

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SAMO URDIH

**VPLIV MIKROKRISTALNIH CELULOZ NA STRESNO
STABILNOST ZAVIRALCEV ANGIOTENZIN-
KONVERTAZE**

**INFLUENCE OF MICROCRYSTALLINE CELLULOSES ON
STRESS STABILITY OF ANGIOTENSIN-CONVERTING
ENZYME INHIBITORS**

Ljubljana, 2010

Pričujoča diplomska naloga je nastala v sodelovanju s podjetjem Krka, tovarna zdravil d. d., natančneje z Oddelkom za stabilnost, Bogišičeva 8, 1000 Ljubljana, pod mentorstvom izr. prof. dr. Aleša Obreze, mag. farm. in somentorstvom dr. Viljema Pavlija, mag. farm.

Zahvaljujem se vsem, ki so kakor koli pomagali pri nastajanju diplomske naloge, še posebej delovni mentorici Tanji Vehovec, mag. farm., celotnemu kolektivu Oddelka za stabilnost in prijateljem ter družini, ki me je vedno podpirala.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelal samostojno, pod mentorstvom izr. prof. dr. Aleša Obreze, mag. farm. in somentorstvom dr. Viljema Pavlija, mag. farm.

Samo Urdih

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	Stabilnost zdravil	1
1.2	ICH princip testiranja stabilnosti	1
1.2.1	Testirani parametri	3
1.2.2	Stabilnostno indikativne metode	3
1.3	Mikrokristalna celuloza (MCC)	3
1.3.1	S funkcionalnostjo povezane lastnosti pomožnih snovi	4
1.3.2	Izdelava MCC	5
1.3.3	Dosedanja spoznanja o vplivu pomožnih snovi na stabilnost ZU	5
1.4	Modelne učinkovine zaviralcev angiotenzin-konvertaze v kombinaciji z MCC	6
1.4.1	Kemizem in kemijske poti sprememb uporabljenih učinkovin	7
1.4.2	Reakcije v trdnem	9
1.4.3	Stabilnost PE in EM	9
2	NAMEN DIPLOMSKEGA DELA	11
3	EKSPERIMENTALNI DEL	12
3.1	Materiali, reagenti in metode	12
3.2	Binarne zmesi	13
3.2.1	Mešanje binarnih zmesi	13
3.2.2	Priprava vzorcev za stresno testiranje stabilnosti v kontroliranih pogojih ..	14
3.3	HPLC analize	15
3.3.1	Eksperimentalni pogoji	15
3.3.2	Topila in raztopine za HPLC meritve	16
3.4	Določevanje vlage in pH	18
3.4.1	Določanje vlage	18
3.4.2	Določevanje pH	18
3.5	Statistična metoda	19
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	22
4.1	Binarne zmesi	22
4.2	HPLC analize	22
4.3	Karakteristike MCC	24
4.3.1	Določevanje vlage	25
4.3.2	Določevanje pH	25
4.4	Rezultati stabilnosti učinkovin v binarnih zmesih z MCC	25
4.4.1	Rezultati stabilnosti za zmesi MCC s PE	27
4.4.2	Razprava o vplivu vlage, pH in velikosti delcev MCC na stabilnost PE	32
4.4.3	Stabilnostni rezultati za zmesi z EM	36
4.4.4	Razprava o vplivu vlage, pH in velikosti delcev MCC na stabilnost EM ...	40
5	SKLEPI	44
6	LITERATURA	46

Povzetek

Diploma obsega študijo stresne in pospešene stabilnosti binarnih mešanic med različnimi vrstami in serijami mikrokristalne celuloze (MCC) in dveh izbranih učinkovin: perindopriljevega erbuminata (PE), ki je sol perindopriila s *terc*-butilaminom, in enalapriljevega maleata (EM). Cilj diplome je bil ugotoviti, ali obstajajo razlike med vplivi posameznih vrst in serij MCC na stabilnost učinkovin, in najti vzroke za morebitne razlike v stabilnosti učinkovin.

Mešanice učinkovin in MCC smo pripravili v razmerju 1 : 5, kar predstavlja približek razmerja med pomožnimi snovmi in učinkovino v realnem sistemu, torej v končni formulaciji. Nato smo jih postavili na odprte in zaprte nadzorovane pogoje $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/65\% \pm 5\%$ relativne vlažnosti (RV) in $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \pm 5\%$ RV ter vzorce za analize odvezemali ob načrtovanih terminih. Hitrost kemijskih sprememb na učinkovinah smo spremljali z validiranimi metodama tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) in rezultate statistično obdelali. Poleg HPLC analiz binarnih mešanic smo s sušenjem določili tudi delež prisotne vode v MCC in določili njihove pH po Evropski farmakopeji (PhEur).

Ugotovili smo, da so vplivi fizikalno-kemičnih lastnosti MCC na stabilnost učinkovin med posameznimi vrstami MCC signifikantno različni na nivoju tveganja $p \leq 0,25$. Ugotovili smo nekatere bistvene razlike med različnimi vrstami MCC, ne pa znotraj iste vrste MCC (Avicel PH 101) različnih serij. Za vzroke različnih stabilnosti učinkovin smo identificirali tri lastnosti MCC: vsebnost vode v MCC, velikost delcev in pH. Velikost delcev MCC je v PhEur vključena med s funkcionalnostjo povezane lastnosti (FRC), ostali dve lastnosti pa med obvezne teste.

Vpliv zaprtih pogojev pri $30^{\circ}\text{C}/65\% \text{ RV}$ in $40^{\circ}\text{C}/75\% \text{ RV}$ smo preučevali le za zmesi s PE, ne pa za zmesi z EM, ker vdale niso zrakotesno tesnile. Večji delež vlage in manjša velikost delcev MCC je pospeševala hitrost razpada PE na zaprtih pogojih.

V mešanicah iz odprtega pogoja je vpliv okoliške vlage prav tako pospeševal razpad PE in EM. To je bilo še posebno evidentno za PE pri ostrejšem pogoju ($40^{\circ}\text{C}/75\% \text{ RV}$), vidne pa so bile tudi razlike med posameznimi mešanicami.

Pri obeh testiranih učinkovinah smo v splošnem zaznali večji razpad v smeri ciklizacije, torej nastanka ustreznega diketopiperazina (pDKP, eDKP), kot v smeri hidrolize – perindoprilat (PAT) in enalaprilat (ET). Ciklizacijo pospešuje ob prisotnosti vode predvsem višja temperatura (T), hidrolizo pa višja vlaga in T.

Višji pH MCC povzroči hitrejšo hidrolizo EM v zmesih, hranjenih na odprtih pogojih, pri PE pa nismo zaznali vpliva pH-ja. Velikost delcev MCC nima enotnega vpliva na razpad PE in EM. V zmesih s PE in MCC so manjši delci povzročili večji razpad, pri zmesih z EM pa vpliva velikosti delcev nismo zaznali. PE je na zaprtih pogojih najstabilnejši v zmesi z Avicelom PH 200, najmanj stabilen pa z Avicelom PH 105. Na odprtih pogojih je najstabilnejši z Avicelom PH 101, najmanj pa z Avicelom PH 105, enako kot pri zaprtih pogojih.

Zaradi neustreznega tesnjenja vial z zmesmi EM in MCC lahko podamo le oceno, da nismo zaznali bistvenih razlik med vplivi posameznih MCC na stabilnost EM pri zaprtih pogojih. Na odprtih pogojih pa je EM najstabilnejši v zmesi z Avicelom PH 112, najmanj stabilen pa v zmesi z Avicelom PH 200 in PH 102.

Abstract

In this study stress stability of binary mixtures between different types of microcrystalline cellulose (MCC) and two drugs: namely, perindopril erbumine (PE) and enalapril maleate (EM) were studied. The aim was to determine if any differences in the stability of the drug, caused by the excipient, could be observed and to find some factors that might be responsible for this differences.

Mixtures were manually prepared in a 1 : 5 (m/m), drug : MCC, ratio. The tested condition were $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/65\% \pm 5\%$ relative humidity (RH) and $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \pm 5\%$ RH, open and closed system. The kinetics of drug degradation was determined by a validated high performance liquid chromatography (HPLC) method and the results were statistically evaluated. Also MCC water content and a pH of MCC in water suspension were determined.

We concluded that the differences between types of MCC are statistically relevant ($p = 0,25$). However, different batches of the same type (Avicel PH 101) of MCC showed no differences. Three MCC characteristics were studied as the factors affecting drug stability; MCC particle size, MCC water content and pH of MCC. MCC particle size was studied as a functionality-related characteristics (FRC), the last two as regular tests.

Effects of closed system (mixture air-tight packed in a vial) at $30^{\circ}\text{C}/65\%$ RH and $40^{\circ}\text{C}/75\%$ RH were studied only for binary mixtures with PE. The EM results were unreliable due to the lack of air-tight conditions in the containers. A high water content and small MCC particle size accelerated the degradation of PE in closed system.

Binary mixtures freely exposed to outside humidity (open system) showed high degree of PE and EM degradation. The humidity effect was strongest for PE at 40°C/75 % RH, however differences between MCC types were observed.

Both tested drugs showed a higher degree of cyclization than hydrolysis. Cyclization in presence of water was accelerated by a higher temperature (T), hydrolysis was affected by a higher humidity and higher T.

An alkaline MCC pH triggers higher EM hydrolysis in mixtures in open conditions, however the pH effect was not observed for PE. Particle size did not have a uniform effect on PE or EM degradation kinetics; in binary mixtures with PE smaller particles in MCC accelerated the degradation, whereas this effect was not present in mixtures with EM. The stability of PE in closed vials was the worst in combination with Avicel PH 105 and the best with Avicel PH 200. In open system conditions the best stability was observed with Avicel PH 101 and the greatest instability showed mixtures with Avicel PH 105, same as in closed vials.

Due to inadequate closing of vials containing mixtures between EM and MCC, we could only give an estimate, that major differences in stability were not observed between types of MCC in closed system conditions. Results showed that in open conditions EM is most stable in combination with Avicel PH 112 and the least stable in mixtures with Avicel PH 200 and Avicel PH 102.

Seznam okrajšav

α – nivo tveganja

DL – stopnje prostosti

eDKP – diketopiperazin, produkt ciklizacije enalapрила

EM – enalaprilijev maleat

ET – enalaprilat, produkt hidrolize enalapрила

FDA – agencija za prehrano in zdravila Združenih držav Amerike (Food and drug administration)

FO – farmacevtska oblika

FRC – s funkcionalnostjo povezane lastnosti (functionality-related characteristics)

HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (high-performance liquid chromatography)

ICH – Mednarodno tristransko telo za harmonizacijo zahtev pri registraciji zdravil (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)

LDPE – polietilen nizke gostote (low-density polyethylene)

MCC – mikrokristalna celuloza

MS – varianca (mean square)

ODS – oktadecilsilan

p – statistična značilnost

p.a. – za analize (pro analisi)

PAT – perindoprilat; produkt hidrolize perindopрила

pDKP – diketopiperazin; produkt ciklizacije perindopрила

PE – perindoprilijev erbuminat

PhEur – Evropska farmakopeja

R^2 – determinacijski koeficient

RV – relativna vlažnost

SS – vsota kvadratov razlik (sum of squares)

UV – ultravijoličen

UZ – ultrazvok

T - temperatura

ZA – začetna analiza ob času 0 dni

ZU – zdravilna učinkovina

1 UVOD

V preteklosti so vladne institucije postopoma zaostrovale zakonodajo s področja zdravil in skupaj s predstavniki farmacevtske industrije predlagale poenotene postopke testiranja stabilnosti z namenom znižanja stroškov razvoja novih zdravil, trženja na čim širšem območju in zaščite končnih uporabnikov. Ta proces se je pričel intenzivno odvijati po letu 1990 na mednarodnih konferencah (ICH) in leta 1993 smo dobili tudi prvo ICH smernico za testiranje stabilnosti zdravilnih učinkovin (ZU) in končnih farmacevtskih oblik (FO) (1, 2, 3).

1.1 Stabilnost zdravil

Namen testiranja stabilnosti je, da se ugotovi, kako se kakovost zdravilne učinkovine oz. končnega zdravila spreminja s časom pod vplivom zunanjih faktorjev, kot so T, vlaga in svetloba (1).

V prvih fazah razvoja se proučuje stabilnost ZU in ugotavlja njeno intrinzično stabilnost, to je mehanizem in kinetiko kemičnega razpada (1, 2).

Večina teh raziskav poteka s pomočjo stresnih testov, to je pod ekstremnimi pogoji (povišana T, vpliv oksidantov, pH, svetlobe itd.) (1, 2). V nadaljevanju predformulacijske faze se proučuje vpliv posameznih pomožnih snovi na stabilnost ZU. V FO so namreč ZU prisotne skupaj s pomožnimi snovmi, ki lahko spremenijo (običajno pospešijo) kinetiko kemičnih sprememb, v nekaterih primerih pa pomožne snovi lahko hitrost kemičnih sprememb učinkovine zavirajo (4). S pomočjo stresnih in pospešenih testov izberemo optimalno stabilno formulacijo, ki mora zagotavljati varnost, učinkovitost in kakovost zdravila preko celotnega roka uporabnosti, ki ga določimo s testiranjem po ICH smernicah (1). Osnovni cilj testiranja stabilnosti je določitev dobe re-testiranja učinkovin, določitev roka uporabnosti zdravila in predlaganje pogojev hranjenja (5).

1.2 ICH princip testiranja stabilnosti

S stabilnostnimi študijami vrednotimo tiste lastnosti ZU, ki se lahko spremenijo med hranjenjem in lahko vplivajo na kakovost, varnost in učinkovitost. Testiranje torej obsega preverjanje fizikalnih, kemičnih, bioloških in mikrobioloških lastnosti. Pri analizah vedno uporabimo validirane in stabilnostno indikativne analizne metode (1, 2, 3). Za vrednotenje stabilnosti uporabljamo naslednje pristope:

Stresno testiranje

Stresno testiranje uporabljamo za določevanje mehanizma in kinetike kemijskih sprememb ZU (intrinzična stabilnost), za razvoj analizne metode in orientacijsko določevanje stabilnosti učinkovine oziroma formulacije. Način stresnega testiranja ni regulatorno predpisan in navadno vključuje testiranje pri višjih T (npr. 50°C, 60°C, 70°C), višji vlagi (75 % RV, 80 % RV, 90 % RV), spremembah pH v raztopinah, prisotnosti kisika itd. (1, 5).

Dolgoročno in pospešeno testiranje po ICH

Za registracijo zdravila je treba regulatornim oblastem predložiti rezultate stabilnostnega testiranja v primarni embalaži po predpisanih pogojih, ki so prikazani v *tabeli 1*. Testiranje na dolgoročnem pogoju se nato nadaljuje do maksimalno 5 let (3).

Tabela 1: Pogoji testiranja stabilnosti in minimalne zahteve za registriranje zdravila (3, 6).

Vrsta testiranja	Pogoji hranjenja	Minimalno obdobje hranjenja ob oddaji podatkov
Dolgoročno testiranje	25°C ± 2°C/60 % RV ± 5 % RV	6 (12*) mesecev
Vmesno testiranje	30°C ± 2°C/65 % RV ± 5 % RV	6 (12) mesecev
Pospešeno testiranje	40°C ± 2°C/75 % RV ± 5 % RV	6 mesecev

**Velja za originatorska zdravila*

Dolgoročno testiranje je stabilnostno testiranje na priporočenih dolgoročnih pogojih hranjenja (npr. 25°C/60 % RV, za klimatsko cono II) za namene določanja dobe retestiranja učinkovine ali določitve roka uporabnosti zdravila. Rok uporabnosti ali dobe retestiranja se skladno z rezultati študij podaljšuje. Rok uporabnosti zdravila je največ 5 let. Analize se izvajajo v prvem letu vsake tri mesece, v drugem letu vsakih 6 mesecev, od drugega leta dalje pa enkrat letno (3).

Pospešeno testiranje združuje študije, s katerimi pospešimo hitrost kemijskih ali fizikalnih sprememb ZU ali končnega farmacevtskega izdelka s pomočjo pospešenih pogojev hranjenja (tabela 1). Če ZU ali končno zdravilo ne vzdrži pospešenega pogoja (40°C/75 % RV/6 mesecev), preidemo na testiranje na t. i. vmesnem pogoju (30°C/65 % RV/12 mesecev). Podatke iz teh študij skupaj z dolgoročnimi stabilnostnimi študijami

uporabimo za določitev dobe re-testiranj učinkovine oz. roka uporabnosti zdravila. Poleg tega dobimo tudi informacije o vplivu neugodnih vremenskih pogojev (npr. višja ali nižja T), ki se lahko pojavijo med transportom zdravila v poletnih ali zimskih mesecih (3).

