postavili v termostate z izbranimi temperaturami. Teoretične ravnotežne relativne vlage pri posamezni temperaturi so predstavljene v preglednici VIII. Kasneje smo zaradi lažjega računanja te vrednosti zaokrožili na vrednosti brez decimalnih mest.



Slika 8: Komora z relativno vlago 50%

Preglednica VIII: Eksperimentalne vrednosti ravnotežnih relativnih vlag pri različnih temperaturah posameznih nasičenih vodnih raztopin. V oklepajih so zaokrožene vrednosti povprečja [20].

<i>Nas. razt.</i>	<i>50°C</i>	<i>60°C</i>	<i>70°C</i>
KF	20,80+/-0,62% (21)	20,77+/-0,53% (21)	22,33+/-0,61% (22)
NaBr	50,93+/-0,55% (51)	49,66+/-0,78% (50)	50,33+/-1,3% (50)
NaCl	74,43,+/-0,19% (74)	74,50+/-0,3% (75)	75,58+/-0,55% (76)

d) TERMOSTATI

Glede na izbrane temperature smo za stresni test potrebovali tudi termostate, s konstantno kontrolirano temperaturo. Uporabili smo termostate s temperaturami 40°C, 50°C, 60°C, 70°C in 80°C in temperaturnimi nihanji +/-2°C.

e) PROGRAMSKI PAKET EMPOWER

HPLC analize smo vodili s pomočjo Watersovega programskega paketa Empower, s katerim smo lahko kontrolirali kromatografske pogoje in vrednotili kromatograme.

Dobljene kromatograme je bilo potrebno ustrezno integrirati, ter iz izračunanih površin, faktorjev odzivnosti, zateht standardov in vzorcev, deklariranih vsebnosti učinkovine v farmacevtskih oblikah, čistosti standardov in redčenj vzorcev ter standardov izračunati deleže ustreznih razgradnih produktov. Identifikacijo posameznih razgradnih produktov smo izvedli s hkratno analizo in primerjavo ustreznih referenčnih standardnih raztopin.

Obdelava rezultatov je bila predpisana z validirano analizo metodo in enaka, kot pri analizah pospešene in dolgoročne stabilnosti.

Tudi celotna obdelava rezultatov analize je bila, kot sama analizna metoda, validirana in predpisana skupaj z analizo metodo, hkrati pa identična obdelavi rezultatov analiz dolgoročne in pospešene stabilnosti.

f) PROGRAMSKI PAKET MICROSOFT OFFICE (excel, word)

Program Excel smo uporabili za urejanje podatkov, računanje kinetik na posameznih pogojih, za računanje Arrheniusove odvisnosti, računanje ekstrapoliranih vrednosti konstant in deležev razpada ter za oblikovanje grafikonov z namenom lažjega razumevanja in predstavitve dobljenih rezultatov.

g) STATISTIČNI PROGRAMSKI PAKET »R« ZA STATISTIČNO OBDELAVO DOBLJENIH REZULTATOV

Različica programa: R 2.8.0 [21].

Pri obdelavi rezultatov smo preverjali ali konstanta tvorbe razgradnega produkta določena s pomočjo stresnih testov pade v interval 95% zaupanja, ki smo ga določili s podatki o razpadu iz študij dolgoročne stabilnosti. Interval zaupanja smo izračunali s pomočjo programa R.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. Načrtovanje in izvedba stresnega testa

Kritični parametri s katerimi dosežemo željeno količino razgradnih produktov v farmacevtski obliki, so temperatura, relativna vlaga in čas staranja.

S povišanjem temperature in relativne vlažnosti bomo mogoče pospešili razkroj ter s tem pomembno znižali čas ter stroške testiranja, toda vprašanje je kako bo to vplivalo na reprezentativnost vzorca (korelacija z dolgoročno stabilnostjo). Z namenom dobivanja reprezentativnih vzorcev se je dobro držati načela izokonverzije, zaradi česar je potrebno najti kompromis med omenjenimi parametri. Pri načrtovanju stresnega testa je potrebno upoštevati še dva faktorja: analitski vidik (meja kvantifikacije izbrane validirane analize metode je lahko ključen omejitveni faktor) ter statistični vidik (tudi z namenom dokazovanja (ne)signifikantosti dobljenih sprememb glede na realne podatke).

Stresni test smo načrtovali individualno za vsako modelno farmacevtsko obliko posebej. S podatki dolgoročne in pospešene stabilnosti izbranih modelnih farmacevtskih oblik (ali drugih serij v podobni ovojnini) smo si pomagali že pri načrtovanju testa. Na ta način smo si olajšali izbiro pogojev. V nadaljevanju bomo poskušali podrobneje razložiti izbiro posameznih karakteristik stresnega testa.

a) TEMPERATURA

Pri izbiri temperature smo se držali načel, ki veljajo pri načrtovanju stresnih testov za določanje intrinzične stabilnosti, in sicer, da so temperature višje od uporabljenih pri pospešenih stabilnostnih študijah ($>40^{\circ}\text{C}$) ter da so med sabo različne za 10°C . Maksimalna priporočena temperatura je nekje do 70°C , oziroma za bolj stabilne vzorce tudi več, zato smo postavili zgornjo mejo pri 80°C . Iz tega območja smo torej izbirali temperature z namenom doseganja željenega razkroja v farmacevtski obliki.

b) RELATIVNA VLAŽNOST

Stresne teste za vrednotenje vpliva relativne vlage (v ravnotežnih pogojih je enala a_w) smo načrtovali na dva načina:

I. Z namenom posnemanja pogojev dolgoročnega testiranja smo vzorcem v originalnih obojninah izmerili vodno aktivnost, ter jih takoj po odprtju zaprli v steklene vial

(neprepustne za vlago). Na takih smo tudi kasneje izvedli stresni test pri ustrezni temperaturi. Po stresnem testu smo jih tik pred analizo odprli in jim izmerili vodno aktivnost. Na ta način smo hoteli zaslediti potencialno spremembo vodne aktivnosti glede na začetne vzorce oziroma ob nespremenjeni vodni aktivnosti utemeljiti uporabo Arrheniusove odvisnosti.

II. Drug vidik se je nanašal na določanje občutljivosti razpadne reakcije na relativno vlago (določanje modificirane Arrheniusove odvisnosti in določanje konstante B). Pri tem smo morali vzorce izpostaviti najmanj trem različnim pogojem s konstantno relativno vlago (konstantno a_w). Glede na podatke o izbiri relativne vlage pri določanju intrinzične aktivnosti (do 75%) smo izbrali pogoje z 21%, 50% in 75% relativno vlago. Te izbrane pogoje relativnih vlag smo kombinirali s pogoji različnih temperatur v razponu od 40°C do 70°C, kot se priporoča za izvedbo stresnih testov za določanje intrinzične stabilnosti.

c) VELIKOST VZORCA

Z namenom statistično ustreznega vrednotenja smo za določanje parametrov linearne regresijske premice (kinetika razpada po 0. redu in Arrheniusova odvisnost) potrebovali najmanj 3 točke. Zato smo se odločili, da bomo pri vsakem pogoju stresnega testa starali najmanj 2 vzorca (skupaj z začetno dobimo 3 časovne točke), stresni test pa bomo za vsako posamezno farmacevtsko obliko, z namenom konstruiranja ene Arrheniusove odvisnosti, izvedli pri najmanj treh pogojih.

Za večjo statistično moč končnih rezultatov oziroma za zelo natančno napovedovanje dolgoročne stabilnosti specifične farmacevtske oblike bi potrebovali mnogo večje število vzorcev (točk). Naš namen pa je bil le preiskovanje metodologije, zato smo uporabili manjše število točk, ki pa je še vedno omogočalo izračun in medsebojno primerjavo rezultatov. Na ta način smo si olajšali delo, saj smo preiskovali metodologijo na večjih farmacevtskih oblikah.

d) ČAS STARANJA VZORCA

Da smo lahko približno določili željen čas staranja, smo morali najprej predpostaviti kinetični model.

Glede na dejstvo, da smo izbrali trdne enodmerne farmacevtske oblike, da so bili dosedanja podatki o porastu razgradnih produktov pod specifikacijsko mejo in da smo imeli namen v tem območju razpada po stresnem testiranju tudi ostati ter glede na ugotovitve

predstavljene v poglavju Teoretični in eksperimentalni modeli (str. 19-21), smo predpostavili kinetiko razpada **po 0.redu**.

Izbran kinetični model smo imeli namen potrditi tako s podatki iz dolgoročnih in pospešenih študij, kot tudi kasneje s podatki iz stresnih študij. V primeru prevelikih odstopov od predpostavljenega modela smo imeli namen poskusiti vpeljavo drugačnega modela.

Tudi tu smo upoštevali podobno delitev pri načrtovanju stresnih testov, kot je omenjena pri izbiri relativnih vlag za stresne teste:

I. Pri določanju časovnega poteka stresnega testiranja za vzorce, ki so bili zaprti v steklenih vialah pri enaki začetni a_w kot pri študijah dolgoročne stabilnosti, smo postopali kot sledi:

1. Najprej smo s pomočjo znanih podatkov o procentu razpada pri pogojih dolgoročnih in pospešenih študij ($25^{\circ}\text{C}/60\%RV$, $30^{\circ}\text{C}/65(75)\%RV$, $40^{\circ}\text{C}/75\%RV$) in predpostavko o 0.redu določili konstanto kinetike razpada pri posameznih temperaturah.
2. S pomočjo dobljenih konstant razpada pri posameznih temperaturah smo izračunali parametre Arrheniusove odvisnosti. Potrebno je poudariti, da smo imeli ponekod na voljo samo podatke o razpadu pri dveh pogojih, tako da v tem primeru determinacijskega koeficienta, ki bi potrdil obnašanje po Arrheniusovi odvisnosti nismo mogli izračunati. Kljub temu dejstvu smo konstruirano Arrheniusovo odvisnost vseeno uporabili.
3. S pomočjo dobljene Arrheniusove odvisnosti smo izračunali konstante hitrosti tvorbe razgradnega produkta pri višjih temperaturah (od 40°C do 80°C).
4. S pomočjo dobljenih konstant tvorbe razgradnega produkta in njegovih začetnih vrednosti, smo pri določenem pogoju lahko izračunali potencialne deleže nastalega razgradnega produkta po določenih časih. Na ta način smo glede na delež razgradnega produkta izbrali točen pogoj stresnega testa in tudi časovne točke vzorčenja.

II. Pri načrtovanju časovnega poteka stresnih študij s kontrolirano relativno vlago smo morali vpeljati še dve dodatni predpostavki, če smo želeli s pomočjo modificirane Arrheniusove odvisnosti določiti ustrezen čas in pogoje testiranja.

1. Za določanje parametrov modificirane Arrheniusove odvisnosti smo potrebovali vrednost konstante B. Problem smo rešili z izbiro splošne vrednosti konstante B (0,04), omenjene v poglavju modificirana Arrheniusova odvisnost.

2. Predpostavili smo še neodvisnost konstante B od temperature.

Postopek določanja časovnega poteka stresnega testiranja je v osnovi podoben že prej omenjenemu. Razlikuje se le v 3.stopnji, kjer smo z upoštevanjem $B=0,04$, izmerjene začetne vodne aktivnosti a_{w1} (relativne vlage RV_1) in predpostavljene a_{w2} (relativne vlage RV_2 , v izbrani komori s konstantno RV) stresnega testa preko enačbe za modificirano Arrheniusovo odvisnost izračunali konstante tvorbe razgradnega produkta pri določeni temperaturi z izbrano konstantno a_{w2} (relativno vlago RV_2). V sledeči stopnji smo tako kot v omenjeni 4.stopnji lahko izračunali teoretične deleže razpada in s tem določili časovne točke vzorčenja na izbranih pogojih stresnega testa.

4.2. Izbira pogojev stresnega testa za posamezne modelne farmacevtske oblike

Rezultati in komentarji posameznih korakov načrtovanja, opisanih v prejšnjem poglavju, so predstavljeni za vsako posamezno modelno farmacevtsko obliko.

MODELNA FARMACEVTSKA OBLIKA 1:

Preglednica IX: V preglednici so predstavljeni že znani podatki o deležu razgradnega produkta R1 pri dveh različnih temperaturah študij pospešene in dolgoročne stabilnosti.

MFO 1 (R1)	t(mesec)	0	3	6		
	t(dan)	0	90	180		
T (°C)					k (%/mes)	r ²
25	conc(%)	0,025	0,08	0,12	0,016	0,992
40		0,025	0,24	0,4	0,063	0,993

Podatki o deležu razkrojnega produkta pri obeh temperaturah izkazujejo linearno odvisnost od časa (visoki determinacijski koeficienti), kar potrjuje predpostavko o kinetiki 0.reda.

Preglednica X – parametri Arrheniusove odvisnosti.

r ²	Ea (kJ/mol)	lnA
1	70,99	24,51

Pri načrtovanju smo bili omejeni s količino že znanih podatkov (samo dve točki), zato moči korelacije med $\ln k$ in $1/T$ nismo mogli ovrednotiti z determinacijskim koeficientom. Kljub temu smo dobljeno odvisnost uporabili za napoved deležev razkroja

pri pogojih stresnega testa. Aktivacijska energija je bila pod 150kJ/mol, kar je opravičilo uporabo Arrheniusove odvisnosti.

