

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ELENA ŠPORAR

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ INDUSTRIJSKE FARMACIJE

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ELENA ŠPORAR

**RAZVOJ MODELA ZA DOLOČANJE VELIKOSTI DELCEV
HIDROKSIPROPILMETILCELULOZE S SPEKTROSKOPIJO
BLIŽNJEGA INFRARDEČEGA OBMOČJA**

**DEVELOPING OF MODEL FOR DETERMINATION OF PARTICLE SIZE
HYDROXYPROPYL-METHYLCELLULOSE BY NEAR INFRARED
SPECTROSCOPY**

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo sem opravljala v laboratorijih tovarne Krka, d.d., v Službi za laboratorijsko kontrolo kakovosti, pod mentorstvom izr. prof. dr. Franca Vrečerja ter delovnim mentorstvom Sabine I Devjak Novak, mag. farm. Meritve laserske difrakcije in mikroskopiranje pa sem opravila na Fakulteti za farmacijo.

Zahvala

Za strokovno vodstvo in nasvete pri izdelavi magistrske naloge ter usmerjanju pri sodelovanju z industrijo, se iskreno zahvaljujem svojemu mentorju izr. prof. dr. Francu Vrečerju. Najlepša hvala tudi delovni mentorici Sabini Ivani Devjak Novak, mag. farm., ki je pokazala veliko dobre volje, podporo in usmerjanje pri mojem raziskovalnem delu.

Hvala tudi vsem, ki so prispevali marsikateri praktični nasvet in s tem pripomogli k boljšemu razumevanju tematike. Še posebej se zahvaljujem dr. Suzani Jus, ki je bila vedno pripravljena sodelovati in pomagati, ko je to bilo potrebno.

Za koristne nasvete in sodelovanje pri določanju velikosti delcev z lasersko difrakcijo se zahvaljujem tudi izr. prof. dr. Odonu Planinšku.

Navsezadnje se moram zahvaliti tudi družini, ki me je ves čas študija moralno podpirala in verjela vame.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Franca Vrečerja in delovne mentorice Sabine Devjak Novak, mag. farm.

KAZALO

POVZETEK	1
SEZNAM OKRAJŠAV	3
1 UVOD	4
1.1 SPROŠČANJE IZ PERORALNIH FARMACEVTSKIH OBLIK	4
1.1.1 FARMACEVTSKE OBLIKE S PODALJŠANIM SPROŠČANJEM	4
1.2 SPROŠČANJE IZ HIDROFILNIH OGRODNIH TABLET	5
1.2.1 POLIMERI ZA HIDROFILNE OGRODNE TABLETE	8
1.3 HIPROMELOZA	9
1.3.1 ODVISNOST KINETIKE SPROŠČANJA ZU OD LASTNOSTI OGRODJA	11
1.3.1.1 Vplivi povezani s polimerom kot tvorilcem ogrodja	11
1.3.1.2 Vplivi povezani z lastnostmi ostalih sestavin FO	17
1.4 PRISTOPI K NAPOVEDOVANJU KINETIKE SPROŠČANJA IZ HIDROFILNIH OGRODNIH TABLET	19
1.5 INFRADREČE (IR) OBMOČJE SPEKTRA	19
1.5.1 BLIŽNJA INFRARDEČA (NIR) SPEKTROMETRIJA	21
1.5.1.1 NIR instrument	22
1.5.1.2 Uporaba NIR	23
1.5.1.3 Prednosti / slabosti NIR	24
1.5.1.4 NIR-Chemical Imaging	26
1.5.2 DOLOČANJE VELIKOSTI DELCEV Z NIR SPEKTROSKOPIJO	26
2 NAMEN DELA	28
3 MATERIALI IN METODE	29
3.1 MATERIALI	29
3.1.1 VZORCI	29
3.1.2 REAGENTI	29
3.1.3 APARATURE ZA PRIPRAVO VZORCEV	29
3.1.4 NAPRAVE ZA ANALIZO	30
3.2 METODE	30
3.2.1 SEJALNA ANALIZA	30
3.2.2 NIR	31
3.2.2.1 Kemometrične metode za ocenjevanje podatkov – multivariantni kalibracijski modeli	32
3.2.2.2 Validacija modela	34
3.2.3 OPTIČNA MIKROSKOPIJA	35
3.2.4 LASERSKA DIFRAKCIJA	37
4 EKSPERIMENTALNO DELO	38
4.1 SEJALNA ANALIZA	38
4.1.1 POTEK DELA	38

4.2 NIR	38
4.2.1 POTEK DELA	38
4.3 OPTIČNA MIKROSKOPIJA	39
4.3.1 POTEK DELA	39
4.4 LASERSKA DIFRAKCIJA	39
4.4.1 POTEK DELA	39
5 REZULTATI IN RAZPRAVA	41
4.1 SEJALNA ANALIZA	41
4.2 LASERSKA DIFRAKCIJA	45
4.3 OPTIČNA MIKROSKOPIJA	46
4.4 NIR	50
6 SKLEP	57
7 LITERATURA	60
PRILOGE	65

POVZETEK

Razvoj farmacevtske industrije je v zadnjem času pripeljal do velikega napredka v načinu in možnostih zdravljenja različnih bolezni. Velik napredek so prinesle farmacevtske oblike, s podaljšanim sproščanjem zdravilne učinkovine, saj prinaša veliko prednosti tako za bolnika kot zdravnika. V magistrski nalogi se bomo osredotočili na pomožno snov za uravnavanje kinetike sproščanja – hidroksipropilmetilcelulozo, saj je le-ta eden najpogostejše uporabljenih polimerov v trdnih farmacevtskih oblikah s podaljšanim sproščanjem zdravilne učinkovine, hkrati pa je z njenimi lastnostmi povezana problematika njihovega sproščanja.

V literaturi smo zasledili, da velikost delcev polimera bistveno vpliva na kinetiko sproščanja zdravilne učinkovine iz ogrodnih sistemov, zato smo v našem delu želeli podrobneje proučiti možnost vrednotenja velikosti delcev z bližnjo infrardečo tehniko. Bližnja infrardeča spektroskopija je metoda, ki zagotavlja hitro, neinvazivno in cenovno ugodno rešitev za kvali-/kvantitativno vrednotenje različnih parametrov, s predpogojem, da imamo postavljen model. Naš cilj je bil tako postaviti model, ki bo z dobro napovedno močjo napovedal velikost delcev hidroksipropilmetilceluloze za posamezni tip substitucije ali stopnjo viskoznosti oz. neodvisno od obeh omenjenih lastnosti.

Za raziskavo smo uporabili serije hidroksipropilmetilceluloze substitucijskega tipa 2208 in 2910, ki se v farmacevtski industriji največ uporabljata za izdelavo hidrofilnih ogrodnih tablet. V prvi stopnji smo s pomočjo sejalne analize, vsako serijo ločili na posamezne frakcije velikosti delcev. Tem frakcijam smo v nadaljevanju s pomočjo bližnje infrardeče spektroskopije posneli spektre in z lasersko difrakcijo določili dejansko velikost delcev. S pomočjo programa Opus Quant 2 smo postavili kvantitativne modele z regresijo na osnovi vsote najmanjših kvadratov (*ang. Partial Least Squares*) ter kvalitativni model z metodo glavnih komponent (*ang. Principal Component Analysis*).