1.2.1 Testirani parametri

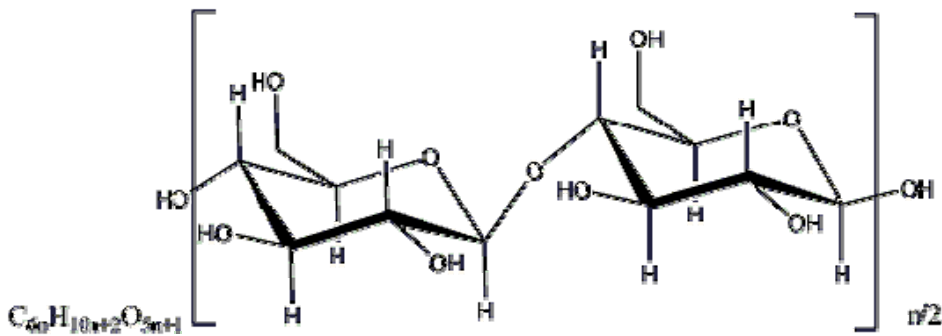
Med testiranjem stabilnosti spremljamo tudi naslednje parametre: izgled, fizikalne lastnosti (npr. raztapljanje, trdnost, razpadnost, drobljivost tbl.), vsebnost ZU, sorodne substance (nečistote in razpadni produkti), mikrobiološko kakovost itd. (1, 6).

1.2.2 Stabilnostno indikativne metode

Po definiciji regulatornih organov je stabilnostno indikativna metoda ena izmed kvantitativnih analiznih metod, ki razlikuje karakteristične strukture, kemične ali biološke lastnosti posameznih ZU v FO in je sposobna ločiti vsako spojino od sorodnih snovi. Metoda mora biti dovolj občutljiva, da zazna in kvantificira enega ali več razpadnih produktov. Kot stabilnostno indikativno analizo metodo najpogosteje uporabljamo HPLC kromatografijo. Uporabljamo pa lahko še plinsko kromatografijo, tankoplastno kromatografijo, kiralno kromatografijo in kapilarno elektroforezo (2).

1.3 Mikrokristalna celuloza (MCC)

V farmaciji uporabljamo MCC primarno kot vezivo in polnilo pri pripravi tablet in kapsul, ima tudi razgrajevalne in drsilne lastnosti. Uporablja se v procesih vlažne granulacije in direktnega stiskanja (7). MCC je prečiščena, delno depolimerizirana celuloza z empirično formulo $C_{6n}H_{10n+2}O_{5n+1}$ (slika 1), ki jo pripravijo iz alfa celuloze. MCC je bel ali skoraj bel fin ali granuliran prašek, ki je netopen v vodi, acetonu, brezvodnem etanolu, toluenu, razredčenih kislinah in v 1,2 M raztopini natrijevega hidroksida. Stopnja polimerizacije ni večja od 350. Po Evropski farmakopeji (PhEur) je dovoljena meja pH vodnih suspenzij MCC med 5,0 in 7,5 (8).



Slika 1: Strukturna in empirična formula celuloze (8)

MCC kot delno hidrolizirana celuloza vsebuje kristale koloidnih velikosti, ki se enostavno dispergirajo v vodi. Delci so delno kristalinični in delno amorfni. Stopnja kristaliničnosti in velikost delcev se spreminja glede na vir celuloze in način priprave. Stopnja kristaliničnosti vpliva na fizikalne lastnosti delcev (higroskopnost in stisljivost) in uporabnost v tehnoloških procesih (9). Različne vrste MCC ločijo glede na nasipno gostoto, velikost delcev in vsebnost vlage, kar vpliva tudi na spremembe lastnosti, ki so pomembne v tehnoloških procesih (npr. mešanje, pretočne lastnosti, časi sušenja, stisljivost in trdnost tablet), nekatere vrste pa so zaradi nizke vsebnosti vlage primernejše za ZU, ki so občutljivejše na vlago (10).

1.3.1 S funkcionalnostjo povezane lastnosti pomožnih snovi

S funkcionalnostjo povezane lastnosti (FRC) pomožnih snovi so tiste fizikalne ali kemične lastnosti pomožnih snovi, ki lahko bistveno vplivajo na proces izdelave končnega izdelka ali na končne lastnosti le-tega (11).

V PhEur je splošna monografija o tem aspektu pomožnih snovi neobvezujoča in objavljena le kot informacija in navodilo. Funkcionalnost vsake pomožne snovi lahko ovrednotimo le v povezavi z določeno formulacijo in postopkom izdelave, pogosto s številnimi analiznimi metodami. FRC pomožnih snovi lahko torej – če imamo jasno določen cilj – identificiramo in kontroliramo, kar pomeni, da so lahko predmet specifikacij kakovosti izdelka. Funkcionalnost pomožnih snovi je v nekaterih primerih odvisna od kompleksnih interakcij med sestavinami formulacije in obremenitvami, povezanimi s postopkom izdelave (11).

Po PhEur 6.3 ima MCC nekatere s funkcionalnostjo povezane lastnosti, ki

predstavljajo pomembne kontrolne parametre za eno ali več funkcij, če jo uporabimo kot pomožno snov. Ta neobvezna testiranja so velikost delcev (PhEur 2.9.31 ali 2.9.38) in pretočne lastnosti (PhEur 2.9.36) (8).

Pri MCC je bila kot FRC omenjena stopnja polimerizacije, vendar vrednosti stopnje polimerizacije same zase ne korelirajo s funkcionalnostjo. To so ugotovili za stisljivost. Dybowski poudarja, da sta za FRC MCC bolj pomembna izvor primarnih surovin pri izdelavi in način izdelave kot pa stopnja polimerizacije (12).

1.3.2 Izdelava MCC

MCC pripravijo z delno hidrolizo α -celuloze z razredčenimi mineralnimi kislinami (8). Kislina prednostno razgradi molekule celuloze v manj urejenih oziroma amorfnih delih celuloze – zaradi tega ostanejo v delcu večinoma kristalinični predeli, ki tvorijo kristalne celulozne agregate. Reakcijsko mešanico po hidrolizi spirajo z vodo, da odstranijo topne stranske produkte. Tako nastalo vlažno maso sušijo s sušenjem z razprševanjem, da dobijo različne velikosti agregatov MCC (13). V nekaterih postopkih pa dodajajo v reakcijsko zmes tudi amoniak (14).

1.3.3 Vpliv pomožnih snovi na stabilnost ZU

Mehanizmi, s katerimi pomožne snovi vplivajo na stabilnost ZU, so različni. Pomožna snov lahko neposredno reagira z ZU, lahko ima vlogo katalizatorja in pospeši hitrost reakcije. Zelo pomemben je vpliv vlage, ki je lahko prisotna v pomožni snovi. Prav tako lahko z dodatkom pomožne snovi spremenimo pH v FO, ki lahko bistveno vpliva na stabilnost formulacije (2, 5).

Spoznanja o vplivu MCC na stabilnost

V farmacevtskih formulacijah se lahko dogajajo kompleksne interakcije med ZU in pomožno snovjo, ki jih ni vedno lahko pojasniti. J. T. Carstensen je s sodelavci raziskoval stabilnost tiaminijevega klorida v tabletah, ki vsebujejo magnezijev stearat in MCC. Ugotovil je, da je največja hitrost razpada tiaminijevega klorida pri 5-% vsebnosti vode v MCC. Predlagan mehanizem nestabilnosti je bil katalitični vpliv magnezijevega stearata v raztopljeni ZU. Tako hitrost narašča s povečevanjem vsebnosti vode do 5 %, nato pa se hitrost razpada zmanjša zaradi razredčenja reaktivnih komponent (4). Drugi raziskovalci so našli inverzno povezavo med hitrostjo razpada nitrazepama s površinsko energijo pomožne snovi, določeno z energijo vezave dušika na pomožno snov. To odkritje predlaga, da

pomožne snovi, ki močneje vežejo dušik na površino, po vsej verjetnosti močneje vežejo tudi vodo na površino. S tem zmanjšajo reaktivnost vode in na ta način zmanjšajo hitrost hidrolize (15). Podobno so ugotovili, da MCC z visoko kapaciteto adsorpcije vlage ne zveča hitrosti hidrolize acetilsalicilne kisline. Poleg vpliva vlage so ugotovili tudi povezavo z indeksom kristaliničnosti MCC. Manjši, ko je ta indeks, manjša je hitrost hidrolize acetilsalicilne kisline (16). Ugotovili so tudi, da je hitrost odvisna od časa, ki je potreben za doseg ravnotežja adsorbirane vlage, ni pa odvisna od količine adsorbirane vlage v ravnotežnem stanju. Razlaga za ta pojav je, da snov, ki veže več vlage, le-to veže močneje, zato je ves čas do ravnotežnega stanja količina proste vode manjša. Iz tega sledi, da zmanjšanje proste vode zmanjša relativno reaktivnost (5).

Z merjenjem gibljivosti vode s pomočjo jedrske magnetne resonance so ugotovili, da je hitrost hidrolize trdnega cefalotina v mešanici z MCC odvisna od vode z visoko mobilnostjo. Povezava s celokupno količino vode pa ni bila tako izrazita (5).

MCC lahko vsebuje nizke koncentracije nesaharidnih organskih nečistot, ki izvirajo iz lignina. Te nečistote so alilni alkoholi/fenoli, ki se nahajajo v celulozni masi za pripravo MCC. Možno je, da razpadni produkti teh spojin v kombinaciji z radikali povzročajo neželene interakcije z ZU (17).

1.4 Modelne učinkovine zaviralcev angiotenzin-konvertaze v kombinaciji z MCC

Angiotenzin-kovertaza je pomemben encim v sistemu renin-angiotenzin-aldosteron. Njen substrat je neaktivni dekapeptid angiotenzin I, ki ga spremeni v angiotenzin II, ki zvišuje krvni tlak s krčenjem žil in povečanjem koncentracije aldosterona. Zaviralci angiotenzin-konvertaze so peptidomimetiki, ki posnemajo zadnji konec angiotenzina-I (X-Phe₈-His₉-Leu₁₀) in se z zadnjimi tremi aminokislinskimi ostanki na karboksilnem koncu vežejo v aktivno mesto encima (18).

Perindopril

Perindopril ((3S,3aS,7aS)-1-[(2S)-2-[[[(2S)-1-etoksi-1-oksopent-2-il]amino]propanoil]-2,3,3a,4,5,6,7,7a,-oktahidroindol-2-karboksilna kislina) spada v skupino zdravil za zniževanje krvnega tlaka, ki zavirajo delovanje encima angiotenzin-konvertaze. Perindopril je zdravilo, ki se po zaužitju s hidrolizo pretvori do aktivne oblike - perindoprilat (PAT) (19). V naših poskusih smo uporabili sol s *terc*-butilaminom – perindopriljev erbuminat (PE).

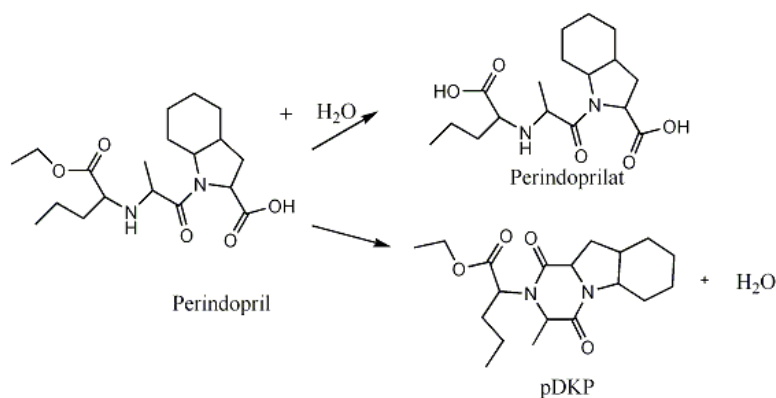
Enalapril

Enalapril ((2S)-1-[(2S)-2-{{(2S)-1-etoksi-1-okso-4-fenilbut-2-il}amino}propanoil]pirolidin-2-karboksilna kislina) (20) ima enake farmakološke učinke kot perindopril. Uporabili smo sol z maleinsko kislino, ki tvori enalaprilijev maleat (EM).

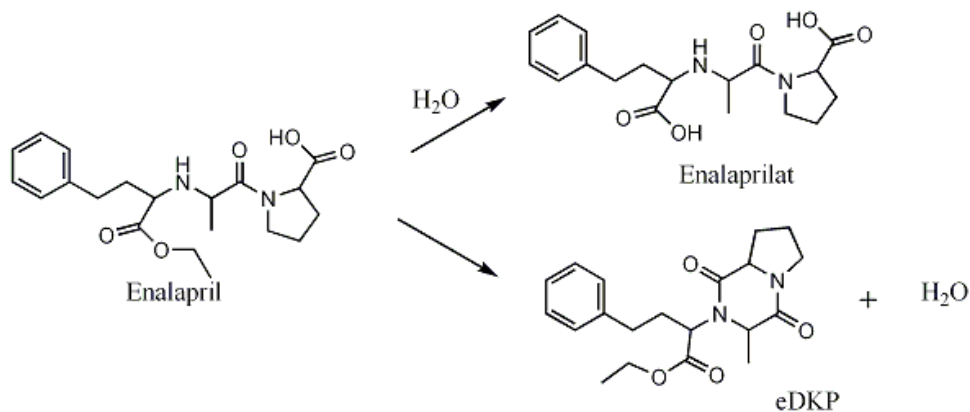
1.4.1 Kemizem in kemijske poti sprememb uporabljenih učinkovin

Pri obeh izbranih zaviralcih angiotenzin-konvertaze obstajata dve najpomembnejši razpadni reakciji. Prva je hidroliza estra, druga pa intramolekularna ciklizacija (17) (Slika 2 in 3).

Pri PE s hidrolizo estra nastane PAT, z intramolekularno ciklizacijo pa derivat diketopiperazina (pDKP) (Slika 2). Podobno velja za EM, iz katerega s hidrolizo estra nastane enalaprilat (ET), z intramolekularno ciklizacijo pa drug derivat diketopiperazina (eDKP) (Slika 3) (20).



Slika 2: Perindopril s produktoma hidrolize in ciklizacije (prirejeno po viru 21)



Slika 3: Enalapril s produktoma hidrolize in ciklizacije (prirejeno po viru 18)

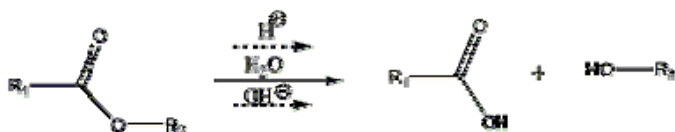
Ciklizacija – intramolekularna reakcija

Ciklizacija v trdni fazi je podobna spremembam, kot je npr. pretvorba snovi v amorfnu obliko, iz hidrata v brezvodno obliko ali iz soli v prosto obliko kisline oziroma baze. V našem primeru poteka reakcija med sekundarnim aminom, ki predstavlja nukleofil, in ogljikom v karboksilni skupini, ki predstavlja elektrofilni del. Napad se zgodi zaradi elektronskih privlakov in je ugoden s stališča tvorbe šestčlenskega obroča. Pri reakciji nastane amidna vez, izstopi molekula vode (22).

Hidroliza

Hidroliza je problematična s stališča stabilnosti zlasti v primeru parenteralnih zdravil, ko pride do neposrednega stika med vodo in učinkovino. Tudi v trdnih FO pride do neposrednega stika z molekulami vode zaradi zračne vlage, četudi je prisotna v manjših količinah. Hidroliza je ena izmed najpogostejših reakcij, ki jih opazimo pri razpadu ZU, zlasti kadar imamo v strukturi estrske, pa tudi amidne funkcionalne skupine (5).

Estri se primarno hidrolizirajo preko nukleofilnega napada hidroksilnega iona ali vode na elektrofilni ogljik, kot katalizatorji delujejo baze ali kisline (Slika 4).



Slika 4: Splošna shema hidrolize estra. Napad vode ali hidroksilnega iona na elektrofilni ogljik estrske skupine cepi molekulo na dva dela. Prirejeno po viru 5.

Hitrost hidrolize je odvisna od substituentov R₁ in R₂. Elektron akceptorske skupine hidrolizo pospešijo, nasprotno pa elektron donorske skupine hidrolizo zavirajo. Vpliv na hitrost reakcije lahko opazujemo tudi z vidika izstopajoče skupine. Tako lahko mehanizem hidrolize estra obravnavamo kot reakcijo adicije/eliminacije, kjer je izstopajoča skupina R₂-OH. Hitrost eliminacije je delno odvisna od stabilnosti nastalega alkoholata. Kot primer lahko povemo, da je hidroliza fenilbenzoata mnogo hitrejša kot etilbenzoata, ker je pK_a vrednost za etanol 18, za fenol pa 10. Pomembno vlogo imajo tudi sterični faktorji. Sterično večje skupine bodisi na R₁ ali na R₂ hitrost hidrolize zmanjšajo (5).