Preglednica XI: Vrednosti predvidenega deleža razgradnega produkta R1. Odebeljeno označene vrednosti so tiste, ki jih želimo doseči pri posameznem pogoj, zato smo izbrali temu ustrezne čase staranja.

MFO 1 (R1)	t(mesec)	0	0,23	0,33	0,47	0,7	1,03	
	t(dan)	0	7	10	14	21	31	
T		k (%/mes)						
40	Konc(%)	0,08	0,09	0,10	0,11	0,12	0,14	0,063
50		0,08	0,11	0,13	0,15	0,18	0,23	0,16
60		0,08	0,16	0,19	0,23	0,30	0,41	0,32
70		0,08	0,24	0,31	0,40	0,56	0,78	0,68

Izbiro pogojev smo prilagodili deležu razgradnega produkta, ki ga želimo doseči. Pri tem smo upoštevali specifikacijsko mejo 0,4%, kot zgornjo mejo in mejo kvantifikacije 0,02%, kot spodnjo mejo ciljanih deležev razkroja. S spodnjo mejo nismo imeli težav (že začetna vrednost je nad njo), zgornja meja pa je bila pomembna omejitev pri izbiri pogojev, če smo želeli upoštevati načelo izokonverzijske. Zaradi predvideno prehitrega porasta razgradnega produkta R1 in poznane sestave farmacevtske oblike, ki se je v dosedanjih študijah pokazala kot problematična pri visokih T, se nismo odločili za izbiro temperatur višjih od 60°C. To pa je z namenom izpeljave Arrheniusove odvisnosti iz 3 točk, privedlo do potrebe po izbiri pogoja študij pospešene stabilnosti (40°C). Analize pri tem pogoj, so sicer že bile narejene s študijami pospešene stabilnosti, vendar smo kljub temu dejstvu, z namenom pridobivanja primerljivih rezultatov, izvedli stresne študije pri 40°C.

Modelna farmacevtska oblika 1 ni bila izbrana z namenom konstruiranja modificirane Arrheniusove odvisnosti. Razloga za to sta dva, in sicer majhna količina vzorca ter vrsta ovojnine. Modelna farmacevtska oblika 1 je namreč hranjena v alu-alu pretisnem omotu, ki je neprepusten za vlago. Zaradi neprepustne ovojnine določitev vpliva vlage na razkroj nima bistvenega pomena. Z namenom posnemanja pogojev dolgoročne stabilnosti, je bilo najlažje stresne teste izvesti kar s farmacevtsko obliko v izvorni obojnini. Na ta način se lepo izognemo vplivu vlage iz okolja, ki lahko povzroči odstopa od Arrheniusovega obnašanja, zato iz tega vidika aplikacija modificirane Arrheniusove odvisnosti ni smiselna.

MODELNA FARMACEVTSKA OBLIKA 2:

Preglednica XII: V preglednici so predstavljeni že znani podatki o deležu razgradnega produkta R2 pri dveh različnih temperaturah študij pospešene in dolgoročne stabilnosti.

MFO2	t(mes)	0	2	3	6	9	12	18	24		
(R2)	t(dan)	0	60	90	180	270	360	540	720		
T (°C)	Konc									k (%/mes)	r ²
25	(%)	0,02			0,03	0,03	0,048	0,05	0,07	0,0021	0,936
40*1		0,02	0,06	0,08						0,02	0,982

*1Gre za podatke pospešene stabilnosti za enako serijo, kot je bila tista na kateri smo izvajali stresne teste, razlika je bila le v manjši velikosti vsebnika in ustrezno manjši količini sušilnega sredstva.

Determinacijski koeficienti potrjujejo predpostavko o kinetiki 0.reda. Komentirajmo še dejstvo, da je začetna vrednost 0,02%, pod mejo kvantifikacije metode za določevanje tega razgradnega produkta, ki je 0,03%. Poiskusili smo načrtovati Arrheniusovo odvisnost z začetno kot tudi brez začetne vrednosti in ugotovili, da med njima ni bistvene razlike. Ker pa nam je začetna vrednost služila tudi kot izhodišče za končno napovedovanje dolgoročne stabilnosti s pomočjo stresnih testov, smo jo kljub vsemu upoštevali.

Preglednica XIII – parametri (modificirane) Arrheniusove odvisnosti.

r ²	Ea (kJ/mol)	lnA (+B*RV)
1*1	117,73	41,33

*1 Imeli smo samo dve točki.

Linearne korelacije med lnk in 1/T nismo mogli oceniti, ker smo imeli na voljo samo dve točki. V fazi načrtovanja nas to niti ni tako motilo. Dobljena aktivacijska energija je bila ustrezna glede na kriterije za uporabo Arrheniusove odvisnosti (pod mejo 150 kJ/mol).

Preglednica XIV prikazuje ciljane deleže razgradnega produkta. Kot zgornjo mejo smo upoštevali specifikacijsko vrednost 0,90%, spodnja meja pa je bila meja kvantifikacije (0,03%). Le-to smo presegli že z začetno vrednostjo (0,07%) in nam ni predstavljala posebnega problema. Zaradi velike napovedane konstante razpada pri maksimalni temperaturi (80°C), smo se odločili, da bomo stresni test izvedli še pri temperaturi 50°C.

Pri načrtovanju stresnih testov za uporabo modificirane Arrheniusove odvisnosti, smo upoštevali enako spodnjo mejo, zgornjo mejo pa smo ponekod zaradi lažje izbire časov staranja pomaknili za malenkost nad specifikacijsko vrednost. Poudariti je potrebno, da smo imeli na tej modelni farmacevtski obliki namen pokazati neodvisnost konstante B od

temperature. V ta namen smo v stresni test vključili 9 različnih pogojev (po tri različne pogoje konstantne relativne vlage pri treh različnih temperaturah). Zaradi večjega števila vzorcev smo pri nekaterih pogojih načrtovali samo dva časa vzorčenja.

Preglednica XIV: Vrednosti predvidenega deleža razgradnega produkta R2 v odvisnosti od pogoja in časa. Odebeljeno označene vrednosti so tiste, ki jih želimo doseči pri posameznem pogoju, zato smo izbrali temu ustrezne čase staranja. Izmerjena začetna relativna vlaga je 7,2%, B je 0,04, začetna vrednost deleža R2 pa 0,07%.

MFO 2 -(R2)	t(mes)	0	0,1	0,23	0,33	0,47	0,7	1	1,5	2	
	t(dan)	0	3	7	10	14	21	30	45	60	
T(°C)/											k (%/mes)
RV(%)											
50		0,070	0,078	0,89	0,10	0,11	0,13	0,15	0,20	0,23	0,081
60		0,070	0,10	0,14	0,17	0,21	0,28	0,37	0,52	0,67	0,30
70		0,070	0,17	0,31	0,42	0,56	0,80	1,11	1,64	2,16	1,05
80		0,070	0,40	0,86	1,19	1,64	2,42	3,43	5,12	6,80	3,37
50/21	Konc. (%)	0,070	0,084	0,10	0,12	0,14	0,17	0,21	0,28	0,35	0,14
50/51		0,070	0,12	0,18	0,23	0,29	0,40	0,54	0,77	1,00	0,46
50/74		0,070	0,19	0,34	0,46	0,62	0,89	1,24	1,83	2,42	1,17
60/21		0,070	0,12	0,19	0,25	0,32	0,44	0,60	0,86	1,12	0,53
60/50		0,070	0,245	0,48	0,65	0,89	1,29	1,82	2,69	3,56	1,74
60/75		0,070	0,51	1,09	1,53	2,11	3,14	4,45	6,64	8,83	4,38
70/22		0,070	0,25	0,50	0,68	0,92	1,34	1,89	2,80	3,70	1,81
70/50		0,070	0,67	1,48	2,08	2,88	4,29	6,10	9,11	12,13	6,03
70/76*1		0,070	1,59	3,6	5,11	7,13	10,66	15,20	22,76	30,32	15,13

*1 Zaradi preglednosti tabele nista vpisana deleža razgradnega produkta 0,57% in 1,08% za 1 in 2 dneva staranja, na podlagi katerih sta bila izbrana tudi ustrezna časa stresnega testa za ta pogoj.

Poudarimo, da se nekateri dejanski časi, navedeni v protokolu testiranja, razhajajo z izbranimi časi, navedenimi v preglednici XIV. Razlog za to pa je napaka storjena pri prepisu načrtovanega časovnega protokola vzorčenja in posledično napačna izbira časa vzorčenja.

MODELNA FARMACEVTSKA OBLIKA 3:

Preglednica XV: V preglednici so predstavljeni že znani podatki o deležu razgradnega produkta R3 pri treh različnih temperaturah študij pospešene in dolgoročne stabilnosti.

MFO 3 (R3)	t(mesec)	0	3	6	9	12		
	t(dan)	0	90	180	270	360		
T (°C)							k (%/mes)	r ²
25	Konc.	0,05	0,06	0,09	0,11	0,13	0,0070	0,984
30	(%)	0,05	0,1	0,17	0,23	0,30	0,021	0,997
40		0,05	0,34	0,63			0,097	1,000

Z dobljenimi determinacijskimi koeficienti lahko potrdimo predpostavljen 0.red. Ta torej dovolj dobro opiše kinetiko nastajanja razgradnega produkta.

Preglednica XVI – parametri (modificirane) Arrheniusove odvisnosti.

r ²	Ea (kJ/mol)	lnA (+B*RV)	Visok determinacijski koeficient (modificirane) Arrheniusove odvisnosti pokaže visoko mero korelacije med lnk in 1/T, zato lahko upravičeno
0,997	125,66	46,02	izračunamo ekstrapolirane vrednosti konstant razpada pri višjih temperaturah oziroma tudi pri različnih relativnih vlagah.

Specifikacijska meja za razgradni produkt R3 je 0,5%, zato smo poskušali pri izbiri časa staranja in temperature ostati nekje v tem območju (glej preglednico XVII). Pri 70°C smo izbrali tako poleg začetne samo še dve časovni točki, ker smo že z drugo malo presegli 0,5%. Opazimo, da ne moremo postaviti standardnega časa za vsak pogoj. Po 21 dneh namreč pri 50°C predvidevamo ustrezen razkroj do 0,5%, pri 70°C, pa bi v enakem času prišli že do nekje 5% porasta razgradnega produkta. Pri tem pa bi bila lahko že vprašljiva aplikacija 0.reda. Poleg tega z 10-kratno prekoračitvijo specifikacijske meje pod vprašaj postavimo tudi načelo izokonverzije. Pri pogojih z različno relativno vlago smo izbrali temperaturo 50°C. Pri višjih temperaturah bi bilo težje načrtovati časovni potek testiranja zaradi prehitrega razkroja.

Preglednica XVII: Vrednosti predvidenega deleža razgradnega produkta R3. Odebeljeno označene vrednosti so tiste, ki jih želimo doseči pri posameznem pogoju, zato smo izbrali temu ustrezne čase staranja. Izmerjena začetna relativna vlaga je 38,3%, B je 0,04, začetna vrednost deleža R3 pa 0,13%.

MFO 3 (R3)	t(mesec)	0	0,033	0,067	0,1	0,13	0,23	0,33	0,466	
	t(dan)	0	1	2	3	4	7	14	21	
T										k
										(%/mes)
50	Konc. (%)	0,13	0,15	0,16	0,18	0,19	0,24	0,35	0,45	0,46
60		0,13	0,19	0,26	0,32	0,38	0,57	1,00	1,45	1,88
70		0,13	0,37	0,60	0,84	1,07	1,78	3,43	5,07	7,06
50/21		0,13	0,14	0,15	0,15	0,16	0,18	0,24	0,29	0,23
50/51		0,13	0,16	0,18	0,21	0,24	0,31	0,49	0,67	0,77
50/74		0,13	0,19	0,26	0,32	0,39	0,58	1,02	1,48	1,92

MODELNA FARMACEVTSKA OBLIKA 4:

Preglednica XVIII: V preglednici so predstavljeni že znani podatki o deležu razgradnega produkta R4 pri treh različnih temperaturah študij pospešene in dolgoročne stabilnosti.

MFO 4 (R4)	t(mesec)	0	3	6	9	12		
	t(dan)	0	90	180	270	360		
T (°C)							k (%/mes)	r²
25	Konc. (%)	0,09	0,13	0,14	0,14	0,20	0,0077	0,853
30		0,09	0,16	0,17	0,19	0,26	0,012	0,917
40		0,09	0,22	0,29			0,033	0,971

Zaradi variabilnosti rezultatov determinacijski koeficienti niso visoki, še vedno pa nakazujejo na 0.red kinetike.

Preglednica XIX – parametri (modificirane) Arrheniusove odvisnosti.

r ²	Ea (kJ/mol)	lnA (+B*RV)	Visok determinacijski koeficient (modificirane) Arrheniusove odvisnosti pokaže visoko mero korelacije med lnk in 1/T, zato lahko upravičeno
0,999	76,30	25,91	izračunamo ekstrapolirane vrednosti konstant razpada pri višjih temperaturah oziroma tudi pri različnih relativnih vlagah.