Rezultati, ki smo jih preko različnih kvantitativnih modelov dobili, nakazujejo velik potencial te tehnike, saj smo statistično gledano dobili modele z dobro napovedno močjo. Postavljeni modeli sicer niso toliko izpopolnjeni, da bi imeli dovolj veliko moč napovedovanja velikosti delcev v kvantitativne namene, so pa dober pokazatelj, da bi to lahko nekoč bili. Možnosti za optimizacijo tehnike je veliko (npr. boljši način separacije delcev po velikostnih razredih, večje število obdelanih serij), izsledki do katerih smo prišli pa kažejo velik potencial za implementacijo v in/on-line procese.

S kvalitativnim modelom smo pokazali, da se različna substitucijska tipa hidroksipropilmetilceluloze lepo ločita na dve populaciji. V primeru, da bi v modelu upoštevali tudi substitucijsko neustrezne serije, bi model lahko služil kot hitra kvalitativna metoda za izločitev substitucijsko neustrezne serije polimera.

SEZNAM OKRAJŠAV

Bias – povprečje odklonov med pravimi in napovedanimi vrednostmi
 c_{krit} – kritična koncentracija
 c_p – temperatura točke zamotnitve raztopine
D[4,3] – volumski povprečni premer
FT – Fourier-jeva transformacija
FDA – Ameriška agencija zadolžena za hrano in zdravila; *ang. Food and Drug Administration*
FO – farmacevtska oblika
HCMMA – hidroksipropilceluloznimetilmetakrilat
HPLC – visokotlačna tekočinska kromatografija; *ang. High pressure liquid chromatography*
HPMC – hidroksipropilmetilceluloza
IR – infrardeče
K, α – konstanti, odvisni od uporabljenega sistema polimer-topilo
M – molekulska masa polimera
m/m oz. m/v – masa na maso oziroma masa na volumen
MCC – mikrokristalna celuloza
MLR – multipla linearna regresija; *ang. Multiple linear regression*
[η] – intrinzična viskoznost
NIR – bližnja infrardeča (svetloba, spektroskopija); *ang. near-infrared*
NMR – nuklearna magnetna resonanca
PAS – površinsko aktivna snov
PAT – procesno analizna tehnologija
PC – glavna spremenljivka; *ang. Principal component*
PCA – metoda glavnih komponent; *ang. Principal component analysis*
PCR – regresija na osnovi glavnih komponent; *ang. Principal Component Regression*
PLS – regresija na osnovi vsote najmanjših kvadratov; *ang. Partial least squares*
® – registrirana blagovna znamka
 R^2 – determinacijski koeficient
RMSE(CV)/(P) – efektivna vrednost napake (navzkrižne validacije)/(napovedane vrednosti); *ang. Root mean square error (cross validation)/(prediction)*
RPD – »odklon ostankov pri napovedovanju«; *ang. Residual prediction deviation*
 T_g – temperatura steklastega prehoda
™ – blagovna znamka
UV-VIS – ultravijolično-vidno (področje elektromagnetnega spektra)
ZU – zdravilna učinkovina

1 UVOD

1.1 SPROŠČANJE IZ PERORALNIH FARMACEVTSKIH OBLIK

Farmacevtske oblike (FO) za peroralno uporabo razdelimo na (1):

- Farmacevtske oblike z takojšnjim sproščanjem (zdravilna učinkovina (ZU) se takoj po prihodu FO v želodec sprosti iz farmacevtske oblike (FO))
- Farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem (prirejena hitrost, mesto ali čas sproščanja ZU). Razdelimo jih na:
 - o *Farmacevtske oblike s podaljšanim sproščanjem* (omogočajo podaljšan čas sproščanja ZU)
 - o *Farmacevtske oblike z zakasnelim sproščanjem* (omogočajo začetek sproščanja po določenem času po zaužitju)
 - o *Farmacevtske oblike s pulzirajočim sproščanjem* (omogočajo sproščanje zdravilne učinkovine v določenih časovnih presledkih)

Za farmacevtsko industrijo predstavljajo izziv predvsem farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem, kjer je potrebno na ustrezen način ZU zadržati daljši čas, znotraj FO. V nadaljevanju se bomo osredotočili predvsem na farmacevtske oblike s podaljšanim sproščanjem.

1.1.1 FARMACEVTSKE OBLIKE S PODALJŠANIM SPROŠČANJEM

Farmacevtske oblike (FO) s podaljšanim sproščanjem, so namenjene zmanjšanju pogostosti odmerjanja farmacevtske oblike, saj vzdržujejo terapevtske koncentracije ZU v plazmi oz. na mestu delovanja skozi daljše časovno obdobje. S podaljšanim sproščanjem dosežemo tudi manjše nihanje plazemskih koncentracij, nižje koncentracije ZU v plazmi se pri pacientu odražajo v manj neželenih učinkih in večjem sodelovanju bolnikov v terapiji (komplianci). Dosežemo hiter začetek delovanja zdravila, z vzdrževanjem terapevtske koncentracije ZU v plazmi; kinetika sproščanja skozi določen čas pa je predvidljiva in ponovljiva.

Zavedati pa se moramo tudi slabosti. Obstaja večja možnost sprostitev celotnega odmerka naenkrat (*ang. dose-dumping*), ali pa počasna absorpcija, kar povzroči zakasnitev začetka delovanja. Slednja ima v terapiji za kronično uporabo zdravila manjši pomen, saj se

koncentracija ZU v plazmi nahaja v stanju ravnotežja. Zaradi počasnega dovajanja ZU je prisotna možnost povečanega obsega predsistemskega metabolizma, kjer encimi, ki so vedno na voljo, metabolizirajo ZU. Zmanjšano je individualno odmerjanje, saj se FO s podaljšanim sproščanjem zaradi svoje sestave ne smejo razdeljevati (lomiti). Prav tako sproščanja ZU ne moremo neomejeno podaljšati, saj je čas sproščanja ZU omejen s časom zadrževanja FO v prebavnem traktu oz. njegovih delih, kjer je zagotovljena absorpcija (2).

Podaljšano sproščanje pri peroralnih FO, lahko dosežemo z naslednjimi sistemi (3):

- Topnostno nadzorovani sistemi
- Difuzijsko nadzorovani sistemi (hidrofilne in hidrofobne ogrodne tablete)
- Sistemi, ki temeljijo na kombinaciji difuzije in topnosti
- Osmotsko kontrolirani sistemi
- Ionsko izmenjevalni sistemi
- Počasno raztapljajoče soli in kompleksi
- pH odvisne formulacije
- Hidrodinamsko kontrolirani sistemi

1.2 SPROŠČANJE IZ HIDROFILNIH OGRODNIH TABLET

Hidrofilni ogrodni sistemi so široko uporabni v peroralni dostavi ZU, zaradi svoje prilagodljivosti po ohranitvi želenega profila sproščanja, cenovne dostopnosti in široke regulatorne sprejemljivosti. Sproščanje ZU, ki je dispergirana v topnem hidrofilnem ogrodju polimera, poteka preko kompleksnih interakcij med parametri raztapljanja, difuzije in erozije.