1.4.2 Reakcije v trdnem

Razpadne reakcije v trdnem vključujejo kemične spremembe, ki upoštevajo preureditev vezi med atomi kristalinične substance in navadno potekajo na medfazah. Medfaza je skupna površina med dvema različnima fazama (trdno/plin, trdno/kapljevina ipd). Hitrosti reakcij v trdnem so v večini primerov sorazmerne površini aktivne medfaze in T (23). Za stabilnost v trdni fazi so pomembne lastnosti trdne snovi, kot so T tališča, kristaliničnost in higroskopnost. Dodatno lahko na stabilnost vplivajo mehanske sile, ki jim je FO izpostavljena, kot sta pritisk in trenje. Vsi omenjeni dejavniki vplivajo na kemijsko in fizikalno stabilnost. V širšem pogledu je kemijska stabilnost lastnost, da vsaka učinkovina ohranja svojo kemično istovetnost in vsebnost znotraj deklariranih mej. Fizikalno stabilnost razumemo kot ohranjanje prvotnega izgleda, okusa, trdnosti, raztapljanja, ustrezne polimorfne oblike učinkovine (amorfne, kristalinične) itd. (5).

1.4.3 Stabilnost PE in EM

PE je v večini pogojev manj stabilen kot EM (18). Stabilnost perindopрила kot molekularne oblike, soli z maleinsko kislino in natrijev perindoprilat je originatorsko podjetje opisalo v patentu (24). Natrijev perindoprilat se hitro spremeni v olju podobno kapljevino, kar otežuje rokovanje. Perindopril in sol z maleinsko kislino hitro razpadata. Na 50°C v osmih dneh razpade med 25 in 30 % snovi. V začetnih trdnih FO je bila stabilnost PE zelo slaba; po 6 mesecih je na 30°C in 60 % RV preostalo 94,4 %, na 40°C in 75 % RV pa le 67,2 % začetnega PE. Veliko bolj stabilna je bila sol z L-argininom, saj je po 6 mesecih tudi na 40°C in 75 % RV ostalo nespremenjene več kot 98 % učinkovine (24).

Znana sol z L-argininom, ki je farmakološko enakovredna erbuminatu, velja za stabilnejšo od PE in jo lahko brez posebnih sprememb v načinu pakiranja tržijo tudi v klimatskih conah III in IV (19). Formulacije za vgradnjo PE so stabilnejše z uporabo polnil z nižjo vsebnostjo vlage (25), ali če jih vključimo v ciklodekstrine (26).

EM je poznan kot stabilna kemijska spojina. Spojina se ne spremeni po 4 letih hrambe v zaprti posodi na sobni T. Pri 80°C se po 3 tednih vsebnost zmanjša za manj kot 2 % in manj kot 1 % pri pogojih 40°C in 75 % RV za 16 tednov v odprti viali. Stabilnost EM se hitro poslabša v prisotnosti tabletnih polnil (21).

V literaturi najdemo podatke o aktivacijski energiji ciklizacije za EM (tvorba

eDKP), ki znaša med 195 ± 12 kJ/mol (27) oziroma $141,2 \pm 0,7$ kJ/mol (23). V primeru, da je EM v kombinaciji z Eudragitom E, se aktivacijska energija ciklizacije zmanjša na $86,7 \pm 0,8$ kJ/mol (27). Začetek reakcije ciklizacije se začne pri $T = 129^\circ\text{C}$ (določeno med dvema KBr ploščicama z IR spektrometrijo), intenzivnejše pa se ta reakcija začne pri 137°C . T tališča EM je med 147°C in 151°C (23).

Če primerjamo stabilnost v raztopini pri sobni T pri različnih pH, je EM stabilnejši pri pH 6,8 kot pri pH 2,0. PE pa je stabilnejši pri pH 2,0 kot pri pH 6,8. Za PE je značilno, da je občutljivejši na hidrolizo pri kislih (raztopina HCl) in nevtralnih pogojih (voda) kot EM. PE v vodi, alkalni raztopini (raztopina NaOH) in H_2O_2 skoraj ne ciklizira (18).

2 NAMEN DIPLOMSKEGA DELA

Zaradi pomembnega vpliva pomožnih snovi na stabilnost ZU v končni FO smo se odločili, da preučimo vpliv MCC ali bolj natančno različnih vrst MCC istega proizvajalca s tržnim imenom Avicel® na stabilnost dveh ZU iz skupine zaviralcev angiotenzin-konvertaze. Kot modelni učinkovini smo izbrali PE in EM. Poskušali bomo ugotoviti, ali obstajajo razlike v stabilnosti učinkovin v zmesih z različnimi vrstami MCC in ali so le-te signifikantne, ne bomo pa preučevali stabilnost samih učinkovin. Primerjali bomo tudi različne serije iste vrste MCC. Ugotavljali bomo prevladujoče vplive vsake vrste MCC na stabilnost učinkovin v okviru raziskovanja s funkcionalnostjo povezanih lastnosti in tudi ostalih lastnosti pomožnih snovi.

Podrobneje bomo opazovali vpliv vlage, pH in velikosti delcev MCC na stabilnost PE in EM ter skušali ugotoviti korelacijo teh parametrov s hitrostjo spremembe učinkovine. Kinetiko hidrolize in ciklizacije bomo spremljali na podlagi hitrosti povečevanja količine PAT, ET, pDKP in eDKP, ki se bodo pojavili v vzorcih. Analize bomo opravili po validiranih postopkih s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). Podatke bomo statistično obdelali na način, predlagan s strani regulatornih institucij (FDA).

Za dosego zgoraj navedenih ciljev bomo pripravili binarne zmesi med učinkovino in MCC. Predhodno bomo MCC-jem določili vsebnost vlage in pH njihovim vodnim suspenzijam. Binarne zmesi bomo mešali ročno in na način, da zagotovimo enakomerno mešanje. Del zmesi bomo postavili na pogoje $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/65\% \pm 5\% \text{ RV}$, del pa na pogoje $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \pm 5\% \text{ RV}$. Zmesi na posameznem pogoju bodo zrakotesno zaprte v vialah (zaprti pogoji), del pa bo razporejen na petrijevke, kjer bo dostop zračne vlage do zmesi neoviran (odprti pogoji). Po vnaprej določenih intervalih bomo opravljali HPLC analize vzorcev. Vzorce za analize bomo pripravili v dveh paralelkah. Zmesi na posameznih pogojih bomo analizirali v vsaj treh časovnih točkah.

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 Materiali, reagenti in metode

Materiali in reagenti

Avicel PH 101 lot. UD 3829 (FMC Biopolymers, ZDA);
Avicel PH 101 lot. UD 3158 (FMC Biopolymers, ZDA);
Avicel PH 101 lot. UD 3159 (FMC Biopolymers, ZDA);
Avicel PH 102, lot. UD 3827 (FMC Biopolymers, ZDA);
Avicel PH 105 lot. UB 1491 (FMC Biopolymers, ZDA);
Avicel PH 112, lot. UC 6978 (FMC Biopolymers, ZDA);
Avicel PH 200, lot. UD 3627 (FMC Biopolymers, ZDA);
Avicel PH 200LM, lot. UD 3829 (FMC Biopolymers, ZDA);
Perindopriljev erbuminat (Krka d. d., Novo mesto, Slovenija);
Enalapriljev maleat (Krka d. d., Novo mesto, Slovenija).

Perindopriljev erbuminat (99,5 %), delovni standard (Krka d. d., Novo mesto, Slovenija); enalapriljev maleat (99,9 %), delovni standard (Krka d. d., Novo mesto, Slovenija); enalaprilat (100 %), delovni standard (Krka d. d., Novo mesto, Slovenija); perindopril za selektivnost sistema, delovni standard (vsebuje PE in pDKP); zmes za kontrolo selektivnosti sistema za perindopril, system suitability for perindopril (EDQM), eDKP – sorodna substanca enalapriila (99,4 %), delovni standard (Krka d. d., Novo mesto, Slovenija); KH_2PO_4 p. a. (Merck, Darmstadt, Nemčija); H_3PO_4 (85 %) (J.T. Baker, ZDA); HClO_4 , koncentrirana (J. T. Baker, ZDA); natrijev heptansulfonat, p.a. (Merck, Darmstadt, Nemčija); trietilamin, p. a. (Merck, Darmstadt, Nemčija); demineralizirana voda (Milli-Q Millipore, ZDA); acetonitril, Ultra Gradient HPLC grade (J. T. Baker, ZDA).

Pomožni materiali in kolona

Klešče za zapiranje vial (ZDA); LDPE vrečke (2L) (Piskar d. o. o., Slovenija); viala za tekočinsko kromatografijo (2ml) (Chromacol, VB); parafilm (ZDA); kolona Hypersil ODS, delci $5\mu\text{m}$ (250 x 4mm I. D.) (ThermoScientific, Waltham, ZDA)

Aparature

Vakuumski sušilnik (Kambič, Slovenija); analitska tehtnica MC 210 P (Sartorius, Nemčija); stresalnik Vibromix (Tehtnica, Slovenija); pH meter (Metler Toledo, Švica); električni grelnik (Gorenje, Slovenija); komora za pogoje 40°C/75 % RV (Kambič, Slovenija); klimatizirana soba s pogoji 30°C/65 % RV; centrifuga (Multifuge 1 S-R, Heraus, Nemčija); ultrazvočna kadička Branson 8510 (Branson Ultrasonic Corp., ZDA); HPLC sistem Agilent Technologies 1100 (Agilent Technologies, Nemčija) z UV detektorjem z nizom diod, kvarterno črpalko, termostatiranim avtosemplerjem in grelcem kolone.

3.2 Binarne zmesi

3.2.1 Mešanje binarnih zmesi

Binarne zmesi smo pripravili v razmerju učinkovina (*PE oz. EM*) : MCC = 1 : 5. V osem 200-ml čaš smo natančno natehtali učinkovino in posamezne vrste MCC (tabela 2). V posamezno vrečko smo stresli natehtano učinkovino (3,3g) in eno vrsto MCC praška (16,6 g). Vrečko smo zaprli na način, da smo vanjo ujeli tudi zadostno količino zraka (približno $\frac{3}{4}$ volumna vrečke). Tako je bila zaprta vrečka napihnjena z zrakom, da se je MCC lažje mešala z učinkovino. Vrečko z zmesjo smo ročno stresali 10 min. Enak postopek smo opravili za vsako zmes posebej, vedno smo vzeli novo, čisto vrečko.

Potrebno količino zmesi smo izračunali na podlagi potrebnega števila analiz. Ocenili smo, da za vsak zaprt pogoj potrebujemo 5 vial za posamezno zmes (3 viala za periodične analize in 2 rezervni viali). Skupaj je bilo treba za vsako zmes napolniti 10 vial (5 vial na pogoju 30°C/65 % RV in 5 na pogoju 40°C/75 % RV). Na obeh odprtih pogojih smo imeli nekoliko večjo količino zmesi (približno 6 g na petrijevko za posamezno zmes), saj smo načrtovali večje število analiz. Poleg tega smo del zmesi prihranili za začetno analizo.

Pripravo zmesi s PE in EM smo načrtovali z nekaj tedenskim zamikom, da smo lahko nemoteno ob pravih intervalih analizirali posamezne zmesi.

Tabela 3 prikazuje časovni načrt hranjenja in analiziranja binarnih zmesi po posameznih pogojih.

Tabela 2: Podatki o pripravi zmesi in številu vial in petrijevk iz pogojev 30°C/65 % RV in 40°C/75 % RV.

Zmes \ Pogoj	30°C/65 % RV	40°C/75 % RV
PE (3,33g) + MCC (16,6g)	8 petrijevk (1 za vsako vrsto MCC)	8 petrijevk (1 za vsako vrsto MCC)
	40 zaprtih vial (5 za vsako vrsto MCC)	40 zaprtih vial (5 za vsako vrsto MCC)
EM (3,33g) + MCC (16,6g)	8 petrijevk (1 za vsako vrsto MCC)	8 petrijevk (1 za vsako vrsto MCC)
	40 zaprtih vial (5 za vsako vrsto MCC)	40 zaprtih vial (5 za vsako vrsto MCC)

Tabela 3: Čas hranjenja vzorcev - zmesi PE in EM z MCC na pogojih.

Zdrav. uč. \ Pogoji	Plan terminov analiz	
	PE	EM
Odprto 30°C/65 % RV	ZA, 4d, 7d, 14d, 1m, 2m, 3m	ZA, 4d, 7d, 14d, 1m, 2m, 3m
Odprto 40°C/75 % RV	ZA, 4d, 7d, 14d	ZA, 4d, 7d, 14d, 1m
Zaprto 30°C/65 % RV	ZA, 1m, 2m, 3m	ZA, 1m, 2m, 3m
Zaprto 40°C/75 % RV	ZA, 14d, 1m, 2m, 3m	ZA, 14d, 1m, 2m, 3m

m – mesec, d - dan

3.2.2 Priprava vzorcev za stresno testiranje stabilnosti v kontroliranih pogojih

Posamezno zmes z učinkovino smo polnili v vialo (približno 600 mg/vialo), ki smo jih zrakotesno zaprli (zaprt pogoj). Vialo smo polnili enakomerno in kar se da polno, da smo imeli čim manj zraka v viali. Predvsem je to pomembno zaradi količine zračne vlage. Preostali del zmesi smo razporedili na petrijevke (odprt pogoj). Del zaprtih vial smo postavili na pogoj 30°C ± 2°C in 65 % ± 5 % RV, del pa na odprte pogoje 40°C ± 2°C in 75 % ± 5 % RV). Na iste pogoje smo postavili tudi petrijevke z zmesmi. Tako smo razdelili vseh 8 zmesi (tabela 2).

3.3 HPLC analize

3.3.1 Eksperimentalni pogoji

a) PE

Analizo vzorcev PE smo izvedli po validirani gradientni HPLC metodi. Obdelava podatkov je potekala po odstotkovni metodi, normirani na zunanji standard PE (ESTD %).

Metoda ESTD % - enačba 1

$$\text{Koncentracija v \%} = \frac{\text{pov. vrha vz.} \cdot \text{natehta st.} \cdot \text{redčitev}}{\text{pov. vrha st.} \cdot \text{natehta vzorca} \cdot \text{delež uč. v zmesi}} \times 100$$

Kromatografski pogoji:

Mobilna faza A: pufer pH 2,0; pripravljen z natehtanjem 0,92 g natrijevega heptansulfonata (p. a.) v 1000-mL merilno bučo in dodatkom 1 mL trietilamina (p. a.). Razredčili smo z vodo in uravnali pH na 2,0 s perklorno kislino (p. a.) in dopolnili z vodo do oznake.

Mobilna faza B: acetonitril

Gradientna elucija je potekala po programu predstavljenem v tabeli 4 in je last podjetja Krka d. d., tovarna zdravil, Novo mesto, Slovenija.

Tabela 4: Program gradientne elucije za HPLC analizo PE.

čas (min)	% A	% B
0	70	30
1	70	30
20	40	60
25	40	60
35	20	80
40	0	100
45	70	30

Kolona: Hypersil ODS, delci 5 μ m (250 x 4 mm I.D.)

Temperatura: 70°C

Čas analize: 45 min

Pretok: 1,0 ml/min

Detekcija: UV detektor z nizom diod, $\lambda = 215$ nm

Volumen injiciranja: 20 μ l

Temperatura vzorcev: 7°C

b) EM

Kromatografske analize vzorcev z EM smo izvedli z validirano izokratsko HPLC metodo (21). Obdelava podatkov je potekala po odstotkovni metodi, normirani na zunanji standard EM (ESTD %) - *enačba 1*.

Kromatografski pogoji:

Mobilna faza: fosfatni pufer 2,0 (v 1000-mL merilno bučko smo natehtali 136 mg kalijevega dihidrogenfosfata (p.a.) in raztopili v 800 mL vode, pH smo uravnali na 2,0 s fosforjevo (V) kislino (p. a.) in dopolnili z vodo do oznake volumna) : acetonitril = 60 : 40 (V/V)

Kolona: Hypersil ODS, delci 5 μ m (250 x 4 mm I.D.)

Temperatura: 70°C

Čas analize: 25 min

Pretok: 1,0 ml/min

Detekcija: UV detektor z nizom diod, λ = 215 nm

Volumen injiciranja: 20 μ l

Temperatura vzorcev: 7°C

3.3.2 Topila in raztopine za HPLC meritve

a) PE

Topilo za PE, Pufer-1 pH 2,0

V 1000-ml merilno bučko smo natehtali 0,92 g natrijevega heptansulfonata, dodali nekaj vode, da se je sol raztopila. Nato smo dodali 1,0 ml trietilamina in dopolnili z vodo ter s pomočjo pH metra umerili pH na 2,0 z dodajanjem koncentrirane perklorne kisline.

Raztopina standarda PE

V 10-ml merilno bučko smo natančno natehtali približno 10 mg standarda PE, raztopili smo ga v topilu za PE in dopolnili do oznake volumna (pRS1). V 100-ml merilno bučko smo odpipetirali 3,0 ml raztopine pRS1 in dopolnili s topilom za PE do oznake volumna (pRS).

Raztopina za kontrolo selektivnosti sistema - perindopril

V 2-ml merilno bučko smo natančno natehtali približno 6 mg standarda perindopriila za selektivnost sistema – delovni standard, raztopili smo ga v puferni raztopini pH 2,0 za analizo PE in dopolnili do oznake volumna z istim pufrom.

b) EM

Topilo za EM, Pufer-2 pH 2,0

V 800 ml vode smo raztopili 136 mg KH_2PO_4 in s koncentrirano H_3PO_4 uravnali s pomočjo pH metra na $\text{pH} = 2,0$ ter dopolnili do 1000 ml.