Preglednica XX: Vrednosti predvidenega deleža razgradnega produkta R4. Odebeljeno označene vrednosti so tiste, ki jih želimo doseči pri posameznem pogoju, zato smo izbrali temu ustrezne čase staranja. Izmerjena začetna relativna vlaga je 39%, predpostavljen B je 0,04, začetna vrednost deleža R4 pa 0,20%.

MFO 4 (R4)	t(mesec)	0	0,033	0,067	0,1	0,13	0,23	0,33	0,466	
	t(dan)	0	1	2	3	4	7	10	14	
T(°C)/RV(%)										k
										(%/mes)
50	Konc. (%)	0,20	0,20	0,21	0,21	0,21	0,22	0,23	0,24	0,082
60		0,20	0,21	0,21	0,22	0,23	0,24	0,26	0,29	0,19
70		0,20	0,21	0,23	0,24	0,26	0,30	0,34	0,40	0,43
80		0,20	0,23	0,26	0,29	0,32	0,41	0,51	0,63	0,92
60/21		0,20	0,20	0,21	0,21	0,21	0,22	0,23	0,24	0,094
60/50		0,20	0,21	0,22	0,23	0,24	0,27	0,30	0,34	0,30
60/75		0,20	0,23	0,25	0,28	0,31	0,39	0,47	0,58	0,81

Specifikacijska meja (zgornja meja) za razgradni produkt R4 je 0,7%, meja kvantifikacije (spodnja meja) pa 0,02%. Spodnjo mejo presežemo že z začetno vrednostjo, zgornja pa je pomemben omejitveni faktor. Ker je razpad pri 50°C zelo počasen, smo se odločili za izbiro višjih temperatur. Zaradi upoštevanja načela izokonverzije smo izbrali pogoje, ki bodo vodili do približno enakih razkrojov pod specifikacijsko mejo. Z namenom čim bolj skrajšati stresni test smo se odločili za maksimalen 0,1 % dodaten razkroj. Opazimo lahko, da bi bilo pogoje z upoštevanjem načela izokonverzije za nekoliko večji razkroj težko izbrati, če smo omejeni samo na pogoje različne temperature (ali pa različne vlage pri konstantni temperaturi), kot smo bili mi, ker smo stresno testiranje razdelili na dva sklopa (glej tabelo VII). Če bi poznali točno konstanto B, bi lahko z ustreznim programom in uporabo modificirane Arrheniusove enačbe izbirali kombinirane pogoje, npr. 70°C, 80°C in 60°/75%RV, in poskušali pri enakem maksimalnem času celokupnega stresnega testa doseči tudi do 0,2% dodatnega razkroja. Mi se za tak način izvedbe stresnega testa, zaradi prezapletene programske obdelave, nismo odločili.

4.3. Modelna farmacevtska oblika 1

a) **Videz:** Tablete pri pogojih 40°C in 50°C so podobne kot začetne – gladke, **bele** in ovalne, z ustrežno oznako. Pri tabletah staranih pri 60°C pa pride do **rahlo rjavega** obarvanja. Sprememba lahko nakazuje na fizikalno spremembo v farmacevtski obliki.

b) Vodna aktivnost (merjena pri 20°C-25°C):

Preglednica XXI: Vodne aktivnosti merjene na vzorcih po stresnih testih.

T (°C)	t(dan)	7	10	14	21	31	
40		27,7		26,9		26,7	Po stresnih testih smo zaznali bistvene spremembe vodne aktivnosti (enake RV v vialah, ker se je vzpostavilo ravnotežje)
50	a _w (%)	28,0		27,1		26,7	
60		75,0	74,2	79,7			

glede na začetno stanje (Zač: 29,4%) pri vzorcih staranih na temperaturi 60°C. Vodna aktivnost se je spremenila kar za približno 45%, zaradi česar je bila ustreznost aplikacije Arrheniusove odvisnosti pri vseh pogojih stresnih testov vprašljiva oziroma glede na te rezultate kar neprimerna. Vodna aktivnost se pri vzorcih staranih pri 40°C in 50°C ni bistveno spremenila. Razlog za spremembo vodne aktivnosti pri 60°C je v sestavi farmacevtske oblike (vsebuje Ca₂HPO₄·2H₂O), saj so bile tablete starane v za vlago neprepustni ovojnini (alu-alu pretisni omot).

Hidrati vsebujejo kemično vezano vodo, ki ne vpliva na vodno aktivnost. Kadar pa je presežena določena temperatura (značilna za posamezen hidrat), pa se lahko ta voda sprosti. Proces je ireverzibilen in literaturni podatki kažejo, da začne Ca₂HPO₄·2H₂O izgubljati vodo pri temperaturi nad 40°C [22]. Spremenjeno mikrookolje v tableti glede na prosto praškasto obliko Ca₂HPO₄·2H₂O in stopenjsko sproščanje hidratne vode, sta razloga, da pri temperaturi do 50°C v našem primeru, ne pride do povečanja vodne aktivnosti ter da se signifikantno povečanje pojavi šele pri temperaturi nad 50°C oziroma vzorcih, staranih pri 60°C.

Odmik od Arrheniusovega obnašanja vzorcev pri 60°C, napoveduje poleg spremenjene vodne aktivnosti tudi, potencialna sprememba mikrofizikalnega stanja (sprememba dihidrata) pomožne snovi v farmacevtski obliki.

c) 1.del rezultatov (Arrheniusova enačba)

Preglednica XXII: V preglednici so predstavljeni podatki o deležu razgradnega produkta R1 v odvisnosti od časa in temperature stresnih testov.

MFO 1 -	t(mesec)	0	0,23	0,33	0,47	0,7	1,03	3	6		
	t(dan)	0	7	10	14	21	31	90	180		
	T (°C)									k(%/mes)	r ²
40	Konc.	0,07	0,11		0,13		0,16			0,082	0,915
50	(%)	0,07	0,16		0,2	0,22				0,21	0,904
60		0,07	0,66	0,8	1,28					2,7	0,951

Deleži razgradnega produkta R1 so podobni napovedanim, ko gre za rezultate pri 40°C in 50°C. Pomembno pa je, da smo z razkroji ostali v željenem območju (pod mejo specifikacije). Deleži razkroja pri 60°C so tudi do 4-krat višji od napovedanih in tako zelo presežejo specifikacijsko mejo (načelo izokonverzije ni več upoštevano). Povečan razkroj enostavno razložimo s povišano vodno aktivnostjo, ki smo jo opisali za vzorce pri tem pogoju. Determinacijski koeficienti niso visoki, še vedno pa potrjujejo našo predpostavko o kinetiki 0.reda.

Konstruiranja Arrheniusove odvisnosti, smo se lotili na dva načina.

Najprej smo poskušali odvisnost izpeljati z upoštevanjem podatkov pri vseh treh temperaturah stresne študije: 40°C, 50°C in 60°C. Determinacijski koeficient 0,928 kaže na linearen odnos med $\ln k$ in $1/T$, vendar še zdaleč ni tako visok, kot smo ga dobivali pri drugih modelnih farmacevtskih oblikah. Aktivacijska energija, ki smo jo določili (147,77 kJ/mol), pa je približno 2-krat večja od tiste določene iz podatkov dolgoročne in pospešene stabilnosti pri načrtovanju tega stresnega testa (70,99 kJ/mol). Kljub temu smo izvedli ekstrapolacijo ter določili še konstante razpada pri 25°C (preglednica XXIV).

Pri drugem načinu smo upoštevali spremembo vodne aktivnosti in nepričakovano visoke deleže razpada pri 60°C. Pri konstruiranju Arrheniusove odvisnosti smo zato upoštevali samo podatke pri temperaturah 40°C in 50°C. Determinacijski koeficient ni podal realne slike o moči odvisnosti med $\ln k$ in $1/T$, saj smo imeli na razpolago samo dve točki. Ocenili pa smo lahko vrednost aktivacijske energije (79,55 kJ/mol), za katero smo ugotovili, da je dokaj podobna tisti določeni iz podatkov dolgoročnih in pospešenih študij (70,99 kJ/mol).

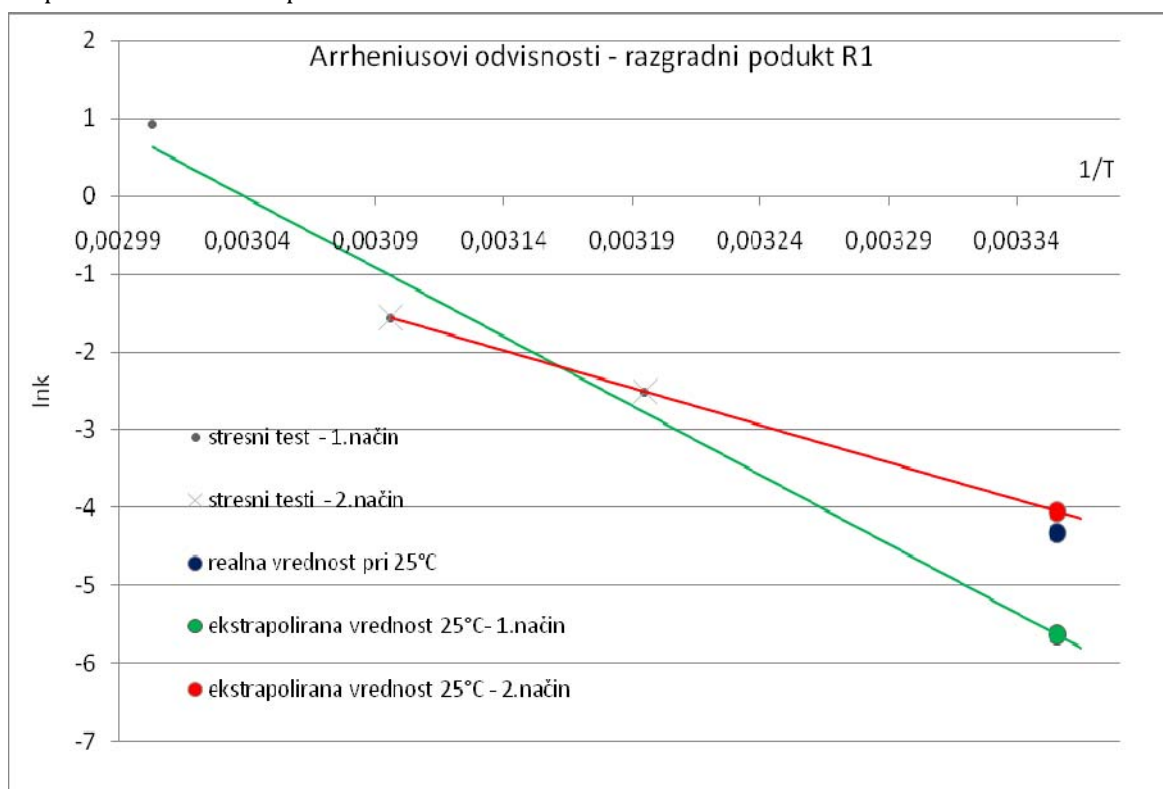
Ustreznost dobljene Arrheniusove odvisnosti smo poskušali pokazati še s primerjavo ekstrapoliranih konstant razpada pri 25°C in realne konstante razpada pri 25°C.

Preglednica XXIII: Parametri dobljenih Arrheniusovih odvisnosti.

	r2	Ea (kJ/mol)	lnA
1.način *1	0,928	147,77	54,0082
2.način *2	1*	79,55	28,061

*1Upoštevamo vse tri temperature stresnega testa.

*2Upoštevamo samo temperaturi 40 in 50°C.



Graf 1: Na grafu so predstavljene Arrheniusove odvisnosti dobljene na 1. in 2. način. Na grafu sta označeni tudi na 1. in 2. način ekstrapolirani vrednosti konstant razpada pri 25°C ter realna konstanta razpada pri 25°C.

Graf 1 dobro prikaže odstopanje na 1.način dobljene Arrheniusove odvisnosti od realnih vrednosti. Nasprotno je vrednost konstante razpada izračunana iz Arrheniusove odvisnosti dobljene na 2. način zelo blizu realni vrednosti.

Preglednica XXIV: V preglednici imamo predstavljene deleže razgradnega produkta R1 v odvisnosti od časa, in sicer realne rezultate pri 25°C in napovedane vrednosti izračunane iz ekstrapoliranih konstant razpada pri 25°C dobljenih na 1. ali 2. način.

MFO 1 -R1		t(mesec)	0	3	6		
		t(dan)	0	90	180		
T			k (%/mes)				r ²
25°C	ekstrap. 1.način	Konc.	0,025	0,036	0,047	0,0036	-
25°C	ekstrap. 2.način	(%)	0,025	0,077	0,13	0,018	-
25°C	realne		0,025	0,08	0,12	0,016	0,992

Če primerjamo deleže razgradnega produkta po 6 mesecih ugotovimo, da smo bolj natančno napoved dobili, ko smo za konstruiranje Arrhenisove odvisnosti uporabili samo podatke pri temperaturah 40°C in 50°C. Konstanta dobljena s 1.načinom (upoštevanje 60°C) je bila prenizka, posledično je bila občutno prenizka tudi napovedana vrednost deleža razgradnega produkta po 6 mesecih (0,047).