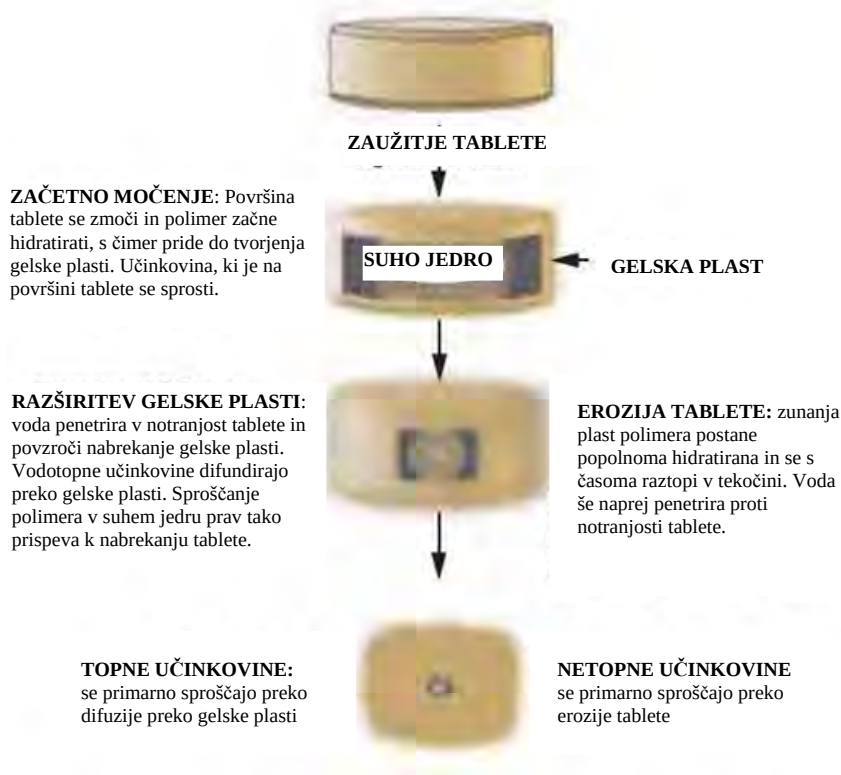
Najpogosteje uporabljeni polimeri za izdelavo hidrofilnih ogrodnih tablet so eterski derivati celuloze, ki jih uvrščamo med hidrofilne polimere. Hidrofilni polimeri imajo svojo značilno temperaturo steklastega prehoda (T_g). Pod T_g se polimeri nahajajo v steklastem stanju (*ang. glassy state*), kar pomeni da je mobilnost polimernih verig zelo majhna in difuzija vode počasna. Voda v stiku s hidrofilno ogrodno tableto lahko zniža T_g polimera tudi pod temperaturo medija in polimer posledično preide v elastično (zmehčano) obliko (*ang. rubbery state*). V tem zmehčanem stanju ima polimer večjo mobilnost verig, poveča pa se tudi hitrost difuzije vode v notranjost tablete. Na površini tablete nastaja hidrogel, znotraj katerega razlikujemo nabrekajočo in erodirajočo plast. Nabrekajoča plast je difuzijska plast za prodor vode v notranjost tablete oz. za sproščanje ZU iz nje. Erodirajoča

plast je na površini tablete, od koder se polimerne verige odpletajo in prehajajo v okoliški medij (4, 5, 6). Oba procesa nabrekanja in erozije gelske plasti potekata sočasno, dokler ne erodira celotno polimerno ogrodje. Sočasno z nabrekanjem oziroma geliranjem hidrofilnega polimera prihaja do raztapljanja ZU v ogrodni tableti. Raztopljena ZU se z difuzijo skozi s tekočino napolnjenih por v hidrogelu sprošča iz FO, kar lahko nadzorujemo tako s hitrostjo kot obsegom nabrekanja gelske plasti (7, 8).

Princip sproščanja poteka torej po dveh osnovnih mehanizmih (7, 9, 10):

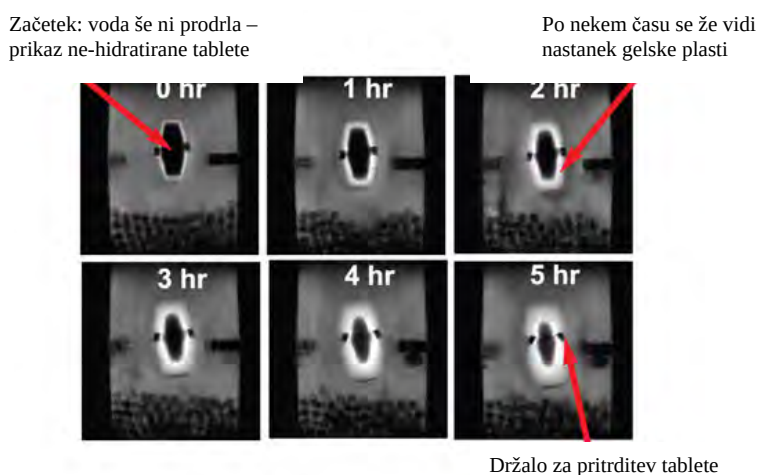
- Z difuzijo nadzorovano sproščanje; za ta mehanizem je značilno, da je hitrost sproščanja zdravilne učinkovine odvisna od hitrosti difuzije raztopljene zdravilne učinkovine skozi hidrofilno plast (na ta način se primarno sproščajo vodotopne zdravilne učinkovine)
- Z erozijo nadzorovano sproščanje (na ta način se sproščajo pretežno slabo vodotopne zdravilne učinkovine)

Možna in dokaj pogosta je tudi kombinacija, kjer sodelujeta oba mehanizma, vendar lahko en mehanizem prevlada nad drugim, odvisno od lastnosti izbranega polimera in topnosti ZU. Shematično je proces raztapljanja hidrofilne ogrodne tablete in sproščanja ZU prikazan na sliki 1.1.



Slika 1.1: Prikaz poteka raztapljanja tablete in sproščanje zdravilne učinkovine (11)

Proces raztapljanja trdne ogrodne tablete se začne, ko topilo prodre v tableto, omoči polimer pri čemer se ta pretvori v visoko koncentrirano polimerno raztopino – gel oz. hidrogel. Gel deluje kot zaščitni sloj, ki preprečuje takojšni razpad ogrodja tablete in zadržuje sproščanje ZU iz tablete v okoljni medij. Hidrogele tvori polimerna mreža, ki lahko absorbira velike količine vode. Voda zapolnjuje pore v polimerni mreži in s tem vpliva na difuzijo in porazdeljevanje molekul v hidrofilni ogrodni tableti. Pomembni faktorji polimerne mreže so povprečna velikost por, porazdelitev velikosti por in njihova medsebojna povezanost. Debelina gelske plasti in volumna delež por, predstavljata efektivno difuzijsko pot, ki jo mora neka molekula (topljenec) prepotovati, da se iz hidrogela lahko sprostí (12, 8). Slika 1.2 prikazuje proces raztapljanja hidrofilne ogrodne tablete.



Slika 1.2: Hidrofilna ogrodna tableta pritrjena na nosilec. Prikazano je raztapljanje v različnih urah, ko voda prodira čedalje globlje in se tvori gelska plast (15).

Pri procesu raztapljanja trdne ogrodne tablete ponavadi nastaneta dve premikajoči meji, ki nastajata in izginjata med različnimi fazami nabrekanja tablete. Med gelsko plastjo in trdnim jedrom opazimo nastanek prve meje, druga meja pa ločuje gelsko plast od razredčene okoliške raztopine. Koncentracijo polimera na meji gel / raztopina imenujemo kritična koncentracija (c_{krit}). To je koncentracija, za katero predvidevajo, da odgovarja najnižji koncentraciji, pri kateri polimerne verige še ostajajo povezane med sabo. Odvisno od uporabljenega polimera variira tudi c_{krit} , s tem variira debelina gelske plasti in tudi hitrost raztapljanja tablete. Nižje vrednosti c_{krit} so značilne za polimere, ki so pri enaki koncentraciji zmožni sproščati ZU daljše časovno obdobje in tvorijo debelejšo gelsko plast (torej sprejmejo večjo količino vode).