Raztopina standarda EM

V 50-ml merilno bučko smo natančno natehtali približno 5 mg standarda EM, ga raztopili v topilu za EM in dopolnili do oznake volumna (eRS1). V 10-ml merilno bučko smo odpipetirali 1,0 ml raztopine eRS1 in dopolnili s topilom za EM do oznake volumna (eRS).

Raztopina za kontrolo selektivnosti enalapriila

V 10-ml merilno bučko smo natančno natehtali približno 10 mg standarda EM, dodali smo 1,0 ml raztopine enalapriilata (5,0 mg enalapriilata/50,0 ml topila za EM) in 1,0 ml raztopine diketopiperazina (5,0 mg eDKP/50,0 ml topila za EM) ter dopolnili s puferno raztopino za EM do oznake volumna.

c) Priprava vzorcev za HPLC analizo

Posamezne vialne in petrijevke smo glede na načrtovane termine (tabela 2) vzeli iz kontroliranih pogojev. Za vsako zmes smo natančno natehtali približno 120 mg zmesi po dve paralelki v 20-ml merilne bučke. V merilne bučke smo nato dodali topilo za raztapljanje (tabela 5) do oznake in raztapljali 10 min v ultrazvočni kadi. Vzorce smo medtem tudi večkrat pretresli. Po 10 min raztapljanja smo del vzorca (10 do 12 ml) prelili v epruvete za centrifugiranje. Epruvete smo zaprli s parafilmom. Centrifugirali smo 10 min pri 3500 obratih/min. Popolnoma sedimentirane vzorce smo vizuelno pregledali, če so bistri in če na površini plavajo morebitni delci. Supernatant smo po pregledu polnili v vialne za HPLC meritve z zatemnjenim steklom. Vialne smo prenesli v HPLC sistem, kjer so se hladile na 7° C.

Tabela 5: Natehtane zmesi in uporabljena topila za pripravo vzorcev za HPLC analizo.

Učinkovina Material	PE	EM
Natehta zmesi	120 mg	120 mg
Topilo za raztapljanje	Topilo za PE (Pufer-1)	Topilo za EM (Pufer-2)

3.4 Določevanje vlage in pH

3.4.1 Določanje vlage

Tehtiče smo oštevilčili in jih prazne, s pripadajočim pokrovčkom, odprte postavili v sušilnik. Pogoji sušenja so bili 105°C in znižan tlak (10^3 Pa). Prazne tehtiče smo sušili 30 min. Po tem času smo jih postavili v eksikator, nad molekularnimi siti. Tam so se ohladili na sobno T, šele nato smo jih stehtali. V suh tehtič smo natančno natehtali med 0,6 in 1,0 g MCC. Zapisali smo si pogoje v laboratoriju med tehtanjem (RV in T). Za vsako vrsto MCC v zmesih smo pripravili po 3 paralelke. Vzorce smo v odprtih tehtičih postavili na poličko v vakuumski sušilnik in jih sušili po postopku PhEur (2.2.32) do konstantne teže.

Delež vlage smo računali po *enačbi 2*

$$\text{Delež vlage(\%)} = \frac{\text{masa suh. tehtiča} + \text{masa MCC} - \text{masa tehtiča z vzorcem po suš.}}{\text{masa MCC}} \times 100$$

3.4.2 Določevanje pH

Določevanje pH suspenzij MCC smo izvedli po postopku PhEur (2.2.3). V erlenmajerice smo natančno natehtali po 2,5 g MCC. V vsako erlenmajerico smo dodali še 20,0 ml degazirane vode, zaprli z zamaškom in stresali na mehanskem tresalniku 20 minut. Po stresanju smo del vzorca prelili v epruvete in centrifugirali 10 min pri 3500 obratih/min. Supernatantu smo takoj izmerili pH s pH metrom.

Degazirano vodo smo pripravili po predpisu PhEur; potrebno količino demineralizirane vode smo vreli na električnem grelcu 15 minut in hladili pokrito, z urnim steklom zavito s parafilmom.

3.5 Statistična metoda

Protokol za statistično analizo podatkov stabilnostnih študij

Statistična metoda je bila za vse zmesi enaka. Najprej smo za vsako serijo, v našem primeru za vsako zmes posamezno, iz podatkov določili linearno regresijo (tabela 6). To je eden izmed pogojev za nadaljnje statistične analize. Nato smo testirali enakost oziroma homogenost naklonov med posameznimi zmesmi. Za testiranje statistično pomembnih razlik med nakloni med posameznimi zmesmi je priporočljivo vzeti verjetnostno mejo 0,25. Če želimo dokazati različnost, moramo določiti verjetnostni faktor (p), ki bo manjši od 0,25 (28).

Tabela 6: Primer podatkov, ki jih statistična analiza testira. Za vsako zmes imamo več parov podatkov; odziv koncentracije iz HPLC analize (Y) in čas hranjenja (X) (prirejeno po viru 28).

Zmes 1	Zmes 2	Zmes k
Y ₁₁ X ₁₁	Y ₂₁ X ₂₁	Y _{k 1} X _{k 1}
Y ₁₂ X ₁₂	Y ₂₂ X ₂₂	Y _{k 2} X _{k 2}
Y ₁₃ X ₁₃	Y ₂₃ X ₂₃	Y _{k 3} X _{k 3}
Y ₁₄ X ₁₄	Y ₂₄ X ₂₄	Y _{k 4} X _{k 4}
n ₁ parov	n ₂ parov	n _k parov

Y_{ij}: odziv, X_{ij}: čas

Pomen količin X, Y in n ter indeksov i, j, k v spodnjih enačbah lahko razberemo s pomočjo tabele 6.

Začetne izračunane količine so:

Za vsako zmes i , vzeto posamezno izračunamo sledeče količine.

$$SSY_i = \sum_{j=1}^{n_i} Y_{ij}^2 - \left(\sum_{j=1}^{n_i} Y_{ij} \right)^2 / n_i \quad \text{enačba 3}$$

$$SPXY_i = \sum_{j=1}^{n_i} X_{ij} Y_{ij} - \left[\left(\sum_{j=1}^{n_i} X_{ij} \right) \left(\sum_{j=1}^{n_i} Y_{ij} \right) / n_i \right] \quad \text{enačba 4}$$

$$SSX_i = \sum_{j=1}^{n_i} X_{ij}^2 - \left(\sum_{j=1}^{n_i} X_{ij} \right)^2 / n_i \quad \text{enačba 5}$$

$$b_i = SPXY_i / SSX_i \quad \text{enačba 6}$$

$DL_i = n_i - 2$	<i>enačba 7</i>
$SS \hat{y}_i = (SPXY_i)^2 / SSX_i$	<i>enačba 8</i>
$SSYX_i = SSY_i - SS \hat{y}_i$	<i>enačba 9</i>
$S^2_{y_{x_i}} = SSYX_i / DL_i$	<i>enačba 10</i>
$F1_i = SS \hat{y}_i / S^2_{y_{x_i}}$	<i>enačba 11</i>

Za zagotovitev obstoja regresijske premice za posamezno zmes smo testirali F testno statistiko. F1 primerjamo z vrednostjo F iz Fisherjeve tabele pri verjetnostnem tveganju $\alpha=0,05$. V Fisherjevi tabeli poiščemo vrednost $F_{\alpha,1,DL_i}$. Če je F1 večji od $F_{\alpha,1,DL_i}$, potem lahko potrdimo obstoj regresijske premice za zmes i in tako tudi odvisnost med Y in X (28). Teh podatkov ne bomo posebej predstavljali, ker se večina testiranih podatkov linearno ujema. Če ne bomo dokazali linearnosti pri meji 0,05, bomo take podatke izvzeli iz nadaljnje statistične analize. V tabelah bomo raje predstavili bolj znan determinacijski koeficient (R^2).

Primerjava naklonov za k zmesi

Za skupino zmesi izračunamo sledeče količine:

$$SSY \text{ znotraj} = \sum_{i=1}^k SSY_i \quad \text{enačba 12}$$

$$SPXY \text{ znotraj} = \sum_{i=1}^k SPXY_i \quad \text{enačba 13}$$

$$SSX \text{ znotraj} = \sum_{i=1}^k SSX_i \quad \text{enačba 14}$$

Poleg teh izračunamo še naslednje količine:

$$SS \hat{y} \text{ znotraj} = (SPXY \text{ znotraj})^2 / SSX \text{ znotraj} \quad \text{enačba 15}$$

$$DL \text{ znotraj} = \sum_{i=1}^k n_i - k - 1 \quad \text{enačba 16}$$

$$SSYX \text{ znotraj} = SSY \text{ znotraj} - SS \hat{y} \text{ znotraj} \quad \text{enačba 17}$$

$$SSYX \text{ skupni} = \sum_{i=1}^k SSYX_i \quad \text{enačba 18}$$

$$DL \text{ skupni} = \sum_{i=1}^k n_i - 2k \quad \text{enačba 19}$$

$$S^2_{yx} \text{ skupni} = \text{SSYX skupni} / \text{DL skupni} \quad \text{enačba 20}$$

Izračun vsote kvadratov razlik med nakloni

$$\text{SS med } b = \text{SSYX znotraj} - \text{SSYX skupni} \quad \text{enačba 21}$$

$$\text{DL med } b = k-1 \quad \text{enačba 22}$$

$$\text{MS med } b = \text{SS med } b / \text{DL med } b \quad \text{enačba 23}$$

$$F_s = \text{MS med } b / S^2_{yx} \text{ skupni} \quad \text{enačba 24}$$

F_s primerjamo z vrednostjo iz Fisherjeve tabele s statističnim tveganjem $\alpha = 0,25$. Naj bo ta vrednost $F_{\alpha, k-1, \sum n_k - 2k}$. Če je F_s manjša od $F_{\alpha, k-1, \sum n_k - 2k}$, takrat lahko zaključimo, da so nakloni v skupini zmesi homogeni. Za dokaz različnosti naklonov pa mora biti F_s vrednost večja od F iz Fisherjeve tabele (28). Če predstavimo s p vrednostjo, mora le-ta biti manjša od 0,25, da potrdimo nehomogenost med nakloni.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Binarne zmesi

Uporabili smo 6 različnih vrst MCC (Avicel PH 101, Avicel PH 102, Avicel PH 105, Avicel PH 112, Avicel PH 200 in Avicel PH 200LM), od tega je bila ena vrsta MCC (Avicel PH 101) v treh različnih serijah. Omenjeni izbor MCC smo naredili glede na njihove karakteristike, pogostnost njihove uporabe pri proizvodnji FO kakor tudi glede na izvor (proizvajalec). Prav tako smo z več različnimi serijami iste vrste MCC želeli preveriti konstantnost njihove kakovosti. Uporabljene MCC se razlikujejo po velikosti delcev, nasipni gostoti in vsebnosti vlage. Zaradi omenjenih razlik se različne vrste MCC uporabljajo za specifične namene v procesu proizvodnje (tabela 7).

Izbira učinkovin (PE in EM) je temeljila predvsem na dostopnosti podatkov in znanja o teh učinkovinah iz predhodnih raziskav, kar je omogočilo primerjavo med našimi in literaturnimi podatki. Le-ti temeljijo predvsem na stabilnosti učinkovin v raztopinah. Drugi vzroki so bili tudi dostopnost omenjenih učinkovin ter že vzpostavljene in validirane HPLC metode analiz teh učinkovin.

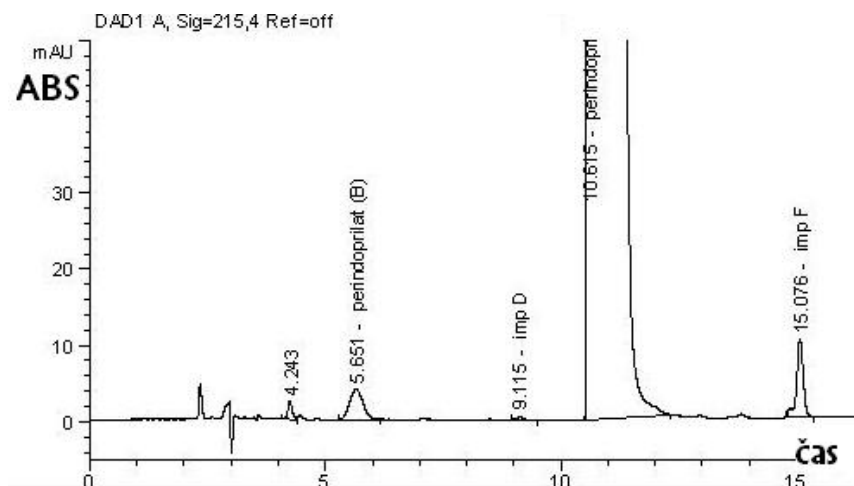
Razmerje med učinkovino in MCC = 1 : 5 je bilo izbrano tako, da je predstavljalo približek razmerja med učinkovino in MCC v tabletah – predvsem v tistih z večjim odmerkom učinkovine. Binarne zmesi smo pripravili zato, da smo ugotavljali le vpliv MCC in ne ostalih sestavin na stabilnost končne FO.

4.2 HPLC analize

Za analize zmesi smo uporabili že validirani HPLC metodi. Za zmesi s PE gradientno, za analize EM pa izokratsko metodo.

Primera HPLC kromatogramov sta predstavljena na *sliki 5* in *sliki 6*. Slika 5 prikazuje kromatogram, ki nastane po analizi mešanice PE z MCC.

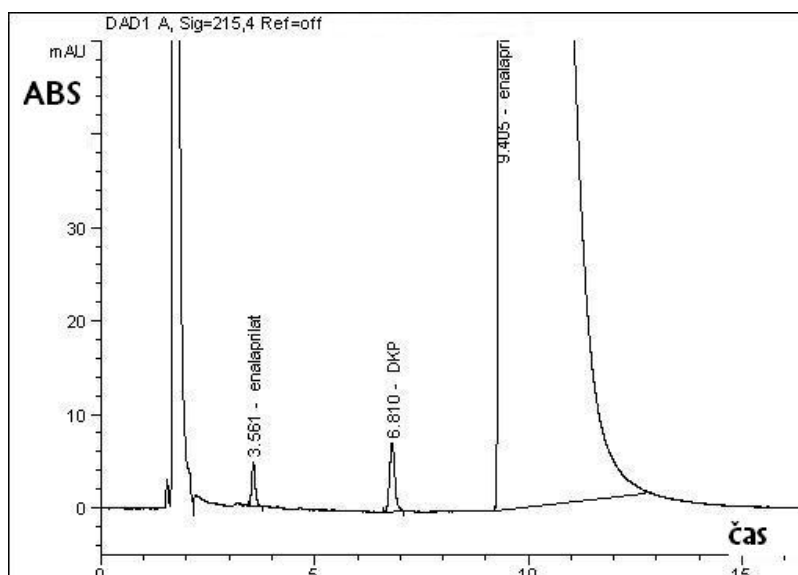
Vidnih je več vrhov (PAT, perindopril in sorodni substanci D (imp D) ter F (imp F)). Ciklizacijska sorodna substanca (imp F) predstavlja diketopiperazin (pDKP). Pri naši raziskavi smo opazovali in kvantificirali hidrolizno sorodno substanco PAT in produkt ciklizacije diketopiperazin (pDKP).



Slika 5: Primer HPLC kromatograma za zmes PE z MCC po enem mesecu hranjenja na odprtih pogojih 30° C/65 % RV. Vidni so razpadni produkti (PAT (B), Imp. D in Imp F). Imp F predstavlja diketopiperazin (pDKP).

Slika 6 prikazuje HPLC kromatogram zmesi med EM in MCC. Vidni so štiri vrhovi. Prvi, ki je neoznačen, je odziv maleinske kisline. Dva manjša vrhova sta odziva za ET in diketopiperazin (eDKP). Spremljali smo samo odzive hidrolizne sorodne substance ET in ciklizacijsko sorodne substance eDKP.

Stabilnost vzorcev v raztopini smo določili takoj na začetku in po 48 urah hranjenja na 7°C. Sprememb po 48 urah nismo zaznali.



Slika 6: Primer HPLC kromatograma za zmes EM z MCC po enem mesecu hranjenja na odprtih pogojih 30° C/65 % RV. Vidni so razpadni produkti ET in eDKP.

4.3 Karakteristike MCC

Tabela 7 nam prikazuje specifikacijo proizvajalca za testirane vrste MCC: velikost delcev, vsebnost vlage in gostoto ter eksperimentalno izmerjene vrednosti za vlago in pH vodnih suspenzij z MCC.

Tabela 7: Nekateri parametri za testirane vrste MCC (10) in izmerjene vrednosti vlage in pH vodnih suspenzij MCC.