Razlike smo ovrednotili tudi statistično. Iz znanih podatkov dolgoročne stabilnosti smo izračunali 95% interval zaupanja za realno konstanto razpada in preverili ali vrednosti dobljenih konstant razpada padejo v izračunan interval.

Parametri računanja intervala zaupanja za konstanto razpada:

$$\alpha=0,05 \quad n=3 \quad k_{25^{\circ}\text{C realni}} = 0.016 \quad \text{ST.DEV}_k = 0,0014$$

Izračunan 95 % interval zaupanja (CI_{95%}): $(-0.0025 \leq k \leq 0.034)$

$$k_{25^{\circ}\text{C ekstrapolirani 1.način}} = 0,0036 \Rightarrow \text{je zunaj CI}_{95\%} !$$

$$k_{25^{\circ}\text{C ekstrapolirani 2.način}} = 0,018 \Rightarrow \text{je znotraj CI}_{95\%} !$$

Podatke s staranja pri 60°C ne smemo uporabiti za konstruiranje Arrheniusove odvisnosti in napovedovanje dolgoročne stabilnosti, saj je bila na 1.način napovedana konstanta razpada zunaj izračunanega intervala.

Nasprotno smo ob upoštevanju podatkov s staranja pri 40°C in 50°C (2.način) napovedali konstanto razpada pri 25°C, ki se signifikantno ni razlikovala od realne. S tem smo rešili tudi problem ocenitve ustreznosti dobljene Arrheniusove odvisnosti (imeli smo samo dve točki), ki jo lahko, na podlagi te ustrezno napovedane konstante, opredelimo za primerno.

Sklenemo lahko, da se stresne teste, ob upoštevanju vseh navedenih parametrov, lahko uporablja za napovedovanje dolgoročne stabilnosti (porast razgradnega produkta R1) modelne farmacevtske oblike 1.

4.4. Modelna farmacevtska oblika 2

a) Videz: Do spremembe videza ni prišlo pri vzorcih staranih pri 50°C in 60°C. Pri pogoju 70°C in pogojih s 21% in 50% relativno vlago so se začetne rožnato obarvane tablete spremenile v rahlo rjavo obarvane. Močnejšo rjavo barvo so imele tablete pri 80°C in pri pogojih 75% vlage. Pri vseh pogojih povišane relativne vlage so tablete nabrekle (višja kot je bila relativna vlaga bolj so nabrekle), tiste pri pogoju 75% relativne vlage pa so imele lepljivo površino. Vpliv temperature nismo mogli posebej opredeliti, sklenili pa smo lahko, da vlaga pomembno vpliva na konstitucijo oziroma videz farmacevtske oblike. Kaj to pomeni za aplikacijo Arrheniusove odvisnosti je bilo na začetku težko reči, dejstvo pa je, da lahko ob nabrekanju tablet prihaja do sprememb (fizikalnih in kemijskih), ki povzročajo odstopanja od omenjene odvisnosti.

b) Vodna aktivnost (merjena pri 20°C-25°C):

Preglednica XXV: Vodne aktivnosti merjene na vzorcih po stresnih testih.

T (°C)	t(dan)	3	7	10	14	21	31	45	60	povp. a_w *1
50	a_w (%)						6,7	6,6	7,0	6,8
60					6,2		6,6		6,5	6,4
70					5,4		4,5		5,8	5,2
80				7,7		7,9				7,8

*1 Povprečno vodno aktivnost smo izračunali z namenom uporabe le-te pri konstruiranju modificirane Arrheniusove odvisnosti (v nadaljevanju 2.2. Določanje neodvisnosti konstante B od temperature in napovedovanje dolgoročne stabilnosti s modificirano Arrheniusovo odvisnostjo).

Vodne aktivnosti po stresnih testih so zelo podobne začetni vrednosti (7,2%). Uporaba Arrheniusove odvisnosti je iz tega vidika utemeljena, saj za razliko od velikih sprememb vodne aktivnosti pri modelni farmacevtski obliki 1, v modelni farmacevtski obliki 2 teh nismo zasledili. Vzorcem, ki smo jih imeli med stresnimi testi v komorah s konstantno RV, nismo merili vodne aktivnosti, ker smo to lahko določili s poznavanjem ravnotežne relativne vlage posamezne komore (je enaka a_w). Te vzorce smo zaprli takoj po prenosu iz komore.

c) 1.del rezultatov (Arrheniusova enačba)

Preglednica XXVI: V preglednici so predstavljeni podatki o deležu razgradnega produkta R2 v odvisnosti od časa in temperature stresnih testov.

MFO 2 - (R2)	t(mes)	0	0,23	0,33	0,47	0,7	1,03	1,5	2			
	t(dan)	0	7	10	14	21	31	45	60			
T(°C)											k (%/mes)	r ²
50	Konc. (%)	0,085					0,18	0,20	0,25	0,083	0,987	
60		0,085			0,25		0,44		0,49	0,28	0,962	
70		0,085			0,57		0,92		1,13	0,69	0,968	
80		0,085		3,39			6,94			8,27	0,989	

Predpostavka o 0.redu se je tako kot pri načrtovanju pokazala za pravilno, saj so determinacijski koeficienti relativno visoki in nakazujejo na linearen odnos med deležem razgradnega produkta in časom. V večini so napovedanim vrednostim podobni tudi deleži razgradnega produkta iz pogojev 50°C in 60 °C. Pri 70°C smo zaradi napake pri vzorčenju pri dveh vzorcih presegli specifikacijsko mejo in dobili vrednosti 0,92% po 31 dneh in 1,13% po 45 dneh (v nadaljevanju bom razložil uporabo omenjenih rezultatov). Najbolj pa odstopajo od napovedanih vrednosti rezultati pri 80°C. Tudi tu smo sicer naredili napako pri vzorčenju (kot pri 70°C smo vzorčili prepozno), vendar je za razliko od rezultatov pri 70°C, odstopanje od ustreznih napovedanih vrednosti, bistveno večje. Poleg tega obe vrednosti deleža razgradnih produktov pri 80°C občutno presegata specifikacijsko mejo. Kljub dejstvu, da je kinetiko pri 80°C možno opisati z 0.redom, je vprašljiva ustreznost aplikacije teh rezultatov v Arrheniusovo odvisnost. S pomočjo dobljenih rezultatov in upoštevanjem omenjenih dejstev smo konstruirali Arrheniusovo odvisnost na tri načine.

1.način: Upoštevali smo vse dobljene rezultate, kljub dejstvu, da nekatere vrednosti presegajo specifikacijsko mejo.

2.način: Upoštevali smo rezultate o razkroju pri 50°C, 60°C in 70°C. Utemeljitev: dva deleža pri 70°C sicer presegata specifikacijo, vendar je presežek minimalen.

3.način: Upoštevali smo rezultate iz 50°C in 60°C, ter prvi rezultat iz 70°C, ker nobeden od teh ne presega specifikacijske meje.

Preglednica XXVII: Parametri na 1., 2. in 3. način dobljenih Arrheniusovih odvisnosti.

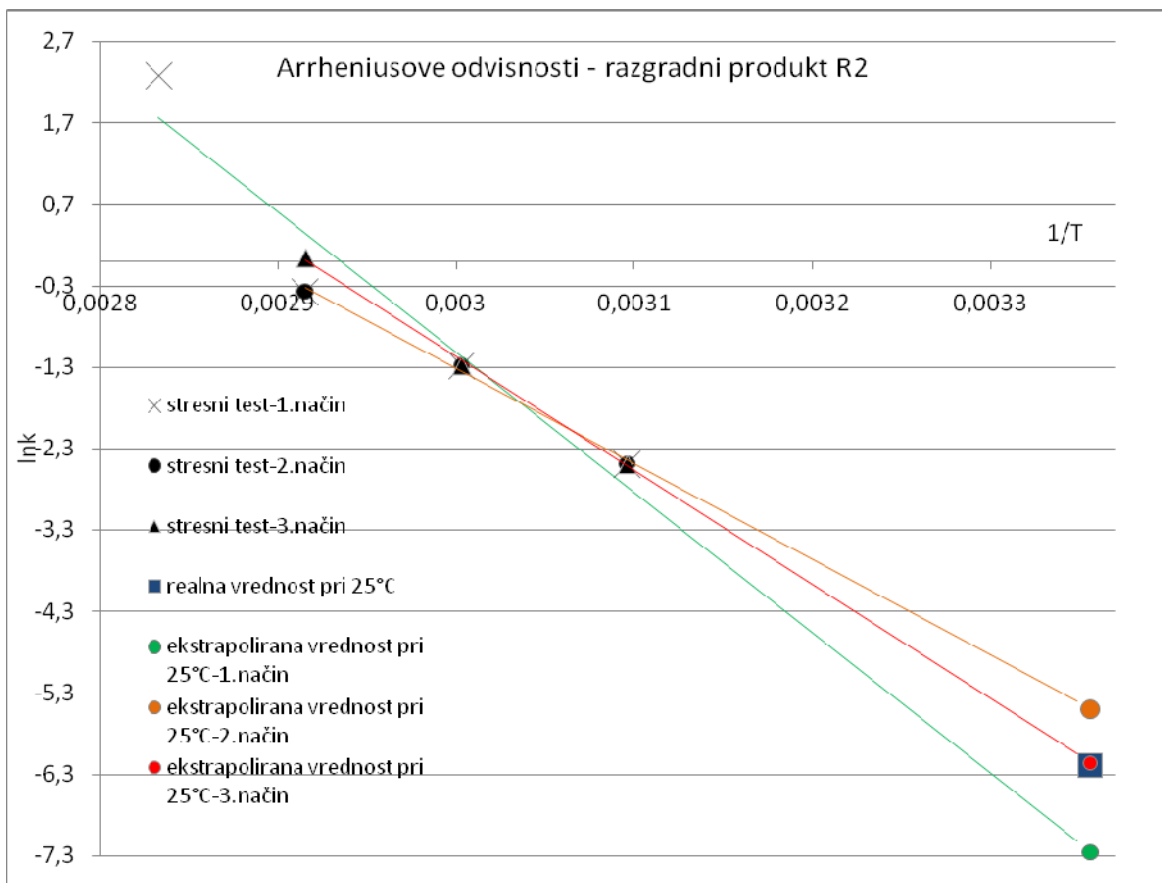
	r^2	Ea	lnA	
1.način	0,929	143,48	50,65	Da se vzorec pri 80°C ne obnaša več po Arrheniusovi odvisnosti, nam pokaže relativno
2.način	0,996	97,63	33,90	nizek determinacijski koeficient odvisnosti,
3.način	0,998	116,52	40,86	dobljen na 1.način. Pri 2. in 3. načinu namreč

dobimo odvisnosti z visokima determinacijskima koeficientoma, ki nakazujeta obnašanje po Arrheniusovi odvisnosti. Vse izračunane aktivacijske energije so nižje od zgornje meje 150 kJ/mol, ki še dovoljuje uporabo Arrheniusa, zato so v tem pogledu primerne. Če jih primerjamo še z realno vrednostjo aktivacijske energije (117,73 kJ/mol), je najbližja tista, ki je dobljena na 3.način. Ponovno pa je potrebno opozoriti, da je bila realna Arrheniusova odvisnost konstruirana iz samo dveh točk in s podatki pospešene stabilnosti enake serije v manjši ovojnini. Zaradi tega, je za opredelitev ustreznosti Arrheniusovih odvisnosti potrebna nadaljna primerjava izključno z rezultati študij dolgoročne stabilnosti.

Iz grafa 2 (str.54) je lepo razvidno, da je najbolj ustrezna Arrheniusova odvisnost, tista dobljena na 3.način. Ekstrapolirana vrednost logaritmirane konstante razpada pri 25°C namreč sovpada z realno vrednostjo, dobljeno z dolgoročnimi stabilnostnimi testi. Tega ne moremo trditi za ostali dve vrednosti logaritmiranih konstant, dobljenih na 1. in 2. način.

Še bolj jasno sliko pokažejo dejanske vrednosti konstant in napovedani deleži razgradnega produkta po 12 in 24 mesecih predstavljeni v preglednici XXVIII (str.54). Konstanta razpada pri 25°C določena na 3.način, se na drugem decimalnem mestu ujema z realno vrednostjo, medtem ko ostali dve, določeni na 1. in 2. način, odstopata od realne vrednosti. Če primerjamo deleže razgradnega produkta pridemo do podobnih sklepov, pri čemer so le-ti določeni na 1.način popolnoma neustrezni (prenizki), deleži določeni na 2.način pa ne odstopajo veliko, še posebej, če opazujemo vrednosti po 12 mesecih.

Glede na ugotovljeno, se nam postavlja le še vprašanje ustreznosti Arrheniusove odvisnosti dobljene na 2.način.



Graf 2: Na grafu so predstavljene Arrheniusove odvisnosti dobljene na 1., 2. in 3. način. Na grafu so označene tudi na 1., 2. in 3. način ekstrapolirane vrednosti konstant razpada pri 25°C ter realna konstanta razpada pri 25°C.

Preglednica XXVIII: V preglednici imamo predstavljene deleže razgradnega produkta R2 v odvisnosti od časa, in sicer realne rezultate pri pogoju 25°C in napovedane vrednosti izračunane iz ekstrapoliranih konstant razpada pri 25°C dobljenih na 1., 2. ali 3.način.