Ker je hitrost raztapljanja odvisna predvsem od polimera, je pri formuliranju trdnih FO s podaljšanim sproščanjem, zelo pomembno razumeti in določiti s funkcionalnostjo povezane lastnosti uporabljenega polimera (6, 13, 14).

Za oblikovanje hidrofilnega ogrodnega sistema je ključnega pomena izbira polimera, ki dovolj hitro in v ustreznem obsegu nabreka in s tem tvori gelsko plast, s čimer preprečuje, da bi se ZU iz tablete prehitro sprostila.

1.2.1 POLIMERI ZA HIDROFILNE OGRODNE TABLETE

Polimeri so makromolekule, sestavljene iz ponavljajočih se (monomernih) strukturnih enot, tipično povezanih s kovalentnimi kemijskimi vezmi. Ponavadi imajo neko osnovno verigo, na katero so lahko vezane substituenti – npr. funkcionalne skupine (COOH , NH_2 ,...) oz. stranske oligo ali polimerne verige. V prvem primeru govorimo o linearnih, v drugem pa o razvejanih polimerih. Poseben primer so premreženi polimeri, kjer so posamezne polimerne verige med seboj povezane s stranskimi vmesnimi verigami različne dolžine. Polimeri nastanejo v reakciji polimerizacije monomernih enot. Osnovne lastnosti polimera v veliki meri definira monomerna enota, mikrostruktura (konfiguracija) pa nam pove razporeditev teh enot znotraj polimera. Te osnovne lastnosti imajo veliko vlogo, ko gre za fizikalne lastnosti polimera, ki definirajo kako se bo polimer obnašal kot makromolekula. Fizikalne lastnosti so močno odvisne tudi od molekulske mase polimera. Večji oz. daljši kot je polimer, večja bo njegova viskoznost ob stiku z vodo in manjša bo njegova mobilnost. Velikost polimera lahko izrazimo kot (povprečno) molekulsko maso.

Nastanek gelske plasti oz. hidrogela je posledica medsebojnih kemijskih in/ali fizikalnih povezav med polimernimi verigami in vodo. Za hidrogele, ki nastanejo preko fizikalnih interakcij (vodikove vezi, hidrofobni efekt, van der Waalsove sile) je značilno reverzibilno geliranje, kar pomeni, da se po daljšem času ob zadostni količini medija razpletajo – erodirajo. Hidrogeli, ki nastanejo preko kemijskih interakcij so ireverzibilni, saj so nastale vezi med molekulam kovalentne. Takšni hidrogeli v vodi le nabrekajo in se ne raztapljajo (8)

Kot pomožne snovi za izdelavo hidrofilnih ogrodnih sistemov se uporabljajo (4, 8):

- sintezni polimeri (polivinilalkohol, etilen-vinilalkohol, polietilenoksid),

- polsintezni polimeri - različni celulozni derivati (metilceluloza, hidroksipropilceluloza, hidroksipropilmetilceluloza),
- naravni polimeri (alginat, dekstran, gelan, guar gumi, hitosan, karagenani, ksantan).

Najpogosteje za izdelavo hidrofilnih ogrodnih tablet uporabljamo hidroksipropilmetilcelulozo (HPMC), ki zagotavlja robusten mehanizem sproščanja. HPMC je neionski polimer, na tržišču so dostopni različni substitucijski in polimerizacijski tipi, poleg tega pa je tudi cenovno ugoden.

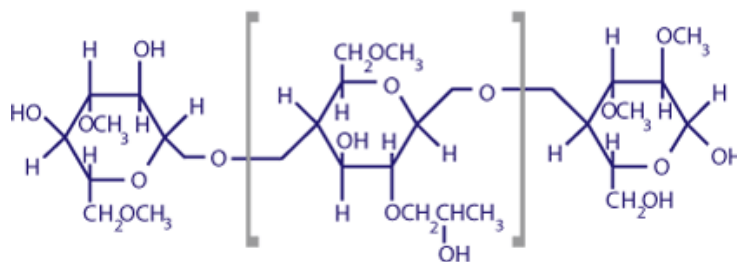
V magistrski nalogi se bomo posvetili predvsem HPMC polimeru, kot pomožni snovi za izdelavo hidrofilnih ogrodnih tablet s podaljšanim sproščanjem.

1.3 HIPROMELOZA

Mednarodno nelastniško ime za hidroksipropilmetilcelulozo (HPMC) je hipromeloza in je polsintezni linearni polimer, ki se pridobiva bodisi iz lesa ali pa iz bombaža, kot osnovne surovine. HPMC je prah bele do krem barve, je inerten, viskoelastični polimer, netoksičen, nedražljiv, brez vonja in okusa. Je topen v mrzli vodi (tvori viskozno koloidno raztopino), če pa raztopino segrejemo se obori. Prav tako je netopen v kloroformu, etanolu (95 %), etru (16, 17, 18) .

V farmaciji ga uporabljamo, kot vezivo, sredstvo za oblaganje, kot funkcionalno pomožno snov za kontrolirano sproščanje iz trdnih peroralnih FO; sredstvo za povečanje viskoznosti raztopin, stabilizator v gelih in mazilih (19).

Hipromeloza je sestavljena iz osnovnih glukoznih enot, povezanih z 1,4- β glikozidno vezjo, ki sestavljajo verigo, na katero so pripete hidroksipropilne skupine ($-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$) in metilne ($-\text{CH}_3$) skupine. Shematski prikaz hipromeloze prikazuje slika 1.3 (20) .

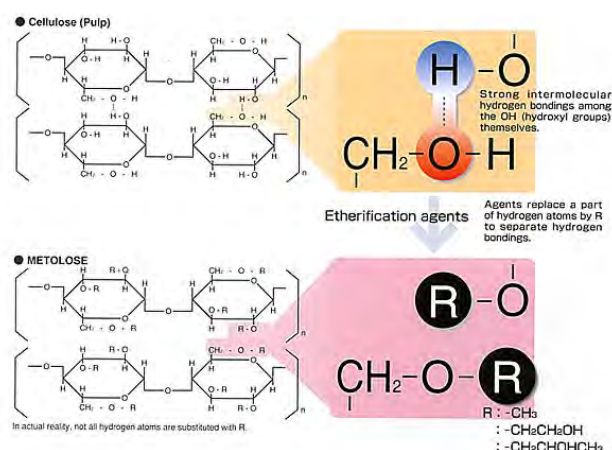


Slika 1.3: Shematski prikaz hipromeloze.

Dva izmed večjih proizvajalcev HPMC sta Shin-Etsu, (njegovo komercialno ime za HPMC je Metolose®) in Dow (njegovo komercialno ime za HPMC je Methocel®/™). Proizvajalca za pridobivanje končnih proizvodov uporabljata različne izhodne materiale; in sicer Shin-Etsu uporablja kot izhodno surovino celulozna vlakna iz lesa, Dow-ov postopek pridobivanja pa izhaja iz bombaža (18).

Primerjava komercialnih imen za proizvajalca je podana v tabeli II.

Proizvodnji postopek HPMC Metolose proizvajalca Shin-Etsu je predstavljen na sliki 1.4 (21):



Slika 1.4: Shematski prikaz proizvodnje HPMC proizvajalca Shin-Etsu.

Celuloza v vodi ni topna zaradi intermolekularnih vodikovih vezi med hidroksilnimi skupinami. Te tvorijo kristalno strukturo, ki preprečuje vodi, da bi prišla med molekule v celulozi. Zaradi tega najprej izvedejo bazično reakcijo (z jedko vodno raztopino sode) in nato eterifikacijo (npr. z metilkloridom, propilen oksidom ali etilenoksidom), kjer so nekateri vodikovi atomi hidroksilnih skupin v celulozi zaetreni z metilno, hidroksipropilno ali hidroksietilno skupino. Na ta način se sintetizira HPMC, ki je vodotopen.