Parameter Lastnost in uporaba	Vrsta Avicel®-a	*Velikost delcev (µm)	*Vlaga % (m/m)	*Nasipna gostota (g/cm ³)	Vlaga % (m/m) določeno povp. (n=3)	pH suspenzij določena (n=1)
vlažno gran.	PH-101 _a	50	3.0 do 5.0	0.26 - 0.31	4,9	6,57
	PH-101 _b				4,4	6,66
	PH-101 _c				4,5	6,63
dir. stiskanje	PH-102	100	3.0 do 5.0	0.28 - 0.33	4,5	6,80
boljša stisljivost	PH-105	20	NVK 5.0	0.20 - 0.30	5,0	6,30
boljša pretočnost	PH-200	180	2.0 do 5.0	0.29 - 0.36	3,7	6,85
nizka vseb. vlage	PH-112	100	NVK 1.5	0.28 - 0.34	3,8	6,29
nizka vseb. vlage	PH-200 LM	180	NVK 1.5	0.30 - 0.38	3,5	6,45

*Podatki proizvajalca

NVK – ne več kot

a...serija UD 3829, b...serija UD 3158, c...serija UD 3159

4.3.1 Določevanje vlage

Za določevanje vlage v vzorcih smo uporabili metodo sušenja pri povišani T (105°C) in tlaku pod 10^3 Pa do konstantne teže.

Večina meritev je kazala, da je delež vlage v zgornjem delu deklarirane vsebnosti (med 4 in 5 %). Vse meritve so bile znotraj farmakopejske zahteve (ne več kot 7.0 % vlage). Večja vsebnost vlage pri PH 105 je najverjetneje posledica večje površine, ki lahko veže več vode. Opazimo, da imajo vrste MCC, ki imajo deklarirano nizko vsebnost vlage (Avicel PH 112 in PH 200 LM), v resnici zelo velik delež vlage. Zagotavljanje vsebnosti vlage pod 1,5 % pri teh vrstah MCC tudi po odprtju vsebnika je namreč zelo težko, saj tako sušena MCC hitro veže okoliško vlago.

MCC z nizko vsebnostjo vlage se ob prisotnosti vlage navlažijo in postanejo analogi z normalno vsebnostjo vlage. Podatek na proizvajalčevi spletni strani trdi, da se Avicel PH 112 z navlaženjem spremeni v Avicel PH 102 (10). Podobno lahko sklepamo za pretvorbo PH 200 LM v PH 200.

4.3.2 Določevanje pH

pH suspenzij smo izmerili z namenom, da ugotovimo vpliv pH na stabilnost molekul učinkovin v zmesi z MCC. Rezultati meritev so predstavljeni v *tabeli 7*. Opaziti je nekaj razlik, nobena meritev pa ne odstopa od zahteve po PhEur (ne več kot pH=7). Rahlo višji pH imata vzorca PH 200 (pH=6,85) in PH 102 (pH=6,80), rahlo nižjega pa vzorca PH 112 (pH=6,29) in PH 105 (pH=6,30). Vrednosti treh serij PH 101 so precej podobne (od pH=6,57–6,66). V splošnem lahko zaključimo, da so vrednosti pH suspenzij z MCC blizu nevtralnega območja, kar je razumljivo, saj MCC nima nobenih kislinskih ali bazičnih skupin v molekularni strukturi.

4.4 Rezultati stabilnosti učinkovin v binarnih zmesih z MCC

Kot smo že omenili, smo za namene poskusov uporabili PE in EM. Za vsako izmed omenjenih učinkovin smo spremljali hidrolizni, ciklizacijski produkt razpada in njuno vsoto (tabela 8 in 10). Rezultati meritev porasta razpadnih produktov so prikazani s tabelami, histogrami in grafi. Meritve so bile opravljene v dveh paralelkah, kot rezultat pa je predstavljena povprečna vrednost obeh. Nekatere meritve smo arbitrarno izločili, ker so

odstopale od nakazujočega trenda naraščanja sorodnih substanc. Predvidevamo, da je posamezna viala slabše tesnila in posledično sta zrak in zračna vlaga prišla v stik z zmesjo pri zaprtih pogojih in pospešila procese hidrolize ter ciklizacije. V teh primerih je prikazan in obdelan samo podatek ene analize in ne povprečje dveh. Nekateri rezultati meritev – predvsem za analize v prvih tednih testiranj pri PE – so bili pod mejo detekcije. Nekaterih rezultatov pri statistični obdelavi nismo upoštevali, ker so bili ti rezultati nerealni in bi zmanjšali vrednost nadaljnje obdelave rezultatov (v tabeli 8 in 10 označeni potemnjeno). Pri potemnjenih vrednostih za naklon je statistični model pokazal, da povezave ($\alpha = 0,05$) med spremenljivkama ni.

Pri vzorcih zmesi MCC z EM je prišlo pri zaprtih vzorcih zaradi slabega tesnenja vial do nerealnih rezultatov in smo jih morali iz študije v celoti izločiti. Naklon oziroma konstanta hitrosti nastajanja posameznega razpadnega produkta je določena z linearno regresijo. Opazovali smo porast količine razpadne snovi v času. Enota konstante hitrosti je odstotek/dan.

4.4.1 Rezultati stabilnosti za zmesi MCC s PE

Tabela 8: Rezultati razpadnih produktov stresnega in pospešenega testiranja binarnih zmesi PE z različnimi vrstami oziroma serijami MCC

	PE + PH 101 _a			PE + PH 101 _b			PE + PH 101 _c			PE + PH 102		
	PAT (%)	pDKP (%)	skupno (%)	PAT (%)	pDKP (%)	skupno (%)	PAT (%)	pDKP (%)	skupno (%)	PAT (%)	pDKP (%)	skupno (%)
začetna	pmd	0,04	0,04	pmd	0,04	0,04	0,00	0,04	0,05	pmd	0,04	0,04

Izbrisano: Rezultati so predstavljeni z deležem razpada (%).

Izbrisano: S

Izbrisano: S

Izbrisano: S

Izbrisano: S

30° C/65 %RH - odprto

4d	0,01	0,05	0,07	0,01	0,05	0,07	0,02	0,05	0,07	0,02	0,06	0,08
7d	0,03	0,07	0,09	0,03	0,07	0,09	0,02	0,07	0,09	0,03	0,08	0,11
14d	0,05	0,09	0,15	0,06	0,09	0,15	0,05	0,09	0,14	0,07	0,11	0,18
1m	0,16	0,17	0,33	0,14	0,16	0,30	0,14	0,16	0,30	0,18	0,21	0,39
2m	0,29	0,29	0,58	0,28	0,27	0,55	0,29	0,28	0,56	0,36	0,36	0,72
3m	0,50	0,43	0,93	0,45	0,39	0,84	0,46	0,40	0,87	0,60	0,55	1,16
R ²	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
naklon	0,006	0,004	0,010	0,005	0,004	0,009	0,005	0,004	0,009	0,007	0,006	0,013

Oblikovana tabela

30° C/65 %RH - zaprto

1m	0,01	0,07	0,08	0,02	0,07	0,09	0,02	0,08	0,10	0,02	0,09	0,11
2m	0,00	0,07	0,07	0,02	0,09	0,11	0,02	0,10	0,12	0,02	0,11	0,13
3m	0,01	0,10	0,11	0,02	0,13	0,15	0,02	0,12	0,15	0,10	0,24	0,34
R ²	0,19	0,93	0,88	0,78	0,95	0,98	0,71	0,98	0,94	0,76	0,98	0,84
naklon	0,0001	0,0008	0,0007	0,0003	0,0010	0,0013	0,0002	0,0008	0,0011	0,0011	0,0022	0,0033

40° C/75 %RH - odprto

4d	0,73	0,89	1,62	0,69	0,85	1,54	0,56	0,64	1,21	0,68	0,80	1,48
7d	1,37	1,62	3,00	1,32	1,55	2,87	1,17	1,31	2,48	1,29	1,47	2,75
14d	3,21	3,97	7,18	2,98	3,62	6,60	2,89	3,42	6,31	3,49	4,58	8,07
R ²	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,96	0,97
naklon	0,23	0,28	0,52	0,21	0,26	0,47	0,21	0,25	0,46	0,25	0,33	0,58

40° C/75 %RH - zaprto

7d	0,00	0,06	0,06	0,01	0,08	0,09	0,02	0,08	0,09	0,00	0,06	0,06
14d	0,00	0,06	0,06	0,02	0,09	0,11	0,03	0,10	0,13	0,02	0,10	0,11
1m	0,03	0,18	0,21	0,07	0,31	0,38	0,04	0,22	0,25	0,03	0,18	0,22
2m	0,08	0,45	0,53	0,05	0,32	0,37	0,05	0,33	0,38	0,04	0,27	0,31
3m	0,06	0,42	0,48	0,06	0,46	0,52	0,07	0,51	0,59	0,06	0,51	0,46
R ²	0,92	0,99	0,98	0,99	1,00	1,00	0,94	0,99	0,99	0,92	0,97	0,99
naklon	0,0007	0,0046	0,0053	0,0007	0,0049	0,0056	0,0007	0,0055	0,0062	0,0007	0,0053	0,0049

Legenda oznak: na naslednji strani

Tabela 8 – nadaljevanje: Rezultati razpadnih produktov stresnega in pospešenega testiranja binarnih zmesi PE z različnimi vrstami oz. serijami MCC. Rezultati so predstavljeni z deležem razpada (%).

	PE+ PH 105			PE + PH 112			PE + PH 200			PE + PH200LM			Oblikovana tabela
	PAT (%)	pDKP (%)	skupno (%)	PAT (%)	pDKP (%)	Skupno (%)	PAT (%)	pDKP (%)	Skupno (%)	PAT (%)	pDKP (%)	Skupno (%)	Izbrisanost: o
začetna	pmd	0,04	0,04	pmd	0,04	0,04	pmd	0,04	0,04	pmd	0,04	0,04	Oblikovano: Pisava: 9 pt
30° C/65 %RH-odprto													Oblikovano: Pisava: 9 pt
4d	0,01	0,05	0,07	0,02	0,06	0,07	0,02	0,06	0,08	0,02	0,06	0,08	Oblikovano: Pisava: 9 pt
7d	0,03	0,07	0,10	0,03	0,07	0,11	0,03	0,07	0,10	0,03	0,08	0,11	Oblikovano: Pisava: 9 pt
14d	0,06	0,11	0,16	0,07	0,09	0,16	0,06	0,10	0,16	0,07	0,12	0,19	Oblikovano: Pisava: 9 pt
1m	0,15	0,20	0,35	0,18	0,21	0,39	0,16	0,18	0,35	0,17	0,21	0,38	Oblikovano: Pisava: 9 pt
2m	0,28	0,34	0,62	0,33	0,34	0,68	0,30	0,30	0,61	0,33	0,37	0,70	Oblikovano: Pisava: 9 pt
3m	0,44	0,50	0,94	0,57	0,53	1,10	0,51	0,47	0,98	0,54	0,54	1,08	Oblikovano: Pisava: 9 pt
R ²	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	Oblikovano: Pisava: 9 pt
naklon	0,005	0,005	0,010	0,006	0,006	0,012	0,006	0,005	0,011	0,006	0,006	0,012	Oblikovano: Pisava: 9 pt
30° C/65 %RH -zaprto													Oblikovano: Pisava: 9 pt
1m	0,03	0,09	0,12	pmd	0,06	0,06	pmd	0,05	0,05	0,02	0,07	0,09	Oblikovano: Pisava: 9 pt
2m	0,04	0,15	0,19	0,02	0,10	0,12	pmd	0,06	0,06	0,05	0,06	0,11	Oblikovano: Pisava: 9 pt
3m	0,16	0,30	0,46	0,02	0,09	0,11	0,02	0,10	0,12	0,01	0,10	0,11	Oblikovano: Pisava: 9 pt
R ²	0,82	0,91	0,88	0,78	0,84	0,83	0,59	0,88	0,80	0,21	0,74	0,87	Oblikovano: Pisava: 9 pt
naklon	0,002	0,0029	0,005	0,0003	0,0012	0,001	0,0002	0,0006	0,0009	0,0003	0,0006	0,0009	Oblikovano: Pisava: 9 pt
40° C/75 %RH-odprto													
4d	0,69	0,96	1,13	0,70	0,85	1,55	0,72	0,88	1,60	0,67	0,82	1,49	
7d	1,32	1,76	3,09	1,43	1,75	3,17	1,39	1,66	3,05	1,33	1,57	2,90	
14d	3,64	5,34	8,97	3,18	4,10	7,27	3,21	4,13	7,34	3,55	4,83	8,37	
R ²	0,97	0,96	0,96	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98	0,99	0,98	0,96	0,97	
naklon	0,26	0,40	0,66	0,23	0,29	0,52	0,23	0,30	0,53	0,26	0,35	0,61	
40° C/75 %RH -zaprto													
7d	0,03	0,11	0,14	pmd	0,06	0,06	pmd	0,06	0,06	pmd	0,06	0,06	
14d	0,06	0,23	0,30	0,02	0,07	0,09	0,01	0,04	0,05	0,03	0,09	0,12	
1m	0,20	0,53	0,73	0,02	0,14	0,16	0,02	0,12	0,14	0,03	0,16	0,19	
2m	0,26	0,81	1,07	0,04	0,22	0,26	0,03	0,19	0,22	0,03	0,17	0,20	
3m	0,44	0,89	1,33	0,09	0,51	0,60	0,04	0,26	0,31	0,05	0,27	0,32	
R ²	0,98	0,95	0,96	0,90	0,92	0,92	0,93	0,98	0,98	0,88	0,94	0,69	
naklon	0,005	0,010	0,015	0,001	0,005	0,006	0,001	0,003	0,003	0,0005	0,002	0,003	

PAT: perindoprilat

pDKP: diketopiperazin

skupaj: perindoprilat + diketopiperazin

d: dan

m: mesec

R²: determinacijski koeficient

Naklon: konstanta hitrosti; enote odstotek razpada/dan (d⁻¹)

pmd: pod mejo detekcije (pod 0,005 %)

a: serija UD3829, b: serija UD 3158, c: serija UD 3159

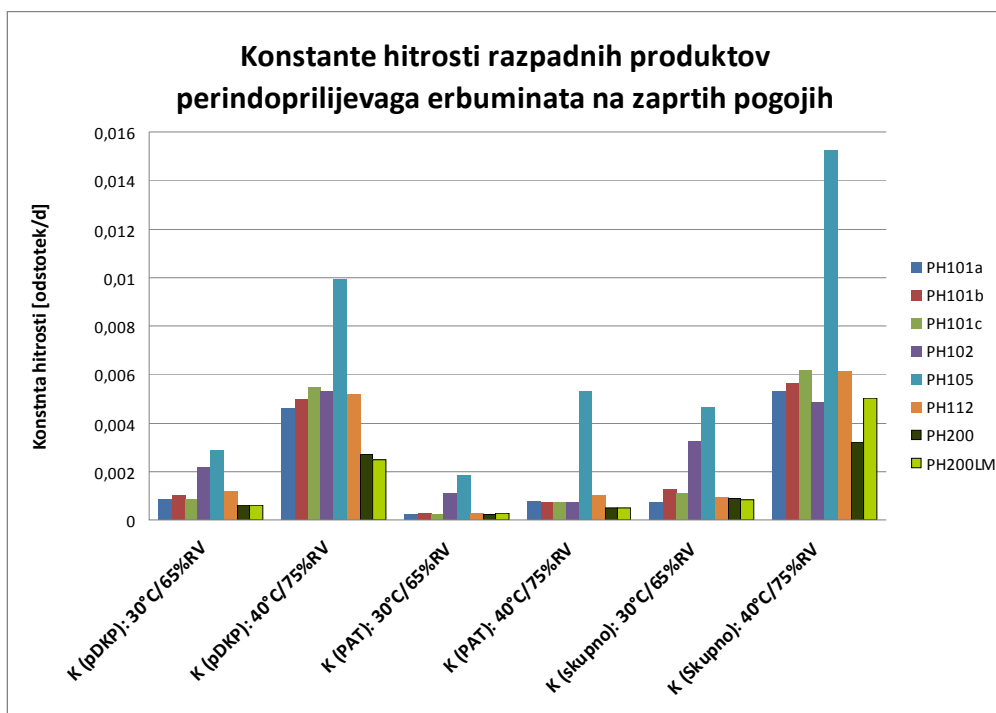
osenčeni rezultati: izvzeti iz izračunov ali ni linearne povezave (p>0,05)

Zaprta pogoja

Preglednejši od Tabele 8 je Histogram 1, ki predstavlja razlike med konstantami hitrosti razpada za posamezne in skupne razpadne produkte PE, ločeno po obeh zaprtih pogojih (40°C/75 % RV, 30°C/65 % RV). Trendi so po pričakovanjih izrazitejši na pogoju 40°C/75 % RH kot na pogoju 30°C/65 % RH. K vsoti razpadnih produktov največ prispeva pDKP. Pri določevanju PAT na zaprtih pogojih 30°C/65 % RV so količine zelo nizke ali celo pod mejo detekcije in le redko dobimo linearno povezavo z ugodnim determinacijskim koeficientom R^2 .

Na zaprtih pogojih je PE najstabilnejši v zmesih z MCC Avicel PH 200. Močno izstopa povečana hitrost razpada PE tako v PAT kot v pDKP v zmesi z Avicelom PH 105.

Različne serije Avicela PH 101 so na zaprtih pogojih večinoma podobno vplivale na stabilnost PE, če sodimo po absolutnih vrednostih konstante hitrosti, vendar statistična analiza pokaže, da razlike v večini primerov obstajajo.