MFO 2 -R2		t(mesec)	0	12	24		
		t(dan)	0	360	720		
T						k (%/mes)	r ²
25°C	ekstrap. 1.način	Konc.	0,02	0,028	0,037	0,00070	-
25°C	ekstrap. 2način	(%)	0,02	0,068	0,12	0,0041	-
25°C	ekstrap. 3 način		0,02	0,045	0,071	0,021	-
25°C	realne		0,02	0,048	0,07	0,0021	0,936

Za dokončno opredelitev pa smo izvedli sledeče statistične analize, kjer smo preverili ali vrednosti ekstrapoliranih konstant razpada padejo v 95% interval zaupanja za realno konstanto razpada.

Parametri računanja intervala zaupanja za realno konstanto razpada:

$$\alpha=0,05 \quad n=6 \quad k_{25^{\circ}\text{C}}^{\text{realni}} = 0.0021 \quad \text{ST.DEV}_k = 0,00027$$

Izračunan 95 % interval zaupanja (CI 95%): $(0.0013 \leq k \leq 0.0028)$

$k_{25^{\circ}\text{C}}$ ekstrapolirani na 1.način = 0,00070 => je zunaj CI 95% !

$k_{25^{\circ}\text{C}}$ ekstrapolirani na 2.način = 0,0041 => je zunaj CI 95% !

$k_{25^{\circ}\text{C}}$ ekstrapolirani na 3.način = 0,0021 => je znotraj CI 95% !

Obe konstanti nastanka razgradnega produkta R2 (dobljeni na 1. in 2. način) sta zunaj izračunanega 95% intervala zaupanja za realno konstanto razpada. Torej se je za primerne za namene napovedovanja dolgoročne stabilnosti izkazal 3.način, pri katerem smo upoštevali samo deleže razpada, ki so dejansko pod specifikacijsko mejo oziroma, pri katerem smo upoštevali načelo izokonverzije.

Kljub nespremenjeni kinetiki 0.reda pri 80°C, dobljena Arrheniusova odvisnost ob upoštevanju le-te ni bila primerna. Zakaj je prišlo do tega, nismo znali natančno razložiti. Vodna aktivnost se ni bistveno spremenila, farmacevtska oblika ni izkazovala bistvenih sprememb videza in kinetika se torej ni spremenila. Razlog za odstopa pa bi lahko bila sprememba mikrofizikalnega stanja, možno pa je tudi, da pri tej temperaturi Arrheniusova odvisnost enostavno ne velja več.

Rezultati so nam pokazali, da je, ob upoštevanju omenjenih parametrov, s stresnim testom možno napovedati ustrezno dolgoročno stabilnost modelne farmacevtske oblike 2.

d) 2.del rezultatov (modificirana Arrheniusova enačba)

DOLOČANJE KONSTANTE B

Preglednica XXIX: V preglednici so predstavljeni podatki o deležu razgradnega produkta R2 odvisnosti od časa, temperature in RV stresnega testa. Odebeljene vrednosti so tiste, ki smo jih izbrali za izpeljavo modificirane Arrhenisuve odvisnosti.

MFO 2 (R2)	t(m t(d)	0	0,1	0,2	0,23	0,33	0,47	0,7	1,03	1,5		
T(°C)/ RV %											k (%/mes)	r ²
50/21		<i>0,085</i>					0,24		0,45	0,55	<i>0,32</i>	<i>0,994</i>
50/51		0,085					4,27		5,58	6,11	3,78	0,837
50/74	C (%)	0,085					4,32	4,61			4,77	0,828
60/21		0,085					0,86	1,21	1,35		0,82	0,888
60/50		0,085				6,19		7,8			10,91	0,881
60/75		0,085			5,39		2,07				4,25	0,137
70/22		0,085					2,19		3,2	3,48	2,20	0,878
70/50		0,085				10,25	12,21				10,36	0,705
70/76		0,085	4,71	6,08							89,92	0,911

Če izključimo dejtvo, da smo naredili pri določenih vzorčenjih napako, in primerjamo naše rezultate z ustreznimi napovedananimi vrednostmi (glej preglednico XIV) ugotovimo, da so dobljene vrednosti deležev razgradnega produkta občutno višje. To pomeni, da je bila predpostavljena konstanta B 0,04 prenizka oziroma, da je reakcija nastanka razgradnega produkta bolj občutljiva na vlago, kot smo predvideli. V kombinaciji z našo napako (prepoznim vzorčenjem) je to privedlo do stanja, kjer je večina deležev razgradnega produkta R2 preseгла specifikacijsko mejo. Rezultate pod specifikacijsko mejo smo dobili samo pri milejših pogojih. Problem pa se nam je pojavil tudi ob poskusu potrjanja 0.reda. Izbran model smo lahko potrdili pri pogojih z 21% relativno vlago in pri pogoju 70°C/75%RV, ostali determinacijski koeficienti pa so bili relativno nizki in niso potrjevali naše predpostavke o 0.reda. Nezmožnost uporabe 0.reda lahko tesno povežemo z dobljenimi visokimi deleži razgradnega produkta in neupoštevanjem načela izokonverzije. Spremenjena kinetika je lahko posledica sprememb v farmacevtski obliki, ki jih je nakazal videz (nabrekanje, obarvanje). Za dokončno opredelitev razloga za spremembo bi morali opraviti nadaljne analize in pokazati, ali je prišlo, do sprememb fizikalnega stanja

farmacevtske oblike. Z izključitvijo teh pa bi lahko nasprotno potrdili načelo izokonverzije. V dokazovanje se nismo spuščali, poskušali pa smo uporabiti informacije ustreznih rezultatov.

Glede na sklepe, ki smo jih izpeljali iz 1.dela rezultatov (Arrheniusova odvisnost), smo se odločili večino rezultatov višjih od specifikacijske meje zavreči in s tem delno rešiti problem aplikacije 0.reda in neupoštevanja načela izokonverzije. Naredili pa smo eno izjemo. Kot lahko vidimo v preglednici XXIX, nobena vrednost pri pogoju 70°C/22% ni pod specifikacijsko mejo. Nujno smo potrebovali vsaj eno točko pri tem pogoju in ob upoštevanju relativno visokega determinacijskega koeficienta (ob potrjanju 0.reda z vsemi tremi deleži razgradnega produkta pri tem pogoju) smo menili, da bomo najmanjšo napako pri določanju konstante razpada za ta pogoj storili, če bomo upoštevali samo prvo vrednost 2,19%.

Za konstruiranje modificirane Arrheniusove odvisnosti pa zaradi neupoštevanja rezultatov staranja pri 50% in 75% RV nismo imeli dovolj podatkov. Iz rezultatov pri 21 % oz. 22% RV smo dobili 1 točko, potebovali smo vsaj še eno. Pomagali smo si s podatki s katerimi smo konstruirali v 1.delu Arrheniusovo odvisnost. Upoštevali smo še povprečja izmerjenih vodnih aktivnosti (glej preglednico XXV) in tako dobili še drugo točko. Iz dobljenih modificiranih Arrheniusovih odvisnosti, katerim linearnega značaja nismo mogli določiti, smo izračunali konstante B.

Preglednica XXX: Parametri modificirane Arrheniusove odvisnosti za temperature 50°C, 60°C in 70°C.

50°C	RV(%)	6,8	21	B	r ²
	lnk	-2,49	-1,15	0,094	1
60°C	RV(%)	5,2	21	B	r ²
	lnk	-1,28	0,51	0,11	1
70°C	RV(%)	6,4	22	B	r ²
	lnk	0,039	1,5	0,094	1

Ustreznost dobljenih konstant B smo želeli potrditi tako, da smo njihovo povprečje (B=0,099) uporabili za

napovedovanje dolgoročne stabilnosti in napoved primerjali z realno vrednostjo. Toda še prej smo morali pokazati njihovo neodvisnost od temperature. Če pogledamo posamezne vrednosti konstant, vidimo da sta konstanti B pri 50°C in 70°C enaki, konstanta B pri 60°C pa se od njiju razlikuje, in sicer je večja za 0,016. Signifikantnost razlike smo poskušali opredeliti na sledeč način. S posameznimi konstantami B smo napovedali dolgoročno stabilnost in poskušali pokazati, da posamezne napovedane konstatne tvorbe razgradnega produkta R2 niso signifikantno različne od realne. V tem primeru smo lahko sklepali, da

konstante B niso signifikantno različne in je B za to farmacevtsko obliko neodvisna od temperature. To pa je pomenilo, da bi povprečje konstant B lahko uporabili za napovedovanje dolgoročne stabilnosti.

DOLOČANJE NEODVISNOSTI KONSTANTE B OD TEMPERATURE IN NAPOVEDOVANJE DOLGOROČNE STABILNOSTI Z MODIFICIRANO ARRHENIUSOVO ODVISNOSTJO.

Napovedi dolgoročne stabilnosti s pomočjo modificirane Arrheniusove enačbe smo se lotili na sledeč način. Iz izbranih deležev razgradnega produkta pri 50°C/21%RV, 60°C/21%RV in 70°C/22%RV (odebeljeno označeni rezultati v preglednici XXIX) smo konstruirali Arrheniusovo odvisnost. Uporabo izbranih deležev razgradnega produkta R2 in uporabo 0.reda za določanje konstant hitrosti tvorbe razgradnega produkta na posameznem pogoju smo utemeljili že pri računanju konstant B.

Preglednica XXXI: Parametri Arrheniusove odvisnosti za relativno vlago 21,33%.

r ²	Ea (kJ/mol)	lnA+B*21,33%
0,983	121,64	41,83

Poudarimo, da dobljena Arrheniusova odvisnost velja za relativno vlago 21,33% (s tem smo uvedli manjšo poenostavitev, saj smo izračunali povprečje relativnih vlag v komorah pri 50°C, 60°C in 70°C). Visok determinacijski koeficient potrjuje obnašanje po Arrheniusovi odvisnosti, aktivacijska energija 121,64 kJ/mol, ki pa je nižja od 150 kJ/mol, pa dodatno upravičuje rabo dobljene odvisnosti za napovedovanje dolgoročne stabilnosti.

Preglednica XXXII: V preglednici imamo predstavljene deleže razgradnega produkta R2 v odvisnosti od časa, in sicer realne rezultate pri pogoju 25°C ter napovedane vrednosti izračunane iz ekstrapoliranih konstant razpada pri 25°C dobljenih z upoštevanjem različnih konstant B, relativne vlage za katero je veljala Arrheniusova odvisnost (20,33%) in relativne vlage za katero smo izpeljali Arrheniusovo odvisnost (7,2%).

MFO 2 -R2		t(mesec)	0	12	24		
		t(dan)	0	360	720		
T						k (%/mes)	r ²
25°C	ekstrap.(B=0,11)	Konc.	0,02	0,040	0,06	0,0016	-
25°C	ekstrap.(B=0,094)	(%)	0,02	0,045	0,070	0,0021	-
25°C	ekstrap.(Bpovp=0,099)		0,02	0,043	0,066	0,0020	-
25°C	realne		0,02	0,048	0,07	0,0021	0,936

Če torej uporabimo formulo za modificirano Arrheniusovo odvisnost, lahko s poznavanjem B, ki smo ga izračunali, in s poznavanjem a_w (enaka ravnotežni RV) vzorca, kateremu napovedujemo dolgoročno stabilnost (v našem primeru 7,2%), izračunamo parametre Arrheniusove odvisnosti, ki bo veljala za izbrano a_w (ravnotežno RV, ki je torej 7,2%). Dobljeno Arrheniusovo odvisnost pa lahko potem uporabimo za napoved dolgoročne stabilnosti.

Za dokončno opredelitev pa smo izvedli sledeče statistične analize, kjer smo preverili ali vrednosti ekstrapoliranih konstant razpada padejo v 95% interval zaupanja za realno konstanto razpada.

Parametri računanja intervala zaupanja za realno konstanto razpada:

$$\alpha=0,05 \quad n=6 \quad k_{25^{\circ}\text{C realni}} = 0,0021 \quad \text{ST.DEV}_k = 0,00027$$

Izračunan 95 % interval zaupanja (CI 95%): $(0,0013 \leq k \leq 0,0028)$

$k_{25^{\circ}\text{C ekstrapolirani B}=0,11} = 0,0016 \Rightarrow$ je znotraj CI 95% !

$k_{25^{\circ}\text{C ekstrapolirani B}=0,094} = 0,0021 \Rightarrow$ je znotraj CI 95% !

Glede na to, da sta vrednosti konstant razpada pri 25°C napovedani z upoštevanjem $B=0,094$ in $B=0,11$ znotraj 95% intervala zaupanja, lahko sklepamo, da konstante B pri 50°C, 60°C in 70°C niso signifikantno različne in B ni odvisna od temperature. To pomeni, da povprečno konstantno B lahko uporabimo za napovedovanje dolgoročne stabilnosti. Tudi tako napovedano konstanto smo ovrednostili še statistično.

$k_{25^{\circ}\text{C ekstrapolirani B}=0,099} = 0,0020 \Rightarrow$ je znotraj CI 95% !