Glede na delež substituiranih skupin ločimo štiri glavne tipe (prikazani v tabeli I):

Tabela I: Vrste HPMC po različnih tipih substitucije.

TIP SUBSTITUCIJE (Veljavno po JP XV, PhEur 6.3, USP 32)	METIL [%]		HIDROKSIPROPIL [%]	
	min.	max.	min.	max.
1828	16,5	20,0	23,0	32,0
2208	19,0	24,0	4,0	12,0
2906	27,0	30,0	4,0	7,5
2910	28,0	30,0	7,0	12,0

Prvi dve številki tipa substitucije pomenita približen delež vsebnosti metilnih skupin, drugi dve številki pa pomenita približen delež hidroksipropilnih skupin. Znotraj tipa substitucije, imamo lahko različne molekulske mase polimera in v povezavi s tem tudi različne viskoznosti standardnih (2 % m/m) vodnih raztopin (19).

Tabela II: Prikaz komercialnih imen in lastnosti Metolose proizvajalca Shin-Etsu ter Methocel proizvajalca Dow (21, 22)

Tip substitucije	Stopnja substitucije	Shin-Etsu - Komercialno ime	Stopnja viskoznosti [mPas]*	Dow - Komercialno ime	Stopnja viskoznosti*
2208	1,4	Metolose 90SH	4000, 15000, 100000	Methocel K	3, 100, 4000, 15000, 100000
2906	1,8	Metolose 65SH	50, 400, 4000	Methocel F	50, 4000
2910	1,9	Metolose 60SH	50, 4000, 10000	Methocel E	3, 5, 6, 15, 50, 4000, 10000

Opomba: * 2 % (m/m) vodna raztopina pri 20°C

Stopnja substitucije pove povprečni delež hidroksilnih skupin v celulozi zaetrenih z metilnimi oz. hidroksipropilnimi skupinami. Ker so samo tri možna mesta oz. samo 3 hidroksilne skupine na vsaki monomerni enoti v molekuli celuloze, je to število med 0 in 3; lahko je izraženo v deležu.

Dokaj široke meje substitucije s posamezno alkilno skupino (metilno ali hidroksipropilno), znotraj enega tipa HPMC, omogočajo precej različne »kakovosti« znotraj posameznega tipa HPMC. Kot bomo videli v nadaljevanju, je to lahko tudi razlog v variabilnosti lastnosti istih ali različnih tipov HPMC.

1.3.1 ODVISNOST KINETIKE SPROŠČANJA ZU OD LASTNOSTI OGRODJA

Na kinetiko oz. mehanizem raztapljanja tablete oziroma sproščanja ZU z ogrodja tablete vpliva zelo veliko lastnosti tako polimera (HPMC) kot ZU oz. drugih pomožnih snovi. V nadaljevanju se bomo posvetili tem vplivom in skušali razložiti zakaj pride do variabilnosti pri sproščanju ter zakaj so hidrofilne ogrodne tablete tako kompleksne za izdelavo in uporabo.

1.3.1.1 Vplivi povezani s polimerom kot tvorilcem ogrodja

Stopnja substitucije vpliva na lastnosti polimera (HPMC), zato so določeni polimeri primerni za podaljšano sproščanje, določeni pa za hitro sproščanje. Več kot je prisotnih hidroksipropilnih skupin, ki so hidrofilne funkcionalne skupine, hitrejša bo hidratacija in geliranje ter s tem doseženo tudi podaljšano sproščanje (11).

Mitchell s sodelavci (23) je v eni izmed svojih študij preučeval vpliv tipa substitucije HPMC na nastajanje gelske plasti in na sproščanje modelne ZU (propranololijev klorid). Primerjali so tri tipe HPMC (E4M, K4M, F4M) in metilcelulozo (A4M). Opazili so, da je

hitrost sproščanja modelne ZU variirala glede na razmerje ZU/celulozni etri, toda to razmerje niso mogli direktno povezati glede na razlike v hitrosti sproščanja. Vsi preučevani tipi celuloznih etrov so pri visokih vsebnostih celuloznih etrov v tableti izkazovali dokaj podobne profile sproščanja, medtem ko so pri tabletah z nizkimi vsebnostmi celuloznih etrov (25 mg) ugotovili, da je metilceluloza A4M modelno ZU zadržala najdlje kljub temu, da naj bi proces hidratacije pri tem tipu celuloznih etrov potekal najpočasneje. V študiji so želeli razložiti ta nepričakovani rezultat in podati najboljšo razlago počasnega sproščanja metilceluloze. Pri temperaturi točke zamotnitve (*ang. Cloud point* - c_p) ima HPMC slabšo hidratacijo in s tem počasnejši nastanek zaščitnega gela, kar pomeni da višja c_p pomeni boljšo hidratacijo pri fizioloških pogojih. Točka zamotnitve je namreč odvisna je od vrste in količine substituent, ki so pripete na celulozno verigo. Več kot je pripetih hidroksipropilnih skupin na celulozni verigi, višja je c_p ; nižji delež hidrofobnih metilnih skupin pri tem še dodatno poveča to temperaturo. Pripravili so različne koncentracije vseh vrst HPMC in spremljali c_p . Zanimivo je, da je metilceluloza edina, ki je pokazala veliko odvisnost c_p od koncentracije HPMC, saj je imela pri 0,5 % koncentraciji polimera za 15°C višjo temperaturo točke zamotnitve kot pri 2,0 % koncentraciji. Ostale vrste HPMC so imele to razliko dokaj nizko, in sicer manj kot 3 % v povprečju. Iz tega so zaključili, da stopnja substitucije ni glavni dejavnik, ki vpliva na hidratacijo in raztapljanje modelne ZU, saj ko gre za metilcelulozo A4M. Najboljšo povezavo za napoved hitrosti sproščanja so tako dobili s pomočjo merjenja točke zamotnitve (23).

Viskoznost polimera je ponavadi izražena kot navidezna viskoznost 2 % (m/m) vodnih raztopin HPMC. Navidezna viskoznost je proporcionalna povprečni molekulski masi polimera in ima pomemben vpliv na kontrolirano sproščanje ZU. Višja kot je viskoznost nastale gelske plasti ogrodne tablete, počasneje se polimerne verige razpletajo in počasneje gelska plast erodira. Upočasnjena je tudi difuzija ZU preko te plasti, vendar je ključnega pomena hitrost vzpostavitve viskoznosti polimera, saj se dobrotopna ZU lahko sprosti še pred nastankom te plasti (8, 10).

S pomočjo splošne Mark-Houwink enačbe lahko izračunamo povprečno molekulsko maso polimera, če imamo podano intrinzično viskoznost, in obratno /1/.

$$[\eta] = K \cdot M^{\alpha} \quad /1/$$

$[\eta]$...intrinzična viskoznost
 K, α ... konstanti, odvisni od uporabljenega sistema polimer-topilo
 M ... molekulska masa polimera

Mitchell je v svojem raziskovalnem delu opisal enačbo /2/ za izračun molekulske mase HPMC, če imamo podano intrinzično viskoznost, ki je prirejena posebej za izračun molekulske mase HPMC.

$$M = \left(\frac{[\eta]_{HPMC}}{0,0002} \right)^{\frac{1}{0,8216}} \quad /2/$$

S. Mitchell in K. Balwinski sta s pomočjo zgoraj omenjenih enačb /1/ in /2/, preko razmerij najnižje oz. najvišje dovoljene (USP) viskoznosti za posamezen tip HPMC, izračunala in prikazala variabilnosti, ki jih mejne viskoznosti polimera izkazujejo na profilih sproščanja. Ugotovila sta, da največjo variabilnost pri sproščanju zdravilne učinkovine dajejo nizkoviskozni HPMC (E50 oz. K100 LV). Variabilnost se še poveča, če imamo formulacijo, kjer se zdravilna učinkovina primarno sprošča z erozijo (10).