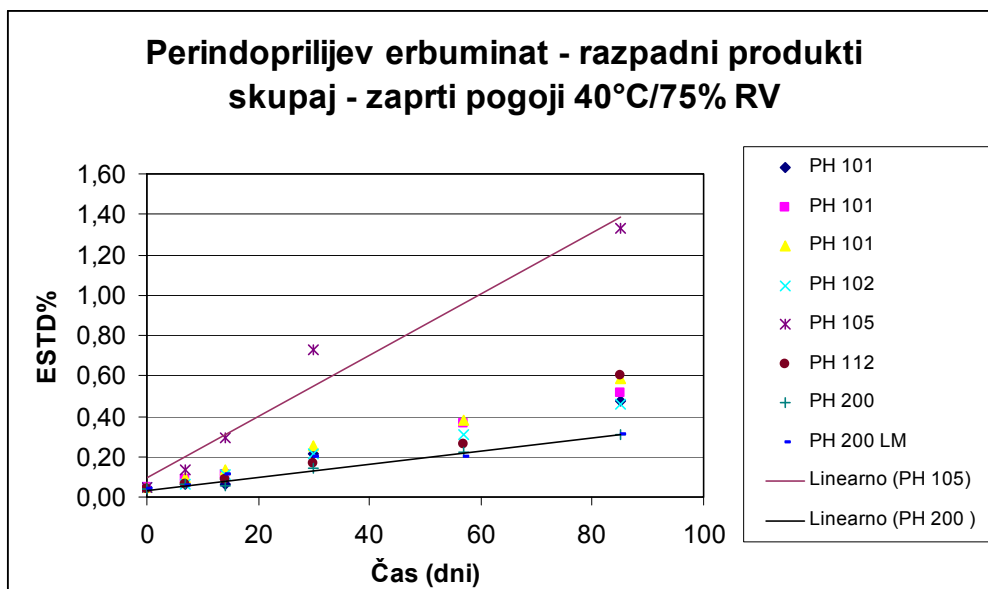


a: serija UD3829, b: serija UD 3158, c: serija UD 3159

Histogram 1: Prikaz konstant hitrosti razpada PE; ločeno po razpadnih produktih in vrstah MCC za PE na zaprtih pogojih.

Graf 1 nazorno predstavlja razliko med vplivom Avicela PH 105 in ostalimi vrstami MCC na PE za pogoj 40°C /75 % RV. Konstanta hitrosti razpada PE je v zmesi s PH 105 od 2- do 5-krat večja kot pri ostalih vrstah MCC.

Iz rezultatov (tabela 8) in iz histograma 1 je razvidno, da MCC PH 105 pospešuje nastajanje tako PAT kot pDKP pri obeh pogojih (30°C/65 % RV in 40°C/75 % RV). To nam potrjuje tudi graf 1.



Graf 1: Naraščanje razpadnih snovi PE v zmesi z MCC na zaprtih pogojih pri 40° C in 75 % RV. (ESTD (%) – odstotek razpada preračunan na zunanji standard).

Po drugi strani pa lahko ugotovimo, da je razpad PE v prisotnosti ostalih MCC bistveno počasnejši kot v zmesi z MCC PH 105. To je najbolj vidno pri zmesi z MCC PH 200, še posebno pri najbolj stresnem pogojju (40°C/75 % RV) (histogram 1, graf 1).

Odpri pogoji

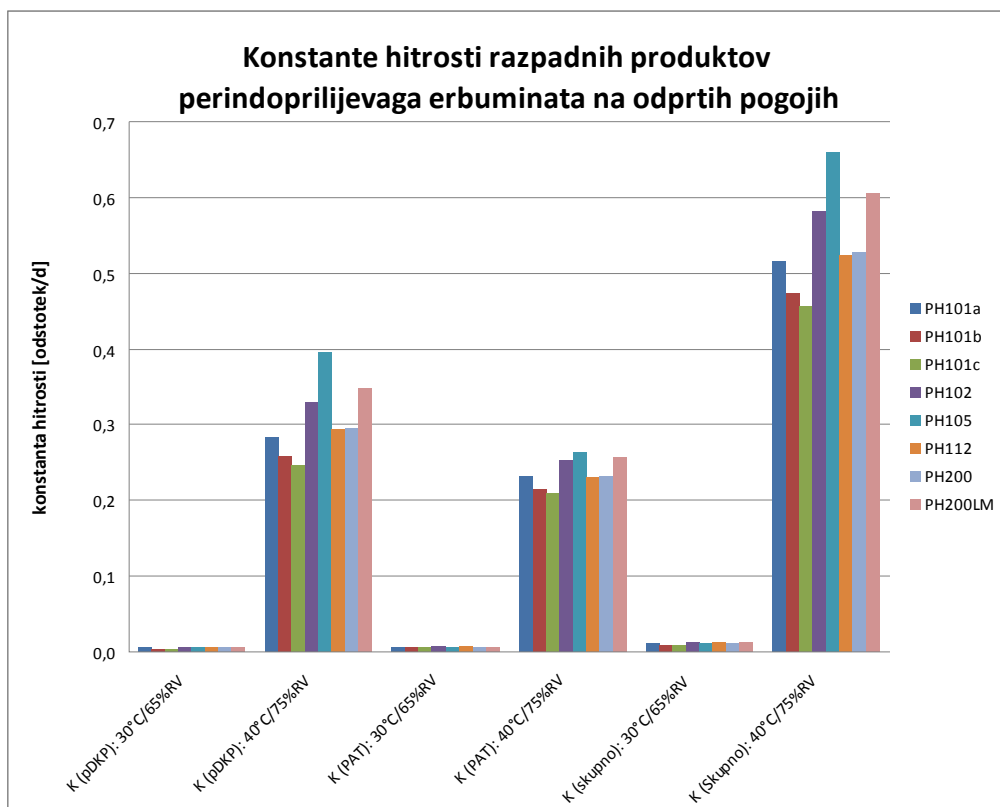
Če primerjamo odprte in zaprte pogoje, ugotovimo, da je razpad tako v smeri hidroliznega produkta kot v smeri ciklizacije bistveno hitrejši na odprtih pogojih kot zaprtih.

Za analizo razpada PE na odprtih pogojih so rezultati predstavljeni s konstantami hitrosti razpada po posameznih razpadnih produktih, ki so navedeni v tabeli 8 in

predstavljeni v histogramu 2.

Če primerjamo med seboj rezultate razpada pri vzorcih na odprtih pogojih (30°C/65 % RV in 40°C/75 % RV), ni velikih razlik med posameznimi zmesmi v nastajanju PAT in pDKP (tabela 8, histogram 2). Na odprtih pogojih 40°C/75 % RV postanejo razlike v stabilnosti učinkovine izrazitejše. PE je v zmesi z Avicelom PH 105 najmanj stabilen, nekoliko stabilnejša je učinkovina v zmesi z MCC PH200 LM in PH102, kar velja tako za nastanek pDKP kot PAT. V splošnem so najbolj stabilne zmesi s PH 101 tako glede pDKP kot PAT.

Vrste PH 101 na odprtih pogojih se na prvi pogled nekoliko bolj razlikujejo med seboj kot pri zaprtih pogojih, vendar statistična analiza pokaže, da so na odprtih pogojih 40°C/75 % RV konstante hitrosti statistično približno enake.



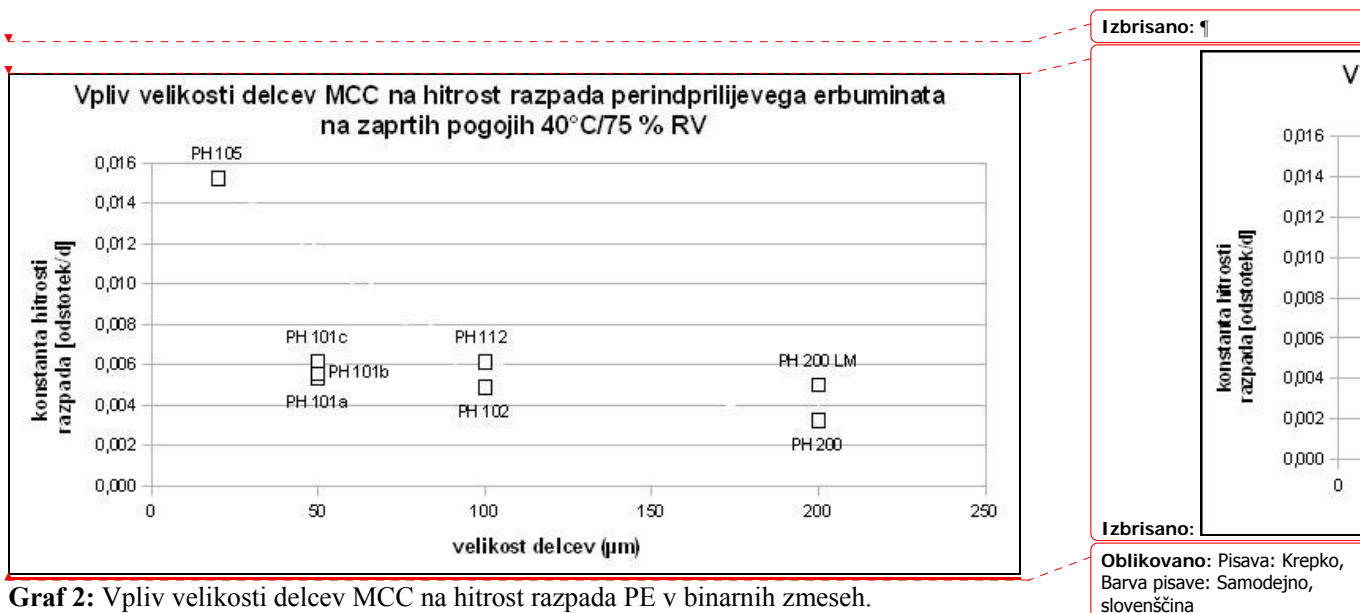
Histogram 2: Prikaz konstant hitrosti razpada PE v binarnih zmesih z MCC na odprtih pogojih; ločeno po razpadnih produktih in vrstah MCC.

4.4.2 Razprava o vplivu vlage, pH in velikosti delcev MCC na stabilnost PE

Velikost delcev

Vzroke za izstopanje PE v zmesi PH 105 na zaprtih pogojih smo iskali v lastnosti MCC, ki se najbolj razlikuje od ostalih predvsem glede velikosti delcev (graf 2). Avicel PH 105 ima najmanjše delce (20 μm) od vseh testiranih MCC, Avicel PH 200 ima največje delce (200 μm). Pri slednjem je hitrost hidrolize in ciklizacije najmanjša. Specifična površina se z zmanjšanjem delcev povečuje, kar poveča površino stika med PE in MCC, po drugi strani pa ima Avicel PH 105 tudi največji delež vlage (5,0 %). Z veliko verjetnostjo predvidevamo, da prav oba omenjena faktorja ključno vplivata na pospešeno reakcijo hidrolize in ciklizacije.

Iz grafa 2 je opaziti, da je z zmanjševanjem delcev MCC od 200 μm do 50 μm naraščanje razpadnih produktov enakomerno, pri manjših delcih pa opazimo velik porast v hitrosti razpada.



Graf 2: Vpliv velikosti delcev MCC na hitrost razpada PE v binarnih zmesih.

Vpliv vlage

Pri zaprtih pogojih moramo upoštevati, da je pri razpadu PE na razpolago le voda, ki se nahaja predvsem v MCC. Na odprtem pogoju pa je vlaga, ki se nahaja v sami binarni formulaciji, v primerjavi z zunanjo vlago (predvsem pri bolj vlažnem pogoju 40°C/75 % RV) zanemarljiva in igra ključno vlogo predvsem vlaga iz zraka. Lahko rečemo, da se v tem primeru razlike med MCC pri odprtih pogojih nekako zakrijejo, saj prevladuje zunanja vlaga. Na osnovi omenjenih dejstev si lahko pojasnimo, zakaj je pri zaprtem pogoju prisotne vode za izrazitejšo hidrolizo premalo, za razliko od odprtega pogoja, kjer je vlage dovolj, da je hidroliza pospešena. Nadalje je pri zaprtem pogoju razvidno, da se s povišanjem T s 30°C na 40°C hidroliza le rahlo poveča, z izjemo zmesi MCC PH 105, ki ima za razliko od ostalih prisotne največ vlage in zaradi majmanjših delcev tudi največjo površino.

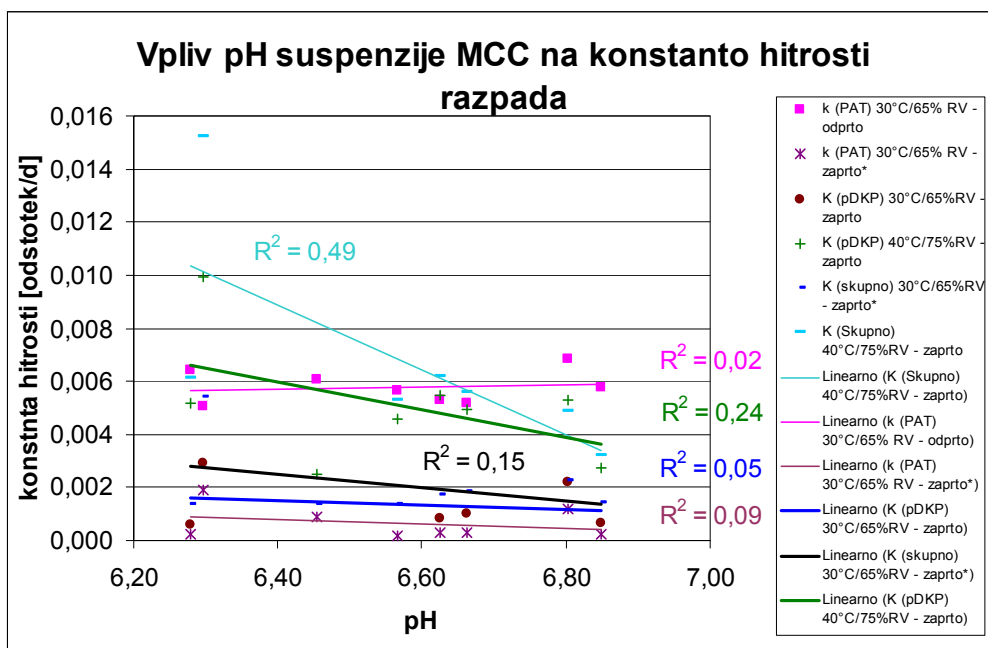
Pri zaprtem pogoju in to predvsem pri višji T na pogoju 40°C/75 % RV je za razliko od hidrolize favorizirana predvsem ciklizacija. Le-ta je prvenstveno odvisna od povišane T, od vode pa tudi, vendar manj. Upoštevati moramo La Chatelierjev princip, saj nastala voda na strani produktov potiska reakcijo v nasprotno stran in v bistvu zavira nastanek DKP (slika 2).

Razmerje konstant hitrosti na odprtih pogojih za hidrolizni in ciklizijski produkt je okrog 1. Pri 30°C/65 % RV hitreje nastaja PAT (razmerje > 1), pri 40°C/75 % RV pa hitreje nastaja pDKP v primerjavi s PAT (razmerje < 1). Povezava vpliva vlage na hitrost nastajanja produkta ciklizacije (pDKP) na zaprtih pogojih je šibka; pri 30°C je $R^2 = 0,68$, pri 40°C je $R^2 = 0,55$. Za nastajanje pDKP je pomembna predvsem povišana T tako za zaprte kot odprte pogoje.

Vpliv pH

Vpliv pH na hitrost hidrolize ali tvorbo pDKP pri PE v suspenzijah z MCC ne opazimo oz. je neznačilen. Povezave niso linearne, vendar se pri različnih pogojih opazi rahel trend padanja konstante hitrosti razpada z višanjem pH.

Rahlo večanje konstante hitrosti razpada pri bolj kislih pH je komaj opazno in statistično neznačilno (graf 3).



Graf 3: Vpliv pH na stabilnost PE v binarnih zmeseh.

Statistična analiza

Statistična analiza kot podporno orodje pri vrednotenju rezultatov nam je subjektivne ocene razlik v stabilnosti predstavila v novi perspektivi. Kljub temu moramo biti zmerno kritični do rezultatov, saj ima tudi ta metoda nekatere pomanjkljivosti.

Statistične analize nam razkrijejo, da v večini primerov dokažemo razlike v hitrosti hidrolize in ciklizacije med zmesmi PE z MCC pri statističnem tveganju $\alpha = 0,25$. p skupaj za različne vrste MCC je manjše od 0,25 (tabela 9). Različnost med zmesmi dokažemo za polovico pogojev. Na zaprtem pogoju 30°C/65 % RV so podatki nelinearni, na odprtem pogoju 40°C/75 % RV pa so vzorci statistično enaki (tabela 9).

Če primerjamo samo različne serije PH 101 med seboj (p med PH101), pa se pokaže enakost samo na odprtih pogojih pri 40°C in 75 % RV (PET in pDKP), pri dveh testih je p vrednost na meji (0,22 in 0,23), pri preostalih pa so statistične razlike že večje. Podobno je za združene razpadne produkte (tabela 9).