Sklenemo lahko, da je konstanta $B=0,099$ ustrezna in da se v kombinaciji z modificirano Arrheniusovo enačbo lahko uporablja za napovedovanje dolgoročne stabilnosti modelne farmacevtske oblike 2. Primer, ki smo ga predstavili ni idealen (zaradi vseh poenostavitev, ki smo jih vpeljali in uporabili), vseeno pa lepo pokaže eno od možnosti uporabe modificirane Arrheniusove enačbe. Z modificirano Arrheniusovo odvisnostjo, poznano konstanto B in poznavanjem njene odvisnosti od temperature, lahko napovemo dolgoročno stabilnost modelne farmacevtske oblike na poljubni relativni vlagi, to pa pomeni tudi, da lahko pri napovedovanju stabilnosti posredno upoštevamo lastnosti, kot je permeabilnost

vsebnikov za vlago in da lahko napovemo vplive višjih relativnih vlag katerim so izpostavljena zdravila med uporabo.

Vrednost dobljene konstante B je za približno 2,5-krat večja od vrednosti konstante uporabljene pri načrtovanju. Zaradi tega pa smo tudi dobili toliko neustreznih rezultatov po stresnih testih. Reakcija razpada je namreč veliko bolj občutljiva na vlago kot smo predvideli na začetku.

4.5. Modelna farmacevtska oblika 3

a) **Videz:** Kot začetna, so bili tudi vsi vzorci po vseh stresnih testih, tablete roza barve s gladko nepoškodovano površino.

b) **Vodna aktivnost (merjena pri 20°C-25°C):**

Preglednica XXXIII: Vodne aktivnosti merjene na vzorcih po stresnih testih.

T (°C)	t(dan)	1	2	3	4	7	14	21	V farmaceutski obliki po stresnih testih ni prišlo do bistvenih sprememb
50						32,1	32,4	32,6	
60	a_w (%)			33,9	34,2	35,1			
70		35,1	36,1						

a_w (ravnotežne RV) glede na začetno stanje (38,3%) s čimer lahko zaenkrat upravičimo uporabo Arrheniusove odvisnosti. Natančno oceno, za koliko bi se lahko spremenila konstanta razpada zaradi zaznane spremembe vodne aktivnosti za 2-6%, bo omogočala izračunana konstanta B modificirane Arrheniusove enačbe. Vzorcem, ki smo jih imeli med stresnimi testi v komorah s konstantno RV, nismo merili vodne aktivnosti, ker smo to lahko določili s poznavanjem ravnotežne relativne vlage posamezne komore (je enaka a_w). Te vzorce smo zaprli takoj po prenosu iz komore.

c) **1.del rezultatov (Arrheniusova enačba)**

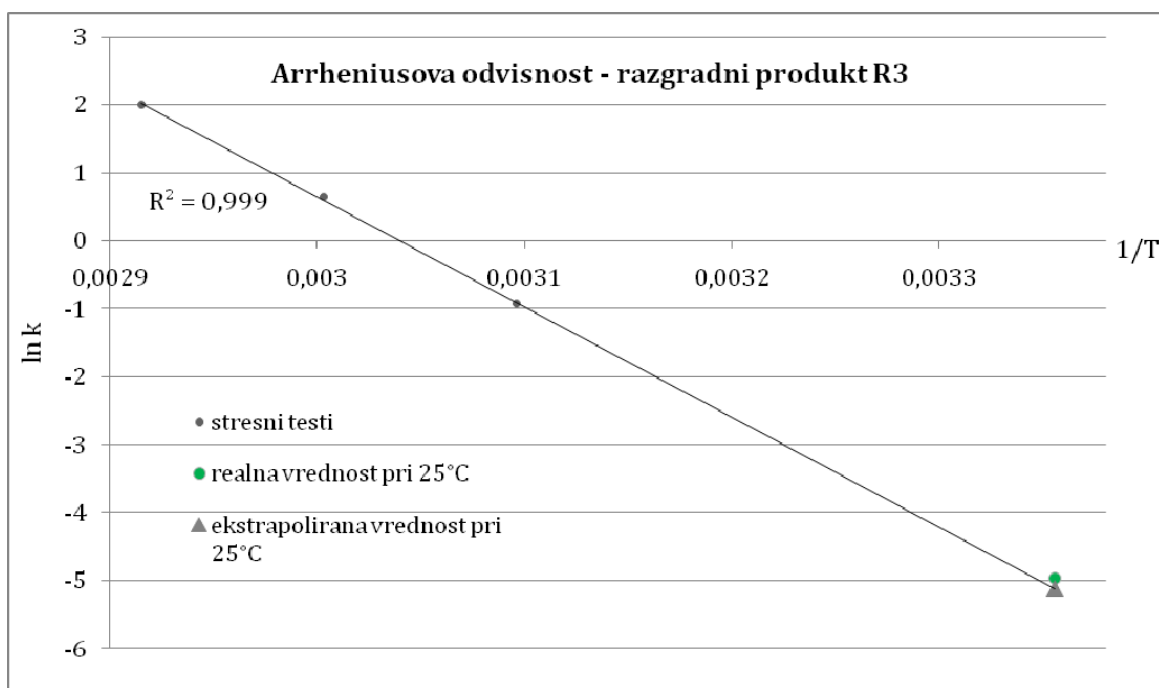
Preglednica XXXIV: V preglednici so predstavljeni podatki o deležu razgradnega produkta R3 v odvisnosti od časa in temperature stresnega testa.

MFO3-R3	t(mesec)	0	0,033	0,067	0,1	0,13	0,23	0,47	0,7		
	t(dan)	0	1	2	3	4	7	14	21		
T										k(%/mes)	r ²
50	Konc.	0,13					0,27	0,35	0,41	0,39	0,962
60	(%)	0,13			0,38	0,42	0,58			1,91	0,978
70		0,13	0,4	0,62						7,35	0,997

Če dobljene deleže razgradnega produkta R3 primerjamo z napovedanimi opazimo, da so dokaj podobni. Opozorimo na to, da smo tudi začetni vzorec (0,13%) analizirali hkrati z ostalimi vzorci iz stresnega testa. Bistveno pa je, da nam je uspelo razkroj obdržati nekje v mejah specifikacije. Visoki determinacijski koeficienti kažejo dobro linearno korelacijo (0,999) med časom in deležem razgradnega produkta pri vseh pogojih.

Preglednica XXXV: Parametri dobljene Arrheniusove odvisnosti.

r^2	E_a	$\ln A$
0,999	134,80	49,29



Graf 3: Na grafu je predstavljena s stresnimi testi dobljena Arrheniusova odvisnosti, iz te ekstrapolirana vrednost konstante razpada pri 25°C ter realna konstanta razpada pri 25°C.

Determinacijski koeficient 0,999 pokaže močno linearno korelacijo med spremenljivkami v logaritmirani Arrheniusovi odvisnosti. Zaradi tega je možno Arrheniusovo odvisnost uporabiti za ekstrapolacijo konstant razpada na pogoje študij dolgoročne stabilnosti. Vrednost ekstrapolirane konstante razpada pri 25°C je skupaj z pripadajočimi ekstrapoliranimi vrednostmi deleža razgradnega produkta R3 predstavljena v preglednici XXXVI, grafična primerjava logaritmirane vrednosti z realno pa je predstavljena tudi na grafu 3. Komentirajmo še dobljene vrednosti aktivacijskih energij ($E_{a,iz}$ posp. in dolg. študij=125,66 kJ/mol, $E_{a,iz}$ stresnih študij =134,80 kJ/mol). Obe vrednosti sta dokaj podobni in

pod 150 kJ/mol (v literaturi predstavljena zgornja meja), zaradi česar spet lahko upravičimo rabo Arrheniusove enačbe za napovedovanje dolgoročne stabilnosti.

Preglednica XXXVI: V preglednici imamo predstavljene deleže razgradnega produkta v odvisnosti od časa, in sicer realne rezultate pri 25°C in napovedane vrednosti izračunane iz ekstrapolirane konstante razpada pri 25°C.

MFO 3 -R3		t(mesec)	0	9	12		
		t(dan)	0	270	360		
T		Konc.				k (%/mes)	r ²
25°C	ekstrapolirane	(%)	0,05	0,10	0,12	0,0060	-
25°C	realne		0,05	0,11	0,13	0,0070	0,984

Predviden delež 0,12% nastalega razgradnega produkta po 12 mesecih, je zelo blizu realni vrednosti 0,13%. Iz tega vidika bi napoved in celotno izvedbo stresnega testa ocenili kot primerno za napovedovanje dolgoročne stabilnosti.

Za dokončno opredelitev pa smo izvedli sledečo statistično analizo, kjer smo preverili ali vrednost ekstrapolirane konstante razpada pade v 95% interval zaupanja za realno konstanto razpada.

Parametri računanja intervala zaupanja za realno konstanto razpada:

$$\alpha=0,05 \quad n=5 \quad k_{25^{\circ}\text{C realni}} = 0,0070 \quad \text{ST.DEV}_k = 0,00051$$

Izračunan 95 % interval zaupanja (CI_{95%}): $(0,0054 \leq k \leq 0,0086)$

$k_{25^{\circ}\text{C ekstrapolirani}} = 0,0060 \Rightarrow$ je znotraj CI_{95%} !

Tudi na ta način smo potrdili ustreznost predlaganega stresnega testa za napovedovanje dolgoročne stabilnosti modelne farmacevtske oblike 3.

d) 2.del rezultatov (modificirana Arrheniusova enačba)

Preglednica XXXVII: V preglednici so predstavljeni podatki o deležu razgradnega produkta R3 v odvisnosti od časa, temperature in RV stresnega testa.

MFO 3 - R3	t(mesec)	0	0,033	0,067	0,13	0,23	0,33	0,47			
		t(dan)	0	1	2	4	7	14	21		
T(°C)/RV(%)		Konc.							k(%/mes)	r ²	
50/21		(%)	0,13				0,28	0,37	0,43	0,42	0,959
50/51			0,13		0,22	0,25	0,29			0,64	0,898
50/74			0,13	0,21	0,23					1,5	0,893

Z izbranimi pogoji stresnih testov, smo uspeli doseči razkroje pod specifikacijsko mejo in nad mejo kvantifikacije. Determinacijski koeficienti so v tem primeru nižji, kot pri 1.delu rezultatov, vendar še vedno dokaj visoki in potrjujejo našo predpostavko o 0.redu. Če dobljene deleže razgradnega produkta primerjamo z napovedanimi (preglednica XVII) ugotovimo, da smo pri pogojih z višjo RV naredili večjo napako. Že iz tega lahko sklepamo, da je bila uporabljena splošna konstanta $B=0,04$ previsoka in da je hitrost reakcije nukleofilne adicije v tej modelni farmacevtski obliki manj odvisna od spremembe a_w (ravnotežne RV), kot je napovedovala povprečna vrednost B.

Preglednica XXXVIII: Parametri modificirane Arrheniusove odvisnosti za temperaturo 50°C.

RV(%)	21	51	74	B	r2	Determinacijski koeficient
lnk	-0,857	-0,434	0,405	0,023	0,932	kaže na linerano korelacijo

med RV in lnk. Dobljena konstanta B 0,023 pri 50°C, je res manjša od 0,04, kar kaže na manjšo občutljivost hitrosti reakcije na vlago.

Konstanta 0,023 pomeni, da bi se ob potencialni 10% spremembi relativne vlage pri 50°C v našem produktu, prirast deleža razgradnih produktov v enakem časovnem obdobju povečal za 1,26-krat. Če predpostavimo, da je B neodvisna od temperature, lahko pri sobni temperaturi napovemo vpliv spremenjene relativne vlage okolja (npr. med transportom ali med uporabo) na prirast razgradnega produkta R3 v modelni farmacevtski obliki 3 in s tem napovemo ali bo izdelek ohranil zahtevano kvaliteto tudi pri ekstremnejših pogojih shranjevanja. Za namene natančnega napovedovanja in ocenjevanja pa je nujno, da neodvisnost od temperature tudi potrdimo.

4.6. Modelna farmacevtska oblika 4

a) **Videz:** Začetni vzorec je rumena okrogla gladka tableta. Tablete niso nabrekle pri nobenem od pogojev, medtem ko so se pri 80°C in 60°C/75%RV obarvale zelenkasto. Pri drugih pogojih ni prišlo do sprememb.

b) Vodna aktivnost – merjena pri 20°C-25°C:

Preglednica XXXIX: Vodne aktivnosti merjene na vzorcih po stresnih testih.

T (°C)	t(dan)	0,5	2	3	4	7	10	14	V farmacevtski obliki po stresnih testih ni prišlo do bistvenih sprememb a_w glede na začetno
60						33,3	32,9	33,1	
70	a_w (%)			32,3	32,9	31,1			
80		33,6	33,9	36,5					

stanje (Zač: 39,0%). Iz tega vidika lahko zaenkrat upravičimo uporabo Arrheniusove odvisnosti. Natančno oceno, za koliko bi se lahko spremenila konstanta razpada zaradi zaznane spremembe vodne aktivnosti za 6%, bi omogočala izračunana konstanta B modificirane Arrheniusove enačbe. Vzorcem, ki smo jih imeli med stresnimi testi v komorah s konstantno RV, nismo merili vodne aktivnosti, ker smo to lahko določili s poznavanjem ravnotežne relativne vlage posamezne komore (je enaka a_w). Te vzorce smo zaprli takoj po prenosu iz komore.

c) 1.del rezultatov (Arrheniusova enačba)

Preglednica XL: V preglednici so predstavljeni podatki o deležu razgradnega produkta R4 v odvisnosti od časa in temperature stresnega testa.