S. Mitchell in K. Balwinski sta v drugi raziskavi želela povezati vpliv različnih velikosti delcev HPMC na profil sproščanja (ta del raziskave bo bolj natančno opisan pri poglavju, ki govori o vplivu velikosti delcev). Del raziskave pa sta namenila tudi določevanju viskoznosti 2 % (m/m) vodnih raztopin, različnih velikosti in tipov HPMC. Ugotovila sta, da manjši delci HPMC izkazujejo nižjo viskoznost (nižjo molekulsko maso), kar pomeni, da z manjšimi delci polimera posledično vplivamo tudi na viskoznost. Dokazala sta tudi, da je vpliv viskoznosti (oz. molekulske mase) močnejši, ko imamo mehanizme sproščanja z erozijo (24).

Tudi drugi avtorji so pokazali, da v nekaterih formulacijah vgradnja HPMC večje viskoznosti, povzroči podaljšano sproščanje, medtem ko pri nekaterih drugih formulacijah tega fenomena ni opaziti (25, 26) in viskoznost ne more napovedati (predvideti) profila sproščanja (6). To nakazuje, da so za hitrost sproščanja ZU pomembni tudi drugi parametri.

Za doseg želenih profilov sproščanja, so komercialno dostopne različne molekulske mase in tipi substitucije hipromeloze.

J. Herder s sodelavci (18) je v svoji študiji želela povezati lastnosti granul, pridobljenih z vodno granulacijo, z molekulsko maso in stopnjo substitucije. Pred granulacijo so določili lastnosti (molekulska masa, velikost delcev, porazdelitev delcev, navidezna gostota) HPMC, kot vhodni material različnih molekulskih mas (in tipa substitucije) za izdelavo granul. Opazili so da nižje molekulske mase HPMC, izkazujejo ožji polidisperzni indeks. Nato so izdelali granule, ki so vsebovale HPMC, različnih molekulskih mas (tudi različen

tip substitucije). Ugotovili so, da s polimeri nizke molekulske mase dobijo manjšo velikost granul, boljšo nasipno gostoto, dobro pretočnost in ožji polidisperzni indeks, kot pri granulah s polimeri višjih molekulskih mas. Iz granul so izdelali tablete. Tablete s polimeri nizke molekulske mase so imele nizko natezno trdnost in večjo poroznost, kot tablete s polimeri visoke molekulske mase. Glede na to, da drugi avtorji niso uspeli povezati odvisnosti molekulske mase primarnih delcev HPMC z natezno trdnostjo, lahko s to študijo, kjer so uporabili vmesni korak, granulacijo, sklepamo, da ima le-ta posreden vpliv na natezno trdnost. Razlog za to je verjetno voda, ki v stiku s HPMC raztaplja polimerne verige. Lastnosti gela, ki se pri tem tvori, so odvisne od molekulske mase. Pri granulaciji omočeni delci (tvori se gelska struktura), pridejo v kontakt z drugimi delci in se aglomerirajo. Aglomerati, ki so nastali iz HPMC nizke molekulske mase so bolj nagnjeni k drobljenju, kot tisti izdelani iz HPMC višje molekulske mase, saj imajo slednji večjo afiniteto med delci. Zanimivo pa je, da tip substitucije polimera ni imel velikega vpliva na lastnost granul oz. tablet. V študiji so dokazali, da je molekulska masa polimera glavni parameter, ki vpliva na lastnost granul ter tablet izdelanih iz njih (18).

Velikost delcev znotraj posamezne vrste HPMC predstavlja zelo velik vpliv, kjer so za podaljšano sproščanje pomembni predvsem manjši delci HPMC. Ti imajo večjo specifično površino s čemer je omogočen boljši stik polimer–voda, kar poveča hitrost hidracije in geliranja. S tem je zmanjšana hitrost penetracije vode v tableto in hitrost sproščanja ZU. Velikost delcev HPMC je še posebej pomembna pri zelo dobro topnih zdravilnih učinkovinah, kjer moramo zagotoviti čim manjšo velikost delcev polimera (11) in pri nizkih koncentracijah HPMC v tabletah (9, 12, 24).

S. Mitchell in K Balwinski (24) sta raziskovala vpliv velikosti delcev štirih različnih tipov HPMC, na profil sproščanja, pri čemer sta uporabila šest različnih modelnih ZU. Različne velikosti posameznih tipov HPMC sta pridobila s pomočjo sejanja. Pripravila sta mešanico ZU s HPMC, ki je imel ozko distribucijo delcev in HPMC z bimodalno distribucijo delcev (mešanica finih in grobih delcev). Ugotovila sta, da je pri treh od šestih različnih formulacij (različne ZU), velikost delcev polimera pokazala velik vpliv na profil sproščanja ZU, medtem ko pri ostalih treh te razlike ni bilo opaziti. To nakazuje, da je pomembna tudi kombinacija pomožnih snovi in ZU, ki jo uporabimo, saj v odvisnosti od svoje topnosti različno vplivajo na privzem vode, hitrost nabrekanja in tvorbo gelske plasti. Ugotovil je tudi, da ima vpliv velikosti polimera pomen samo do določene–mejne velikosti delcev, od te velikosti naprej pa se sproščanje ne spremeni bistveno. To bi pojasnili tako,

da predpostavimo, da je pomembna samo določena količina majhnih delcev, ki zapolnijo pore, kjer bi lahko voda prodirala v sredico ogrodnih tablet (24).

Bonferoni s sodelavci (12), je v svoji študiji primerjal vplive treh različnih stopenj substitucij HPMC in vpliv velikosti delcev polimera na sproščanje zdravilne učinkovine. Znotraj vsake stopnje substitucije so uporabili tri različne serije istega proizvajalca. Pri dveh tipih HPMC ni bilo opaziti večjih razlik v hitrosti sproščanja (nesejane frakcije) med serijami istega tipa HPMC, niti med različnima tipoma HPMC; medtem ko so pri enem tipu (E4M) opazili tako veliko med-serijsko variabilnost, kot tudi različen profil sproščanja od ostalih dveh tipov. Vsem trem tipom HPMC so določili še profil sproščanja presejanih frakcij in ugotovili, da se različen profil sproščanja kaže samo pri tipu E4M. Sledil je morfološki pregled oblike delcev pod mikroskopom. Pri E4M so opazili dve populaciji delcev – igličasto in sferično, in sicer presejani delci, ki so vsebovali večji delež igličastih delcev so imeli počasnejše sproščanje. Velika med-serijska variabilnost je bila posledica različnega deleža igličastih delcev v posamezni seriji. S tem so dokazali, da ima oblika delcev polimera prav tako velik vpliv na sproščanje ZU (12).

Kombinacije različnih polimerov s HPMC lahko zagotavljajo optimalnejši profil sproščanja zdravilne učinkovine in sinergistično delovanje kombinacije polimerov. Celokupna količina uporabljenih polimerov je lahko namreč manjša, kot če bi ogrodna tableta vsebovala samo hipromelozo. Pogosto kombinacije polimerov lahko tvorijo čvrstjše ogrodje in ob nabrekanju mehansko bolj odporen hidrofilni gel, ki izkazuje manjšo erozijo, kot če bi bil v gelu prisoten en sam polimer.