Zaključimo torej, da so vplivi različnih vrst MCC na stabilnost PE značilno različni. Vpliv na stabilnost različnih serij iste vrste MCC pa je bolj ali manj enak pri tveganju 0,25. Če bi znižali nivo tveganja (npr. $p = 0,10$), bi lahko za tako tveganje rekli, da imajo Aviceli PH 101 različnih serij približno enak vpliv na stabilnost.

Tabela 9: Primerjava konstant hitrosti razpada PE v binarnih zmesih z različnimi MCC. Podatki za p vrednost so predstavljeni ločeno po pogojih in razpadnem produktu. Manjša vrednost p nakazuje večje razlike med zmesmi. Nekatere podatke smo izločili, ker niso bili izpolnjeni pogoji linearnosti.

PE + MCC				
pogoj	30°C/65% RV zaprto	30°C/65% RV odprto	40°C/75% RV zaprto	40°C/75% RV odprto
PAT				
p med PH101		0,07	0,23	0,6
p skupaj		< 0,001	< 0,001	0,54
pDKP				
p med PH101	0,22	< 0,001	0,08	0,98
p skupaj	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,24
Razpadni prod. skupaj				
p med PH101		0,01	0,14	0,99
p skupaj		< 0,001	< 0,001	0,32

p med PH101: p vrednosti pri primerjavi binarnih zmesi med EM in tremi serijami Avicela PH 101
 p skupaj: p vrednosti pri primerjavi vseh osmih binarnih zmesi med EM in različnimi Aviceli

4.4.3 Stabilnostni rezultati za zmesi z EM

Podobno kot pri analizah PE smo tudi za zmesi z EM pridobili veliko podatkov, ki so predstavljeni v tabeli 10.

Izbrisano: ¶

Oblikovano: Označevanje in oblikovanje

Izbrisano: ¶

Tabela 10: Rezultati razpadnih produktov stresnega in pospešenega testiranja binarnih zmesi EM z različnimi vrstami oziroma serijami MCC

	EM + PH 101 _a			EM + PH 101 _b			EM + PH 101 _c			EM + PH 102		
	ET (%)	eDKP (%)	skupno (%)	ET (%)	eDKP (%)	skupno (%)	ET (%)	eDKP (%)	skupno (%)	ET (%)	eDKP (%)	skupno (%)
začetna	0,04	0,03	0,06	0,04	0,03	0,07	0,04	0,03	0,07	0,04	0,03	0,07

Izbrisano: Rezultati so predstavljeni z deležem razpada (%).

Izbrisano: ¶

Izbrisano: S

Izbrisano: S

Izbrisano: S

Izbrisano: S

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

30°C/65%RH - odprto

4d	0,05	0,05	0,10	0,04	0,05	0,09	0,05	0,05	0,10	0,05	0,06	0,11
7d	0,06	0,08	0,13	0,06	0,07	0,13	0,05	0,08	0,13	0,06	0,09	0,15
14d	0,07	0,13	0,21	0,08	0,13	0,21	0,07	0,13	0,21	0,08	0,16	0,24
1m	0,12	0,28	0,41	0,12	0,27	0,40	0,13	0,27	0,40	0,14	0,32	0,46
2m	0,21	0,57	0,77	0,20	0,54	0,74	0,20	0,54	0,74	0,24	0,64	0,88
3m	0,28	0,85	1,13	0,28	0,81	1,09	0,27	0,84	1,11	0,31	0,94	1,25
R ²	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
naklon	0,003	0,010	0,013	0,003	0,009	0,012	0,003	0,010	0,013	0,003	0,011	0,014

30°C/65%RH - zaprto

1m	0,10	0,24	0,35	0,07	0,14	0,21	0,10	0,23	0,33	0,09	0,23	0,31
2m	0,07	0,21	0,28	0,16	0,45	0,60	0,13	0,38	0,51	0,21	0,63	0,84
3m	0,19	0,64	0,84	0,19	0,64	0,83	0,19	0,64	0,83	0,23	0,82	1,05
R ²	1,00	1,00	1,00	0,94	0,96	0,96	0,99	0,99	0,99	0,92	0,97	0,96
naklon	0,002	0,007	0,009	0,002	0,008	0,010	0,002	0,007	0,009	0,003	0,010	0,013

40°C/75%RH - odprto

4d	0,11	0,29	0,40	0,11	0,27	0,38	0,11	0,28	0,39	0,11	0,31	0,42
7d	0,16	0,52	0,68	0,16	0,50	0,66	0,17	0,53	0,69	0,17	0,56	0,73
14d	0,28	1,06	1,33	0,30	1,03	1,33	0,27	1,03	1,30	0,27	1,05	1,33
1m	0,47	1,85	2,32	0,46	1,61	2,07	0,43	1,61	2,24	0,48	2,03	2,51
R ²	0,99	0,99	0,99	0,97	0,97	0,96	0,98	0,96	0,99	0,99	1,00	1,00
naklon	0,01	0,06	0,07	0,01	0,05	0,06	0,01	0,05	0,07	0,01	0,06	0,08

40°C/75%RH - zaprto

14d	0,18	0,68	0,86	0,17	0,58	0,75	0,16	0,61	0,78	0,20	0,78	0,98
1m	0,18	1,10	1,28	0,20	0,88	1,08	0,38	1,64	2,02	0,29	1,54	1,83
2m	0,39	1,83	2,22	0,46	1,75	2,21	0,42	1,97	2,41	0,45	2,11	2,56
3m	0,52	2,47	2,99	0,50	2,17	2,67	0,44	2,31	2,75	0,55	2,72	3,27
R ²	0,97	0,99	0,99	0,94	0,98	0,97	0,98	0,88	0,87	0,97	0,96	0,96
naklon	0,01	0,03	0,03	0,01	0,03	0,03	0,004	0,03	0,03	0,01	0,03	0,04

Legenda oznak: na naslednji strani

Izbrisano: ¶

Oblikovano: Pisava: 11 pt

Izbrisano:

Tabela 10 - nadaljevanje: Rezultati razpadnih produktov stresnega in pospešenega testiranja binarnih zmesi EM z različnimi vrstami oziroma serijami MCC.

	EM + PH 105			EM + PH 112			EM + PH 200			EM + PH200LM		
	ET (%)	eDKP (%)	skupno (%)	ET (%)	eDKP (%)	skupno (%)	ET (%)	eDKP (%)	skupno (%)	ET (%)	eDKP (%)	skupno (%)
začetna	0,04	0,03	0,07	0,04	0,03	0,07	0,04	0,03	0,06	0,04	0,03	0,06
30° C/65%RH - odprto												
4d	0,04	0,04	0,08	0,04	0,05	0,09	0,05	0,06	0,11	0,05	0,06	0,11
7d	0,05	0,06	0,11	0,05	0,08	0,13	0,06	0,10	0,16	0,06	0,10	0,16
14d	0,07	0,11	0,18	0,07	0,13	0,20	0,09	0,18	0,27	0,09	0,18	0,27
1m	0,11	0,25	0,37	0,12	0,28	0,40	0,16	0,37	0,53	0,16	0,38	0,54
2m	0,18	0,55	0,73	0,19	0,52	0,71	0,26	0,71	0,97	0,25	0,72	0,97
3m	0,23	0,84	1,08	0,26	0,82	1,08	0,35	1,08	1,43	0,31	1,05	1,36
R ²	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,98	1,00	1,00
naklon	0,002	0,010	0,012	0,003	0,009	0,012	0,004	0,013	0,016	0,003	0,012	0,016
30°C/65%RH - zaprto												
1m	0,08	0,14	0,22	0,07	0,16	0,23	0,13	0,36	0,49	0,06	0,15	0,21
2m	0,15	0,42	0,56	0,11	0,32	0,42	0,13	0,52	0,66	0,09	0,43	0,52
3m	0,19	0,69	0,88	0,19	0,65	0,84	0,18	0,81	0,98	0,15	0,76	0,91
R ²	0,98	0,96	0,96	0,93	0,94	0,94	1,00	0,99	0,99	0,95	0,95	0,95
naklon	0,002	0,008	0,010	0,002	0,007	0,009	0,002	0,009	0,011	0,001	0,009	0,010
40°C/75%RH - odprto												
4d	0,10	0,24	0,34	0,09	0,23	0,32	0,13	0,36	0,48	0,11	0,34	0,45
7d	0,14	0,45	0,60	0,13	0,41	0,54	0,19	0,66	0,85	0,17	0,57	0,73
14d	0,25	0,93	1,18	0,21	0,81	1,03	0,30	1,17	1,47	0,27	1,08	1,35
1m	0,39	1,79	2,18	0,35	1,36	1,70	0,50	2,13	2,63	0,43	1,94	2,36
R ²	0,97	1,00	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,99	1,00	0,97	0,99	0,99
naklon	0,01	0,06	0,07	0,01	0,04	0,05	0,01	0,07	0,08	0,01	0,06	0,07
40°C/75%RH - zaprto												
14d	0,16	0,58	0,74	0,12	0,47	0,59	0,10	0,59	0,69	0,11	0,58	0,70
1m	0,19	1,18	1,37	0,14	0,91	1,05	0,27	1,72	1,98	0,20	1,47	1,68
2m	0,30	1,92	2,21	0,41	1,63	2,04	0,14	2,17	2,28	0,43	2,21	2,65
3m	0,44	2,45	2,88	0,44	2,00	2,44	0,34	2,74	3,09	0,41	2,53	2,93
R ²	0,98	0,98	0,99	0,98	0,98	0,98	1,00	0,93	0,93	0,88	0,94	0,93
naklon	0,00	0,03	0,03	0,00	0,02	0,03	0,00	0,03	0,04	0,00	0,03	0,04

ET: enalprilat

eDKP: diketopiperazin

skupaj: enalprilat + diketopiperazin

d: dan

m: mesec

R²: determinacijski koeficient

naklon: konstanta hitrosti; enote: odstotek razpada/dan (d⁻¹)

a: serija UD3829, b: serija UD 3158, c: serija UD 3159

osenčeni rezultati: izvzeti iz izračunov

Izbrisano: Rezultati so predstavljeni z deležem razpada (%).

Izbrisano: S

Izbrisano: S

Izbrisano: S

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Izbrisano: S

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Oblikovano: Pisava: 9 pt

Zaprta pogoja

Zaradi nekonsistentnosti rezultatov zmesi MCC z EM v zaprtih vialah (tabela 10), ki so v primerjavi z zmesmi s PE kazale visok razpad in tudi na osnovi podatkov, pridobljenih v literaturi (21, 24), smo zaključili, da je moralo priti pri pripravi vzorcev MCC z EM do neke sistemske, eksperimentalne napake. Po natančnem pregledu vseh faz dela smo ugotovili, da gumijasti pokrovčki niso dovolj tesnili nekaterih vial z zmesmi na zaprtih pogojih. Posledica tega so bili višji pa tudi slabo ponovljivi in nelinearni rezultati, ki niso odražali pravega stanja hitrosti razpada na zaprtih pogojih (tabela 10).

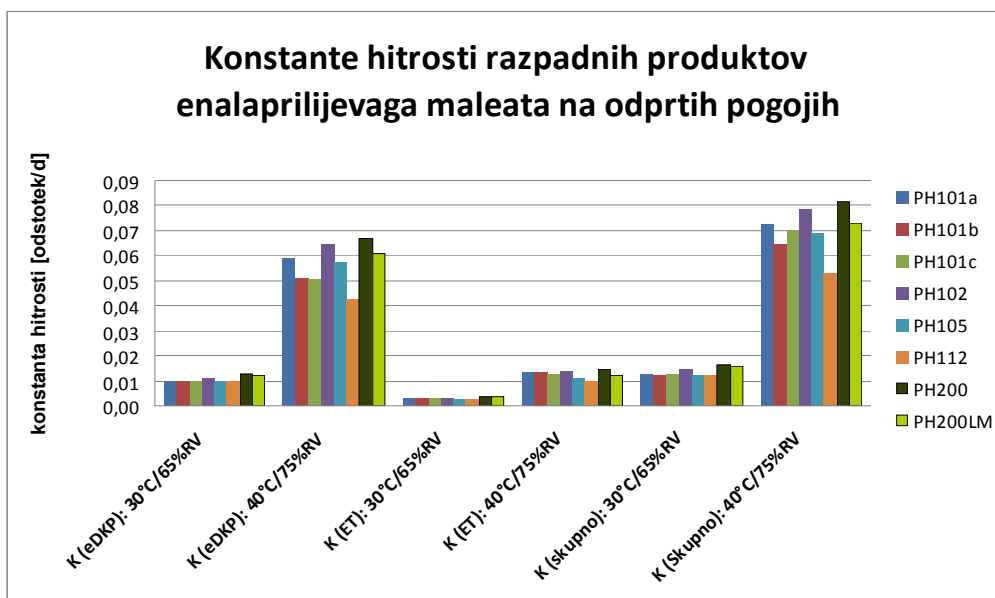
Zaradi zgoraj navedene ugotovitve se bomo osredotočili le na odprte pogoje stresnega testiranja EM.

Odprta pogoja

Podatki iz literature (21) in tudi naši poskusi so potrdili, da je PE manj stabilen kot EM. To je evidentno pri odprtih pogojih, kjer PE hitreje razpada kot EM.

Na histogramu 3 so predstavljene konstante hitrosti razpada EM pri 30°C/65 % RV in 40°C/75 % RV na odprtem pogoju.

Iz primerjave vseh rezultatov je razvidno, da je bil pri EM na obeh odprtih pogojih (30°C/65 % RV in 40°C/75 % RV) favoriziran predvsem razpad v smeri ciklizacije, manj pa v smeri hidrolize (histogram 3). Pri EM sta nastajala oba razpadna produkta skupaj neprimerljivo počasneje (za približno faktor 10-krat) kot pri PE pod enakimi pogoji (histogramom 2 in 3). V primerjavi s podatki razpada PE je razmerje hitrosti nastanka eDKP v primerjavi z nastankom hidroliznega produkta (ET) večje kot pri PE pod enakimi pogoji (histogramom 2, 3). To nam kaže na precejšnjo razliko v kinetiki razpada obeh testiranih učinkovin (histogram 1, 2, 3).



a: serija UD3829, b: serija UD 3158, c: serija UD 3159

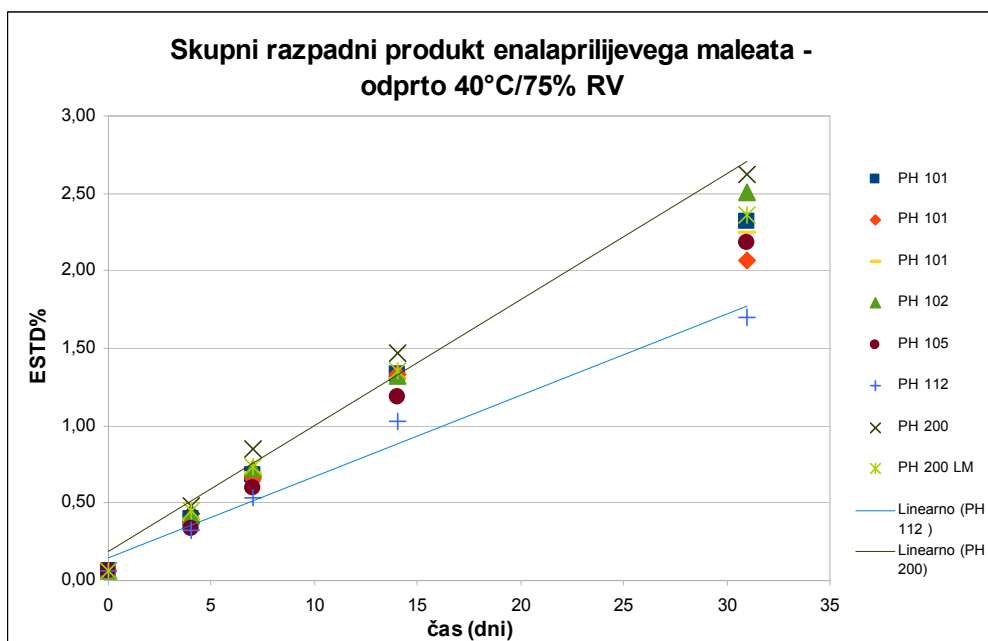
Histogram 3: Konstante hitrosti razpada EM z različnimi MCC ločeno po pogojih - odprtih in po posameznih razpadnih produktih (ET, eDKP) in skupnih razpadnih produktih (ET+eDKP).

Na odprtih pogojih pri 30°C in 65 % RV razlik med stabilnostjo posameznih zmesi ET z MCC ni opaziti.

Na ostrejših odprtih pogojih (40°C/75 % RV) je najstabilnejša zmes s PH 112, kjer je izrazito zavrt ciklizacijski razpad, obratno pa Avicel PH 200 in PH 102 ciklizacijo rahlo pospešujeta, stabilnost je slabša.