MFO4	t(mes)	0	0,02	0,07	0,1	0,23	0,33	0,33	0,47	1,03		
- RP4	t(dan)	0	0,5	2	3	4	7	10	14	31		
T (°C)	Konc. (%)									k(%/mes)	r ²	
50*1		0,09								0,21	0,11	1
60		0,17					0,27	0,33	0,38		0,46	0,995
70		0,17				0,23	0,26	0,35			0,77	0,986
80		0,17	0,19	0,19	0,21						0,32	0,791

*1 Stresni testi pri 50°C so bili izvedeni na enaki seriji vzorca in delež razgradnega produkta R4 je bil določen z enako analizo metodo, le da so te teste izvedli ob pričetku dolgoročnih in pospešenih študij. Podatke sem vključil v rezultate stresnih testov zaradi neustreznosti rezultatov pri 80°C.

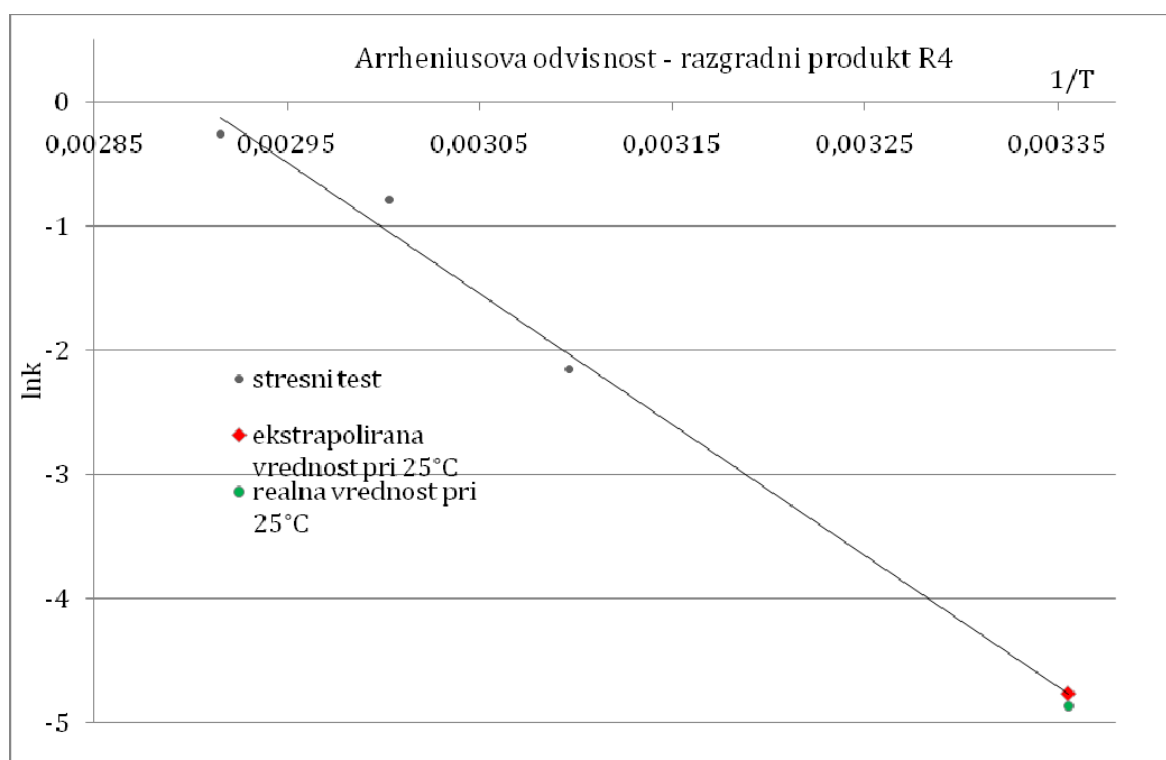
Načelo izokonverzije smo, glede na dobljene rezultate o deležu razgradnega produkta R4, uspeli upoštevati. Deleži so sicer pri 60°C in 70°C nekoliko višji od predvidenih, kljub temu pa je, glede na determinacijska koeficienta, aplikacija modela 0.reda primerna. Problem pa se je pojavil pri temperaturi 80°C. Že sama konstanta razpada je nižja od konstant pri 60 in 70°C, poleg tega pa je nizek tudi determinacijski koeficient, ki kaže na odstopanje od linearne odvisnosti med deležem razkroja in časom stresnega testa. S temi podatki je bilo nesmiselno konstruirati Arrheniusovo odvisnost. Vzroke za odstopanje kinetike razkroja vzorca pri 80°C, kljub upoštevanju načela izokonverzije, bi lahko iskali med fizikalnimi spremembami vzorca. Fizikalne spremembe nakaže tudi videz, vendar bi bile potrebne za podrobnejšo razlago nadaljne analize. Vzrok za odstopanje pa v tem primeru ni bila a_w v vzorcu, saj se pri 80°C ni spremenila glede na začetno stanje.

Vsekakor pa smo morali za konstruiranje Arrheniusove odvisnosti dobiti še eno dodatno točko, in zato smo med naše rezultate vključili podatke iz že izvedene stresne študije na 50°C. Obnašanja po 0.redu zaradi dveh časovnih točk nismo mogli preveriti, je pa delež razgradnega produkta (0,21%) pod specifikacijsko mejo in v okviru predvidenega dodatnega 0,1% razpada.

Preglednica XLI: Parametri dobljene Arrheniusove odvisnosti.

r^2	E_a	$\ln A$
0,946	87,76	30,64

Determinacijski koeficient 0,946 ne kaže na idealno obnašanje po Arrheniusovi odvisnosti, vendar je še vedno relativno visok in predvidevali smo, da konstruirana enačba omogoča računanje konstante pri temperaturi študij dolgoročne stabilnosti. Majhno razliko v logaritmirani vrednosti tako dobljene konstante in realne konstante razpada pri 25°C, ki delno že potrjuje naša predvidevanja, smo predstavili na grafu 4. Aktivacijski energiji določeni s stresnimi testi (87,76 kJ/mol) ter s študijami pospešene in dolgoročne stabilnosti (76,30 kJ/mol) ne izključujeta uporabe Arrheniusove odvisnosti (sta nižje od 150 kJ/mol).



Graf 4: Na grafu je predstavljena s stresnimi testi dobljena Arrheniusova odvisnosti, iz te ekstrapolirana vrednost konstante razpada pri 25°C ter realna konstanta razpada pri 25°C.

Preglednica XLII: V preglednici imamo predstavljene deleže razgradnega produkta v odvisnosti od časa, in sicer realne rezultate s staranja pri 25°C in napovedane vrednosti izračunane iz ekstrapolirane konstante razpada pri 25°C.

MFO 4 -R4		t(mesec)	0	9	12		
		t(dan)	0	270	360		
T						k (%/mes)	r ²
25°C	ekstrapolirane	Konc(%)	0,09	0,16	0,19	0,0085	-
25°C	realne		0,09	0,14	0,20	0,0077	0,853

S stresnimi testi napovedan delež razgradnega produkta po 12 mesecih (0,19%) in realna vrednost (0,20%) se ne razlikujeta veliko in zaradi tega lahko izvedbo stresnega testa in napoved dolgoročne stabilnosti ocenimo kot ustrezno. Za dokončno opredelitev pa smo izvedli sledečo statistično analizo, kjer smo preverili ali vrednost ekstrapolirane konstante razpada pade v 95% interval zaupanja za realno konstanto razpada.

Parametri računanja intervala zaupanja za realno konstanto razpada:

$$\alpha=0,05 \quad n=5 \quad k_{25^{\circ}\text{C realni}} = 0.0077 \quad \text{ST.DEV}_k = 0,0018$$

Izračunan 95 % interval zaupanja (CI_{95%}): $(0,0018 \leq k \leq 0,014)$

$$k_{25^{\circ}\text{C ekstrapolirani}} = 0,0085 \Rightarrow \text{znotraj CI}_{95\%} !$$

Napovedano konstanto razpada lahko ocenimo kot ustrezno in sklenemo, da smo s stresnim testom uspeli dovolj natančno napovedati dolgoročno stabilnost modelne farmacevtske oblike 4.

d) 2.del rezultatov (modificirana Arrheniusova enačba)

Preglednica XLIII: V preglednici so predstavljeni podatki o deležu razgradnega produkta R4 v odvisnosti od časa, temperature in RV stresnega testa.

MFO 4 - R4	t(mesec)	0	0,033	0,067	0,1	0,13	0,23	0,33	0,47			
		t(dan)	0	1	2	3	4	7	10	14		
T(°C)/%RV										k(%/mes)	r ²	
60/21	Konc.	0,17					0,25	0,27	0,31	0,30	0,993	
60/50	(%)	0,17	0,23	0,24	0,31					0,97	0,923	
60/75		0,17	0,25	0,42	0,5					3,48	0,976	

Deleži razgradnega produkta so sicer nekoliko višji kot napovedani, vendar še vedno ustrezni glede na načelo izokonverzije. Zaradi nekoliko višjih deležev razgradnega

produkta R4 lahko pričakujemo, da bo vrednost konstante B nekoliko višja od 0,04, saj je hitrosti naše oksidacijske reakcije v tej farmacevtski obliki bolj občutljiva na spremembo relativne vlage kot smo napovedali z uporabljenimi konstantami. Determinacijski koeficienti so relativno visoki in potrjujejo predpostavko o kinetiki 0. reda.

Preglednica XLIV: Parametri modificirane Arrheniusove odvisnosti za temperaturo 60°C.

RV(%)	21	50	75	B	r ²	Ustreznost aplikacije
Ink	-1,21	-0,032	1,25	0,045	0,996	modificirane Arrheniusove odvisnosti lahko potrdimo

z visokim determinacijskim koeficientom (0.996). Določena konstanta B (0,045) je res višja od 0,04, in praktično pomeni, da bi ob 10% potencialni spremembi relativne vlage v naši farmacevtski obliki po enakem času določili 1,57-krat večji prirast razgradnega produkta R4. Zavedati se moramo, da je konstanta B določena za temperaturo 60°C. Če bi jo želeli uporabljati za napovedovanje dolgoročne stabilnosti oziroma ocenjevati vpliv spremembe RV na stabilnost pri sobni temperaturi, bi morali, kot smo pri modelni farmacevtski obliki 2, potrditi njeno neodvisnost od T.

4.7. Dodatne študije

Vzporedno s študijami na omenjenih modelnih farmacevtskih oblikah smo informativno preiskovali metodologijo še na nekaterih drugih modelnih farmacevtskih oblikah. Nekatere od teh modelnih farmacevtskih oblik so izkazovale z vidika načela izokonverzije zanimive kinetike razpada.

Pri eni od teh smo na stresnih testih določili popolnoma različno kinetiko razpada, kot pri študijah na dolgoročnih pogojih. Predpostavljamo, da je do takšnega obnašanja prišlo zaradi visokega deleža (glede na specifikacijo) razgradnega produkta v začetnem vzorcu (ta je bil hkrati 24 mesečni vzorec vzet iz pogojev dolgoročnih študij stabilnosti). Tako se je na stresnih pogojih kmalu začel tudi razpad manj reaktivne oblike, kar je povzročilo omenjeno spremembo kinetike glede na dolgoročne pogoje, kjer je razpadala samo bolj reaktivna oblika učinkovine. Za podroben opis dogajanja bi morali načrtovati obsežnejšo stresno analizo, zato modelne farmacevtske oblike nismo vključili med rezultate. Za namene napovedovanja dolgoročne stabilnosti pa bi bilo potrebno uporabiti nestaran vzorec. Omenjen primer naj bo izziv za prihodnost, a hkrati opozorilo na to, da je vsaka posamezna farmacevtska oblika lahko zgodba zase.

5. SKLEP

NAČELO IZOKONVERZIJE

V večini primerov nam je načelo izokonverzije uspelo upoštevati - dosegli smo razkroje v mejah specifikacij. Kadar pa nam tega zaradi različnih razlogov ni uspelo, so se pokazala ali odstopanja od izbrane kinetike 0.reda (MFO2 – 50% in 75% relativna vlaga) ali pa je prišlo do odstopanja od Arrheniusove odvisnosti (MFO2 – 80°C). Upoštevanje načela pa je privedlo do rezultatov s katerimi smo lahko relativno uspešno napovedali dolgoročno stabilnost modelnih farmacevtskih oblik.

Sklenemo lahko, da je načelo izokonverzije in doseganje željenih deležev razkroja pod specifikacijsko mejo **osnova za ohranjanje primerljive kinetike razkroja in pridobivanje reprezentativnih vzorcev** pri stresnih testih s katerimi lahko dobro napovemo dolgoročno stabilnost.