Escudero s sodelavci, je v svojih študijah preučeval kombinacijo HPMC (en tip, različne viskoznosti) z novo generacijo inertnega neionskega polimera, hidroksipropilcelulozni metil metakrilat (HCMMA). Z različnimi razmerji teh dveh polimerov, je želel vplivati na mehanizem nabrekanja, poroznost in kapaciteto privzema vode. Z mešanjem polimerov z različnima mehanizmoma sproščanja, je dosegel dvojni mehanizem sproščanja (difuzijo in erozijo). Svojo raziskavo je nadaljeval, tako da je preizkušal različne tipe HPMC skupaj z HCMMA. Za svoje mešanice je opazil različne lastnosti, odvisno od tipa substitucije. Mešanica K4M z HCMMA je izkazovala še največ prednosti, saj so za stiskanje potrebne nižje sile in s tem povezano tudi nižji stroški proizvodnje (27, 28).

A. Viridén s sodelavci (6), je v svojih raziskavah proučevala, katere lastnosti HPMC so odgovorne za pogosto zasledene variabilnost profilov sproščanja iz ogrodnih tablet.

Opazili so, da se polimer velikokrat ne obnaša tako, kot bi teoretično pričakovali. Lotili so se preverjanja vseh možnih znanih parametrov, ki vplivajo na profil sproščanja. Ugotovili so, da drugačen profil sproščanja, nima konkretnega vzroka v molekulski masi, viskoznosti, velikosti delcev, trdnosti tablet ali stopnji substitucije, kot bi pričakovali. Preiskovali so različne serije HPMC. Profil sproščanja je bil pri eni seriji bistveno nižji, kot pri ostalih serijah. Da bi pojasnili ta fenomen, so merili temperaturo točke zamotnitve (c_p) in vztrajnostni polmer (*ang. radius of gyration*), ki je merilo za velikost ovojev (verig) polimera in narašča z molekulsko maso. Pri večini serij je vztrajnostni polmer linearno naraščal z molekulsko maso, samo ena serija je imela nekoliko »ukrivljeno« (nelinearno) obliko premice. Odstop od ostalih serij, se je kazal tudi pri profilu zamotnitve 2 % raztopine, ki je imela prav tako drugačen profil krivulje – dobili so nepredvidljivo višje točke zamotnitve. Sklepali so, da bi oba pojava lahko pojasnili kompaktnimi konformacijami polimerne verige, ki so bili večje molekulske mase (6). V svojih nadaljnjih raziskavah (14) so želeli bolj definirati kemijsko sestavo, zato so na različnih serijah HPMC istega tipa, merili povprečno molekulsko maso, povprečno substitucijo (to je lahko precej različno zaradi farmakopejsko široko določene meje), ter porazdelitev substituentov na verigi. Prišli so do zaključkov, da sicer obstajajo razlike v molekulski masi, ter stopnji substitucije, a te ne morejo biti odgovorne za dobljene razlike v profilu sproščanja polimera. Zelo obetavno vlogo pa so ponovno našli pri merjenju vztrajnostnega polmera, ter v porazdelitvi substituentov po glukozi verigi. Slednjo so določali s pomočjo kisle hidrolize in s pomočjo encima endonukleaza. Ugotovili so, da serije HPMC, ki zagotavljajo nepričakovano dolgo sproščanje, izkazujejo že v prejšnjih raziskavah viden uklon pri merjenju vztrajnostnega polmera v odvisnosti od molekulske mase. Te serije so imele tudi značilno bolj heterogeno porazdelitev substituentov po verigi. Rezultati so nakazali, da obstaja neka meja, ko heterogenost substituentov na polimerni verigi predstavlja kritični parameter, ki botruje sproščanju. Ko je ta heterogenost zelo izražena, verjetno lokalno nastajajo kompaktne strukture, ki spremenijo tudi vztrajnostni polmer (14). Svoje nadaljnje raziskave (13) so usmerili v proučevanje teh kompaktnih struktur. Njihova hipoteza je bila, da heterogena sestava pospeši hidrofobne interakcije, ki povečajo viskoznost in s tem učinkujejo na hitrost sproščanja polimera. Te interakcije naj bi spremenile c_{krit} , želeli pa so dokazati ali na to vplivajo zaradi hidrofobnih interakcij med visoko-substituiranimi regijami različnih verig, ali kot posledica netopnih agregatov delno kristalizirane strukture (npr. zaradi nepopolne substitucije med samo proizvodnjo). Z

zniževanjem temperature medija, so prišli do zaključka, da so agregati najverjetneje posledica hidrofobnih interakcij, ki se tvorijo zaradi večje koncentracije substituentov na enem mestu, saj so se le-ti z nižanjem temperature topili. Ti agregati naj bi se normalno tvorili šele pri temperaturi 60°C (pri 2 % vodni raztopini polimera), toda zaradi velike heterogenosti, so si substituenti blizu skupaj, posledica pa je tvorba dolgo obstojnih hidrofobnih interakcij med navoji. Kljub temu, da imamo vse farmakopejsko predpisane teste pod nadzorom in v mejah zahtev, lahko heterogenost substituiranosti HPMC zelo vpliva na raztapljanje polimera in variabilnost med serijami (13).

1.3.1.2 Vplivi povezani z lastnostmi ostalih sestavin FO

Če primerjamo razmerje ZU : polimer, se pri večanju deleža polimera veča tudi debelina gelske plasti in s tem se tudi podaljša sproščanje (toda ne v neskončno). Kinetika sproščanja se pri tem ne spremeni (9). Če imamo polimer nižje molekulske mase, moramo delež polimera nekoliko povečati, če želimo doseči enak profil sproščanja (11).

Večje koncentracije (dobro topne) ZU imajo običajno (če ni interakcij s pomožnimi snovmi) hitrejšo sproščanje, ker je sila difuzije večja. Pri zelo dobro topnih zdravilnih učinkovinah je infiltracija vode v tableto ključni dejavnik, ki prispeva sproščanju. Pri slabo topnih zdravilnih učinkovinah pa se moramo pri tvorbi formulacije posvetiti predvsem eroziji, saj se ZU zaradi počasnejšega raztapljanja sprošča predvsem z erozijo in koncentracija ZU nima velikega vpliva.

Formulacije z manjšimi delci ZU lahko pomembno vplivajo na sproščanje slabo topne ZU, saj imajo večjo specifično površino (9).

Vpliv polnil je odvisen predvsem od uporabljene ZU, polimera in od lastnosti polnila. Pri slabo topnih ZU uporaba netopnih polnil podaljša sproščanje, saj se upočasni privzem vode v ogrodje (11, 29). Vodotopna polnila (npr. laktoza) povzročijo hitrejši in večji privzem vode v hidrofilno ogrodje in hitrejšo sproščanje (predvsem vodotopnih) učinkovin v primerjavi z nevodotopnimi polnili (36). Vpliv veziv lahko zaradi večje trdnosti podaljša sproščanje, medtem ko je vpliv drsil precej nizek. Površinsko aktivne snovi (PAS) izboljšajo močljivost tablet in s tem prispevajo k hitrejšemu sproščanju ZU. V določenih primerih pa lahko znižajo topnost ZU, saj tvorijo z njo komplekse, kar se izraža v počasnejšem sproščanju (31).