Podrobnejša analiza rezultatov nastanka razpadnih produktov za odprte pogoje na 40°C/75 % RV pokaže (graf 4), da razen PH 112 nobena MCC izrazito ne vpliva na spremembo stabilnosti učinkovine. Opazimo, da je naklon premice najmanjši pri PH 112, kar pomeni, da je EM najstabilnejši v zmesi z Avicelom PH 112, ostali nakloni pa so rahlo višji in bolj po skupinah (graf 4).

Razlik v stabilnosti EM med različnimi serijami znotraj PH 101, kakor tudi med različnimi vrstami z izjemo Avicela PH 112 ni zaznati oziroma so malenkostne in iz eksperimentalnega in statističnega vidika nepomembne.



Graf 4: Primerjava naklonov (konstant hitrosti) med najstabilnejšo zmesjo s PH 112 in manj stabilnimi zmesmi na odprtih pogojih pri 40° C/75 % RV. (ESTD (%) – odstotek razpada preračunan na zunanji standard).

4.4.4 Razprava o vplivu vlage, pH in velikosti delcev MCC na stabilnost EM

Vpliv vlage

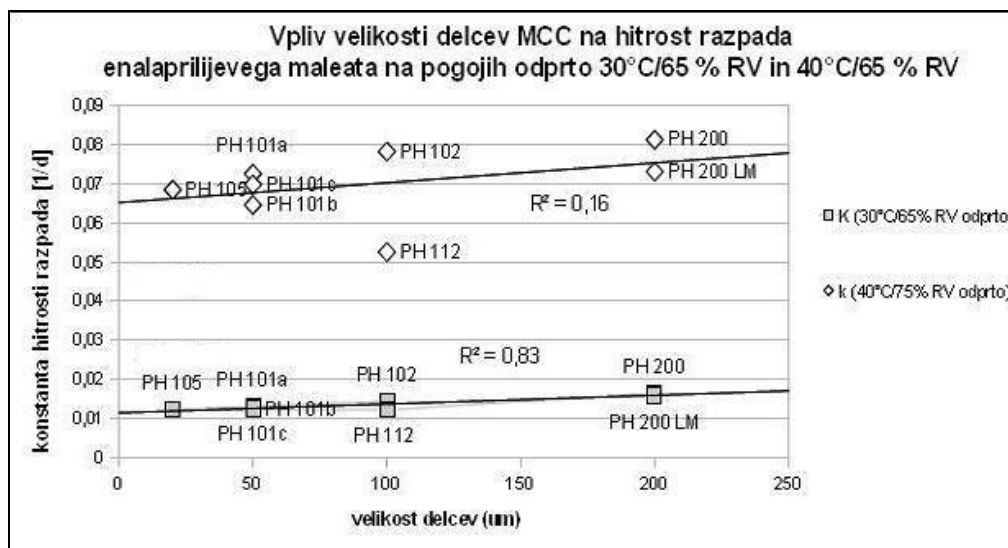
Hitrost hidrolize, ki je najbolj odvisna od prisotnosti vlage, poteka pri EM za razliko od PE izjemno počasi. Ne glede na to pa ima vpliv povišanja vlage za 10 % (od 65 % RV na 75 % RV) in istočasno povišanja T za 10°C (s 30°C na 40°C) tudi pri EM vpliv na relativno povečanje hitrosti hidrolize v ET (za približno 3 krat), absolutne vrednosti razpadnih produktov (ET) pa ostajajo majhne.

Čeprav zaprtih vzorcev ne moremo smatrati za ustrezno zaprte, ampak le kot »delno zaprte«, pa tudi rezultati teh vzorcev (tabela 10) kažejo na povsem podobno sliko kot pri odprtih vzorcih. Razlika je le v tem, da je hitrost nastanka razpadnih produktov tako za ET kot tudi za eDKP samo nekoliko upočasnjena v primerjavi z odprtimi vzorci.

Vpliv velikosti delcev

Vpliv velikosti delcev MCC na odprtih pogojih je prikazan na *grafu 5*. Iz grafa razberemo, da MCC z večjimi delci minimalno povečajo hitrost reakcije, oz. ocenjujemo, da je velikost delcev zanemarljiva.

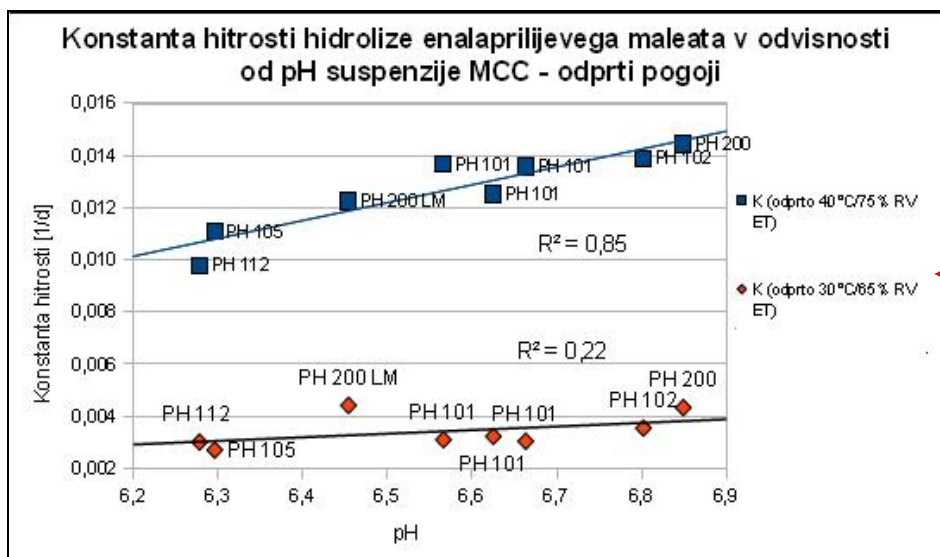
Linearno ujemanje med hitrostjo razpadanja in velikostjo delcev je boljše pri nižjih T in nižji zunanji vlažnosti ($R^2 = 0,83$).



Graf 5: Vpliv velikosti delcev MCC v binarnih zmesih na hitrost razpada EM na odprtih pogojih.

Vpliv pH

Preverili smo tudi vpliv pH na razpad EM v binarnih zmesih z MCC. Ugotovili smo dobro ujemanje med pH suspenzije MCC in hitrostjo nastajanja ET na odprtih pogojih (graf 6). Odvisnost hitrosti hidrolize od pH v vodni raztopini so dokazali že Roškar in sodelavci (21). Literaturni podatki nakazujejo na večji delež hidrolizne razpadne poti v primerjavi s ciklizacijo v alkalnih medijih. Tudi v naših poizkusih se kaže trend naraščanja hitrosti hidrolize z višanjem pH.



Oblikovano: Telo besedila,
Zamik: Prva vrstica: 35,45 pt,
Razmik vrstic: 1,5 vrstice

Izbrisano: ¶

Graf 6: Vpliv pH na hitrost hidrolize EM v binarni zmesi z MCC do ET pri različnih pogojih (30°C/65 % RV in 40°C/75 % RV)

Statistična analiza

Rezultate konstant hitrosti smo statistično obdelali. Kot pomožno orodje pri vrednotenju rezultatov smo uporabili metodo, opisano v uvodu. Rezultate smo zbrali v tabeli 11.

Tabela 11: Primerjava konstant hitrosti razpada EM v binarnih zmesih z MCC. Podatki za p vrednost so predstavljeni ločeno po pogojih in razpadnem produktu.. Če je $p < 0,25$, so zmesi značilno različne. Pri zaprtih pogojih so podatki nezanesljivi (označeno s sivo).

EM + MCC				
pogoj	30°C/65% RV zaprto	30°C/65% RV odprto	40°C/75% RV zaprto	40°C/75% RV odprto
ET:				
p med PH101	0,9	0,32	0,56	0,76
p skupaj	0,36	< 0,001	0,38	0,08
eDKP:				
p med PH101	0,9	0,15	0,87	0,48
p skupaj	0,53	< 0,001	0,76	0,01
razpadni prod. skupaj:				
p med PH101	0,89	0,32	0,76	0,63
p skupaj	0,63	< 0,001	0,92	0,02

p med PH101: p vrednosti pri primerjavi binarnih zmesi med EM in tremi serijami Avicela PH 101

p skupaj: p vrednosti pri primerjavi vseh osmih binarnih zmesi med EM in različnimi Aviceli

Pri odprtih vzorcih na 30°C/65 % RV so razlike zmesi signifikantno različne ($p < 0,25$). Zmesi z Avicelom PH 101 različnih serij so med seboj homogene ($p > 0,25$), če opazujemo porast ET in obeh razpadnih produktov skupaj. Na pogojih 40°C/75 % RV odprto so ne glede na razpadni produkt vse zmesi med seboj različne. Če analiziramo samo vrsto PH 101 različnih serij, so vplivi na stabilnost enaki (homogenost naklonov).

Podatki za zaprte pogoje niso zanesljivi, zato teh rezultatov ne bomo komentirali. Omenimo lahko, da se pri zaprtih pogojih opazi eno lastnost statistične metode; če obdelujemo manj natančne podatke, jih statistična metoda prej prepozna kot homogene (tabela 11, zaprti pogoji).

5 SKLEPI

Rezultati kažejo, da je vpliv na stabilnost PE in EM posledica kombinacije lastnosti učinkovine, lastnosti MCC in pogojev, ki jim je zmes izpostavljena. Nekatere lastnosti pomožnih snovi pa lahko delujejo tudi sinergistično. Pri različnih vrstah MCC smo iskali vzroke razlik v treh lastnostih; deležu vode v MCC, velikosti delcev in pH suspenzij MCC v vodi.

Ugotovili smo, da so pri PE glavni dejavniki destabilizacije zmanjšanje velikosti delcev MCC, povečana vlažnost in povišana T, ki stimulira predvsem razpad v smeri ciklizacije (porast pDKP). Hidroliza v PAT poteka bistveno počasneje. pH MCC v zmesi ni izkazal pomembnega vpliva na stabilnost PE.

Pri EM sta celokupni razpad pospeševali višja relativna vlažnost in povišana T. Primarni razpad je nastajal v smeri ciklizacije (povišan eDKP). Opazili smo, da je MCC z rahlo višjim pH pospeševala hidrolizo v ET. Velikost delcev MCC ni imela vpliva na stabilnost EM.

Na zaprtih pogojih pri 40°C/75 % RV in 30°C/65 % RV smo testiranja zmesi opravili z namenom, da bi dobili informacijo o stabilnosti binarnih zmesi le zaradi vpliva lastnosti samih MCC in povišane T ter ob izključitvi zunanje vlage. Ugotovili smo, da je PE z Avicel PH 200 najstabilnejši, z Avicelom PH 105 pa najmanj. To se je veliko bolj videlo pri zaprtem pogoju kot pri odprtem. Pri EM smo poskuse z zaprtimi vialami izključili iz podrobnejše obravnave, ker viale niso bile dovolj zrakotesno zaprte. Kljub vsemu pa lahko ocenimo, da bistvenih razlik glede razpada med zaprtimi in odprtimi vialami pri EM ni bilo.

Na odprtih pogojih je s stališča stabilnosti PE najustreznejši Avicel PH 101. Avicel PH 105 pa se je prav tako kot pri zaprtih pogojih izkazal za neustreznega. V zvezi z zaprtimi in odprtimi pogoji zaključujemo, da bi se pri pripravi formulacij PE z MCC izogibali predvsem uporabi Avicela PH 105.

Za stabilizacijo EM v formulaciji bi na podlagi rezultatov testiranj na odprtih pogojih izbrali Avicel PH 112, izogibali pa bi se uporabi Avicela PH 200 in PH 102.

V večini primerov smo potrdili, da obstajajo razlike med različnimi vrstami MCC na vpliv stabilnosti PE in EM. Med različnimi serijami MCC iste vrste pa nismo opazili razlik v stabilnosti PE in EM v binarni zmesi.

Potrdili smo, da je PE bistveno manj stabilen kot EM. Poleg tega pa smo pokazali, da so s funkcionalnostjo povezane lastnosti MCC (FRC) lahko poleg splošnega vpliva na tehnološke procese pomembne tudi za samo stabilnost in s tem kakovost končnega izdelka do roka uporabnosti.

S praktičnim primerom smo pokazali smiselnost testiranja binarnih mešanic, kjer se osredotočimo samo na vpliv ene komponente. V nasprotju s testiranjem formulacije, ki ima večje število komponent (pomožnih snovi), lahko prej najdemo vzrok za neustrezno stabilnost.

Dokazali smo tudi, da ne moremo posploševati rezultatov vpliva ene vrste MCC na stabilnost obeh učinkovin, pa čeprav imata učinkovini zelo podobno strukturo in pripadata isti farmakološki skupini učinkovin.

6 LITERATURA

1. Huynh-Ba K: Handbook of Stability testing in pharmaceutical development – regulations, methodologies and best practice, Springer, 2009
2. Carstensen JT, Rhodes CT: Drug stability – principles and practices, 3rd edition, New York, 2000
3. International conference on harmonisation of technical Requirements for registration of pharmaceuticals for human use, stability testing of new drug substance and products – Q1A (R2)
4. Crowley JP: Excipients as stabilizers. *Pharmaceutical science & technology today* 1999; 2, no. 6: 237–43
5. Yoshioka S, Stella VJ: *Stability of Drugs and Dosage Forms*, New York, 2000
6. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances, Q6A (R2)
7. Rowe CR, Sheskey JP, Quinn EM: *Pharmaceutical excipients*, Pharmaceutical press and american pharmacists association, 2009
8. European Pharmacopoeia 6.3, Cellulose, microcrystalline, str. 4080–4084
9. Aulton AE: *Aulton's pharmaceuticals: the design and manufacture of medicines*, third edition, 2007
10. FMC Biopolymere: dostopno na <http://www.fmcbiopolymer.com> (11.6.2010)
11. Baumgartner S: Pomožne snovi in njihove s funkcionalnostjo povezane lastnosti (FRC). Strokovno posvetovanje ob predstavitvi tretjega dopnila k drugi izdaji Formulariuma Slovenicuma (FS 2.3), 2008
12. Augsburger LL, Hoag WS: *Pharmaceutical dosage forms: tablets*, third edition, vol. 2 – Rational design and formulation, New York, 2008
13. Ruszkay TA, Elliott D: Microcrystalline cellulose, a bulking agent. United states patent, patent number 5,976,600, date of patent nov. 2, 1999
14. Thoorens G: Avicel PH selection map, izročki FMC Biopolymer, str. 5
15. Perrier PR, Kesselring UW: Quantitative assessment of the effect of some excipient on nitrazepam stability in binary powder mixtures. *Journal of pharmaceutical sciences* 1983; 72: 1072–74
16. Mhryanyan A, Strømme M: Influence of cellulose powder structure on moisture-induced degradation of acetylsalicylic acid. *Eur. J. Pharm. Sci* 2006; 27: 220–25
17. Crowley P, Martini LG: Drug-excipient interactions. *Pharmaceutical technology Europe* 2001; 3: 1–6
18. Roškar R, Simončič Z, Gartner A, Kmetec V: Stability of new potential ACE inhibitor in the aqueous solutions of different pH. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 2009; 49: 295–303
19. Remko M: Molecular structure and stability of perindopril erbumine and perindopril L-arginine complexes. *European journal of medicinal chemistry* 2009; 44: 101–8

20. Simončič Z, Roškar R, Gartner A, Kogej K, Kmetec V: The use of microcalorimetry and HPLC for the determination of degradation kinetics and thermodynamics parameters of perindopril erbumine in aqueous solutions. *International journal of pharmaceuticals* 2008; 356: 200–5
21. Simončič Z, Zupančič P, Roškar R, Gartner A, Kogej K., Kmetec V: Use of microcalorimetry in determination of stability of enalapril maleate and enalapril maleate tablet formulations. *International journal of pharmaceuticals* 2007; 342: 145–51
22. Lee CY, Sheth A, Miller JM: Estimation of intramolecular cyclization activation energies via isothermal gravimetric analysis: A technical note. *AAPS PharmSciTech* 2006; 3: E1-E4
23. Wang SL, Lin SY, Chen TF: Reaction kinetics of solid-state cyclization of enalapril maleate investigated by isothermal FT-IR microscope system. *Chem. Pharm. Bull* 2001; 49: 402–6
24. Damien G, Lefoulon F, Merchand B: Salt of perindopril and pharmaceutical compositions containing it. US patent US 6,676,481 B2, Feb. 24, 2004
25. Kovacic M, Husu-Kovacevic B: A pharmaceutical composition comprising perindopril. WIPO, WO 207/88035 A1, 9. August 2007
26. Kovacic M, Husu-Kovacevic B: Pharmaceutical composition comprising perindopril. US Patents, US 2010/0048509 A1, Feb. 25, 2010
27. Wang SL, Lin SY, Chen TF, Cheng WT: Eudragit E accelerated the diketopiperazine formation of enalapril maleate determined by thermal FTIR microspectroscopic technique. *Pharmaceutical research* 2004; 21; 2127–32
28. Delclos N, Aubert M, Bentejac R: Guide to the statistical analysis of long-term stability results: calculating predicted shelf-life and stability specifications. Report of an SFSTP Commission, *Pharma Pratiques*, 1994; 4: 91–107