0.RED

Izbran kinetični model 0.reda za trdne enodmerne farmacevtske oblike se **je v večini primerov izkazal za ustreznega**. Potrdili smo ga tako z rezultati študij dolgoročne in pospešene stabilnosti, kot tudi s stresnimi testi. Do odstopanj od izbrane kinetike je prišlo le pri modelni farmacevtski obliki 2 na vzorcih starih pri 50% in 75% relativni vlagi (vzrok je lahko fizikalna sprememba in/ali neupoštevanje načela izokonverzije) in pri modelni farmacevtski obliki 4 na vzorcu staranem pri 80°C (vzrok je lahko fizikalna sprememba). Poudarimo, da se je kinetika 0.reda ohranila pri modelnih farmacevtskih oblikah 3 in 4, tudi ko smo jih izpostavili povišanim relativnim vlagam (50% in 75%). To lahko povežemo z uspešnim upoštevanjem načela izokonverzije (deleži razgradnih produktov niso presegli specifikacijsko mejo) in odsotnostjo sprememb v videzu pri omenjenih modelnih farmacevtskih oblikah.

Ker smo v večini res ostajali v območjih zelo nizkih deležev razkroja, drugih kinetičnih modelov nismo preiskovali, saj se je tu 0.red pokazal za dovolj dober približek realni kinetiki v trdni farmacevtski obliki.

ARRHENIUSOVA ODVISNOST

V večini primerov so se razpadne reakcije obnašale po Arrheniusovi odvisnosti in zato je bila izbrana kot orodje za napovedovanje dolgoročne stabilnosti. Do odstopanj pa je prišlo v sledečih reprezentativnih primerih:

A) Vodna aktivnost

Vodna aktivnost se je pokazala za enega ključnih parametrov, ki jih moramo spremljati in uravnavati ob napovedovanju dolgoročne stabilnosti s pomočjo Arrheniusove odvisnosti. Pri modelni farmacevtski obliki 1 se je vzorcu pri 60°C glede na začetni vzorec in vzorca pri 40°C in 50°C vodna aktivnost povečala kar za približno 50%. To je povečalo hitrost razpada, hkrati pa je povzročilo tudi odstopanje od Arrheniusove odvisnosti. S tem potrjujemo, kako pomembno je tudi poznavanje sestave formulacije in fizikalno-kemijskih lastnosti pomožnih snovi pri načrtovanju stresnega testa.

Pri ostalih vzorcih, kjer je bila vodna aktivnost primerljiva začetni in ni bilo vpliva drugih dejavnikov, je bilo potrjeno obnašanje po Arrheniusovi odvisnosti.

S primeri smo pokazali, da je potrebno za primerljivost vzorcev in konstruiranje Arrheniusove odvisnosti vzdrževati čim bolj **nespremenljivo vodno aktivnost (ravnotežno RV)**.

B) $T=80^{\circ}\text{C}$

Temperatura, ki jo s kritičnega vidika obravnavajo tudi pri stresnih testih za določevanje intrinzične stabilnosti, nam je povzročala veliko težav. Pri modelni farmacevtski obliki 2 smo pri 80°C določili deleže razgradnega produkta, s katerimi smo sicer lahko potrdili kinetiko 0.reda, so pa bili ti višji od specifikacijske meje in so povzročili odstopanje od Arrheniusove odvisnosti. Pri modelni farmacevtski obliki 4 rezultati s pogoja 80°C niso presegali specifikacijske meje, vendar pa niso potrjevali kinetike 0.reda in jih zaradi tega prav tako nismo mogli uporabiti pri konstruiranju Arrheniusove odvisnosti. V obeh primerih ni prišlo do spremembe vodne aktivnosti, tako da moramo vzroke za odstopanje iskati drugje. Verjeten dodatni razlog, poleg neupoštevanja načela izokonverzije pri prvem, pa so fizikalne spremembe, ki so jih nakazale spremembe videza. Končno potrditev pa bi seveda morali narediti z dodatnimi analizam (Rentgenska praškovna kristalografija, DSC).

Kakorkoli že, omenjenih rezultatov nismo uporabili in glede na navedeno **odsvetujemo uporabo temperatur višjih od 70°C** pri načrtovanju in izvedbi stresnih testov za napovedovanje dolgoročne stabilnosti.

Vsi rezultati potrjujejo, da pri uporabi Arrheniusove odvisnosti za trdne sisteme **nismo zaznali omejitev glede vrste reakcij**. Obravnavanim reakcijam: hidrolizi, dehidraciji,

nukleofilni adiciji in oksidaciji, smo iz ustreznih Arrheniusovih odvisnosti določili tudi aktivacijske energije in vse so bile v mejah med 40 in 150 kJ/mol.

MODIFICIRANA ARRHENIUSOVA ODVISNOST in KONSTANTA B

A) Načrtovanje

Konstanta $B=0,04$, ki smo jo uporabili za načrtovanje stresnih testov, se je pri modelnih formulacijah 3 in 4 pokazala, kot dober približek za napovedovanje, saj sta bili dobljeni realni vrednosti $B_{MF3}=0,023$ in $B_{MF4}=0,045$. Res da, je bila 0,023 nekoliko nižja, vendar nas iz vidika upoštevanja načela izokonverzije (ne presejanje meje specifikacije) to ni motilo. Nasprotno lahko trdimo za rezultate, ki smo jih dobili pri modelni farmacevtski obliki 2, kjer je realna konstanta B znašala 0,099. Ti so bili neprimerno višji od napovedanih in specifikacijske meje, kar nam je pri interpretaciji rezultatov povzročalo veliko težav.

Če konstante B niti približno ne poznamo, je odločitev katero konstanto B uporabiti za načrtovanje vprašanje, na katerega nam naši rezultati niso dali točnega odgovora. Glede na ugotovitve Watermana s sodelavci se za konstanto B lahko uporabi vrednost 0,04, pokazali pa smo, da lahko ob načrtovanju z le-to napravimo tudi napako. V tem primeru je pač potrebno ponovno izvesti stresne teste. Vendar pa smo pri dveh od treh modelnih formulacijah bolj ali manj uspeli z napovedjo, zato bi v začetnih fazah razvoja vseeno priporočali izbiro predlagane vrednosti konstante B (0,04).

B) Modificirana Arrheniusova odvisnost

Pri vseh modelnih farmacevtskih oblikah smo na različne načine uspeli pokazati, da se razpadne reakcije ravnaajo po modificirani Arrheniusovi enačbi.

C) Neodvisnost konstante B od temperature

Občutljivost hitrosti reakcije razpada na spremembo relativne vlage smo določili pri modelni farmacevtski obliki 2, 3 in 4. Vrednosti teh konstant B smo navedli že zgoraj. Ne moremo pa vse tri vrednosti z enako gotovostjo uporabljati za napovedovanje dolgoročne stabilnosti. **Neodvisnost konstante B od temperature**, ki je pogoj za napovedovanje dolgoročne stabilnosti z uporabo modificirane Arrheniusove enačbe, **smo dokazali** pri modelni farmacevtski obliki 2 in pri tej napoved tudi izvedli. Pri ostalih dveh pa smo samo pokazali obnašanje po modificirani Arrheniusovi odvisnosti, točne napovedi stabilnosti pa nismo določili. Za nadaljnje napovedovanje odvisnosti hitrosti razpada od spremembe

relativne vlage pri sobni temperaturi (25°C) teh modelnih farmacevtskih oblik 3 in 4 bi morali izvesti dodatne stresne teste.

NAPOVEDI DOLGOROČNE STABILNOSTI

A) Z Arrheniusovo odvisnostjo

Pri vseh štirih modelnih farmacevtskih oblikah nam je uspelo napovedati konstante tvorbe razgradnega produkta, ki se niso signifikantno razlikovale od realnih konstant dobljenih pri študijah dolgoročne stabilnosti. Zato lahko sklenemo, da smo s stresnimi testi in uporabljeno Arrhenusovo odvisnostjo **uspešno napovedali dolgoročno stabilnost** trdnih modelnih farmacevtskih oblik.

B) Z modificirano Arrheniusovo odvisnostjo

Pri modelni farmacevtski obliki 2 smo se lotili tudi napovedovanja dolgoročne stabilnosti z modificirano Arrheniusovo odvisnostjo. Z uporabo od temperature neodvisne konstante $B=0,099$ smo določili konstanto tvorbe razgradnega produkta, ki se ni signifikantno razlikovala od realne konstante dobljene pri študijah dolgoročne stabilnosti. Tako smo tudi na ta način **uspešno napovedali dolgoročno stabilnost** modelne farmacevtske oblike 2. Ta vidik uporabe modificirane Arrheniusove enačbe je še posebej zanimiv, saj lahko z njim napovemo dolgoročno stabilnost modelne farmacevtske oblike na poljubni relativni vlagi. Pri napovedovanju stabilnosti pa lahko tako posredno upoštevamo tudi lastnosti, kot je permeabilnost vsebnikov za vlago, hkrati pa lahko napovemo vplive višjih relativnih vlag, katerim so izpostavljena zdravila med uporabo, in podobno.

V diplomskem delu smo pokazali, da je uporaba stresnih testov in (modificirane) Arrheniusove odvisnosti za napovedi dolgoročne stabilnosti trdnih farmacevtskih sistemov možna. Pokazali smo, da je natančno in ustrezno načrtovanje stresnih testov ključnega pomena. Brez že znanih podatkov o dolgoročni in pospešeni stabilnosti je načrtovanje z namenom upoštevanja načela izokonverzije dosti težje in je potrebno najprej izvesti več poskusnih stresnih testov za doseganje željenih oziroma ustreznih deležev razgradnih produktov.

V prihodnosti je potrebno zato preskusiti predlagano metodologijo še na podobnih in tudi drugačnih trdnih farmacevtskih sistemih, predvsem pa se je potrebno še bolj izogniti težavam, ki smo jih imeli in zmanjšati število predpostavk. V nadaljnje bi bilo dobro v

metodologijo vključiti še analize s katerimi bi ne samo opazovali (videz) ampak tudi odkrivali in potrjevali prisotnost oziroma odsotnost fizikalnih sprememb.

Diplomsko delo je predstavilo splošna navodila, ki se jih je, glede na rezultate in zbrano literaturo, dobro držati ob načrtovanju stresnih testov za napovedovanje dolgoročne stabilnosti trdnih farmacevtskih sistemov. Na koncu pa poudarjamo, da je zaenkrat, ko metodologija stresnih testov še ni potrjena in bolj preskušena ter zaradi regulatornih zahtev, potrjevanje napovedi dolgoročne stabilnosti z realnimi rezultati ključnega pomena.

6. VIRI IN LITERATURA:

1. *Carstensen JT: Drug Stability: Principles and Practices Third edition, Marcel Dekker Inc., New York, 2000*
2. *WHO Guideline: WHO Technical Report Series 863, Annex 5,: Guidelines for stability testing of pharmaceutical products containing well established drug substances in conventional dosage forms, 1996*
3. *Steven W.Baertschi: Pharmaceutical Stress testing;, Taylor & Francis group, 2005: str.1-173, 446-452, 467*
4. *ICH history: <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>*
5. *ICH guideline: Q1A(R2): Stability testing of New Drug Substances and products, november 2003*
6. *Klick S, Muijselaar PG, Waterval J: Toward a Generic Approach for Stress Testing of Drug Substances and Drug Products. Pharm Tech, Feb 2005*
7. *Alsante KM, Martin L, Baertschi SW:A Stress Testing Benchmarking Study, Pharm Tech, Feb 2005,*
8. *ICH guideline: Q3A(R2) Impurities in New Drug Substances, Oktober 2006*
9. *ICH guideline: Q3B(R2) Impurities in New Drug Products, Junij 2006*
10. *ICH Guideline Q1B: Photostability Testin of New Drug Substances and products, februar 2003*
11. *FDA Guidance for Industry: Stability Testing of New Drug Substance and Products-Revision 1, 2001 Aug*
12. *Waterman KC, Adami RC: Acelerated aging: Prediction of Chemical stability of pharmaceuticals, International journal of pharmaceutics 293, 2005, 101-125, str 103,*
13. *Waterman KC, Carella AJ: Improved protocol and Data Analysis for Accelerated Shelf life Estimation of Solid dosage forms, Pharmaceutical REsearch, Vol.24, No4, April 2007*
14. *Mansoor M.Amiji, Beverly J.Sandman: Applied Physical pharmacy; McGRAW-Hill Companies; Medical public division; 2003, Reaction kinetcs; 231-283*

15. *Sumie Yoshioka and Valentino J.Stella: Stability of drugs and dosage forms , Kluwer Academics Publishers,New York, 2002: str. 38-60*
16. *Zbornik predavanj, 19. simpozij Sekcije farmacevtskih tehnologov: Voda v farmacevtskih oblikah, Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo, 14. junij 2007*
17. *Vaje iz stabilnosti zdravil, Robert Roškar, Vojko Kmetec, Fakulteta za farmacijo, Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko, ljubljana 2002; str.19*
18. http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=en_SI&cid=534293
19. http://www.testo.us/online/img/products/normal/regular/0563_6501_01.jpg
20. *Greenspan, Lewis: Humidity Fixed Points of Binary Saturated Aqueous Solutions, Journal of Research of the National Bureau of Standards-A. Physics and Chemistry, Vol. 81A, No. 1, January-February 1977*
21. <http://www.r-project.org>
22. *Göran Alderborn, Christer Nyström, Pharmaceutical powder compaction technology, Informa Health Care ,(1995), str.453*