Vpliv pH medija za raztapljanje je zelo velik, saj je topnost ZU velikokrat odvisna od pH mikrookolja v katerem se nahaja. Tako se za pH neodvisno sproščanje šibke baze, uporablja kisle pomožne snovi, ki omogočijo lokalno nizek pH in s tem visoko topnost zdravilne učinkovine (32). Stabilnost hipromeloze v odvisnosti od pH ne predstavlja večjega problema, saj je stabilna v širokem pH območju (3 – 11). Sam polimer nabreka in se raztaplja neodvisno od pH raztopine, zato sprememba pH ne vpliva na sproščanje ZU preko polimera, ampak samo preko različne topnosti slednje.

Ionska moč se v prebavnem traktu spreminja od 0,01 do 0,2; odvisno od tega ali jo merimo na tešče ali po obroku. HPMC je sicer neionski polimer, toda na nabrekanje vseeno vpliva ionska sestava medija. Z večanjem ionske moči medija, se hitrost močenja in s tem tudi hitrost nabrekanja HPMC polimera zmanjšata, ker ioni odtegnejo vodo polimeru. Ogrodna tableta posledično hitreje erodira, kar pomeni, da se tudi ZU hitreje sprošča (4).

T. Kapele (5) je izdelal ogrodne tablete s paracetamolom in HPMC ter s testom sproščanja ugotavljal vpliv različne ionske moči medija na sproščanje in nabrekanje tablet. Pripravil je fosfatne puferne raztopine različnih ionskih moči (0,09 M; 0,15 M; 0,31 M; 0,52 M; 1,0 M) in ob izbranih časih spremljal koncentracijo sproščene ZU. Ugotovil je, da se v fiziološkem območju ionske moči (0,09 – 0,15 M), v pogojih na tešče, tvori čvrst difuzni gelski obroč, ki upočasni sproščanje (do 20 ur). Pri večji ionski moči medija pa pri vseh tabletah pride do hitrejšega sproščanja (gel je mehak in porozen); ZU se sprostí prej kot v dveh urah. Večja, kot je bila stopnja viskoznosti HPMC v tableti, prej je tableta reagirala na povečanje ionske moči in erodirala. Sklepal je, da bi se lahko v primeru, ko bi uživali hrano bogato s soljo, trenutna vrednost ionske moči lokalno povečala do te vrednosti, da se ne bi uspel tvoriti čvrst gel, ki upočasnjuje sproščanje (5).

Tudi oblika tablete nekoliko vpliva na hitrost sproščanja, pri čemer je pomembno razmerje med površino in volumnom tablete. Večje tablete imajo v primerjavi z manjšimi večjo površino, vendar sproščanje ZU ob enakem deležu hipromeloze poteka hitreje iz majhnih tablet, ker imajo večje razmerje med površino in volumnom ter krajšo difuzijsko pot za sproščanje ZU. Za zagotavljanje enakih profilov sproščanja iz manjših in večjih tablet, je potrebno v manjše tablete vključiti večji delež HPMC (4).

Sila stiskanja ima na splošno zelo majhen vpliv na sproščanje ZU. Pri tem je potrebno upoštevati, da tablete z zelo nizko trdnostjo razpadejo in pride zaradi tega do takojšnjega sproščanja ZU (9).

1.4 PRISTOPI K NAPOVEDOVANJU KINETIKE SPROŠČANJA IZ HIDROFILNIH OGRODNIH TABLET

Preskus raztapljanja je ključna metoda za ocenjevanje sproščanja iz trdnih peroralnih FO in je edina metoda s katero lahko primerjamo *in vivo* terapevtsko učinkovitost. Raztapljanje je časovno potratna metoda, saj vključuje številne analitske korake (kalibracija instrumentov, priprava medija, vzorčenje, določevanje vsebnosti ZU). Na proces raztapljanja vpliva veliko parametrov, ki jih moramo nadzorovati: temperatura medija za raztapljanje, uporaba najprimernejše aparature za raztapljanje za določeno FO, priprava medija za raztapljanje, hitrost in višina vesla, vibracije aparature, prijemanje farmacevtske oblike na vesla ali dno posode. Vsi naštetih parametri lahko vplivajo na rezultate in posledično na dobljen profil raztapljanja (33).

Profil raztapljanja ZU pa se za razliko standardno farmakopejsko predpisanega testa lahko oceni tudi z drugimi testi:

- NIR spektrofotometrija (34)
- NMR *microimaging* (35)
- *spin echo* NMR tehnika (36)

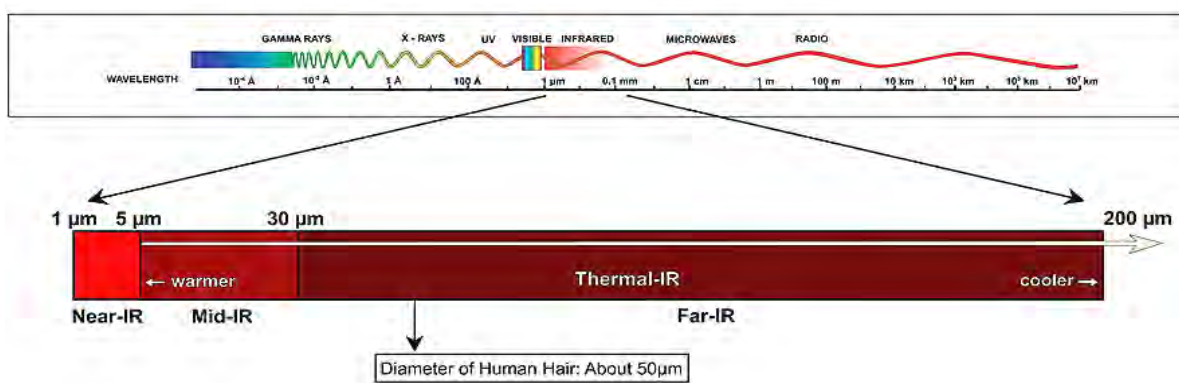
V magistrski nalogi se bomo osredotočili na določevanje velikosti delcev polimera z metodo bližnje infrardeče spektroskopije. Velikost delcev je ena izmed lastnosti, ki jo lahko definiramo že v predformulacijski fazi in se tako izognemo morebitni variabilnosti oziroma težavam pri raztapljanju zdravilne učinkovine.

1.5 INFRA RDEČE (IR) OBMOČJE SPEKTRA (37, 38)

IR spektroskopija je spektroskopska metoda, ki preučuje interakcije med snovjo in svetlobo. Svetloba se deli na različne predele valovnih dolžin, kar prikazuje elektromagnetni spekter, tabela III in slika 1.5.

Tabela III: IR območje je grobo razdeljeno na tri regije (bližnji, srednji in daljni IR):

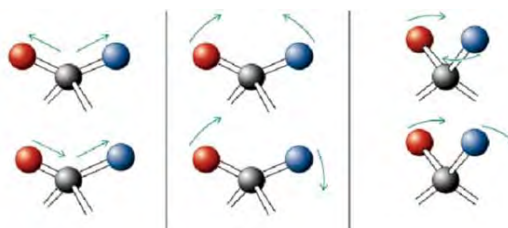
Območje	Valovna dolžina [nm]	Valovno število [cm ⁻¹]	frekvenca [Hz]
bližnji-IR	780 – 2500	12800 - 4000	3.8×10^{14} - 1.2×10^{14}
srednji-IR	2500 – 25000	4000 - 400	1.2×10^{14} – 0.12×10^{14}
daljni-IR	25000 -100000	400 -10	0.12×10^{14} - 0.03×10^{14}



Slika 1.5: Umestitev infrardečega sevanja v elektromagnetnem valovanju

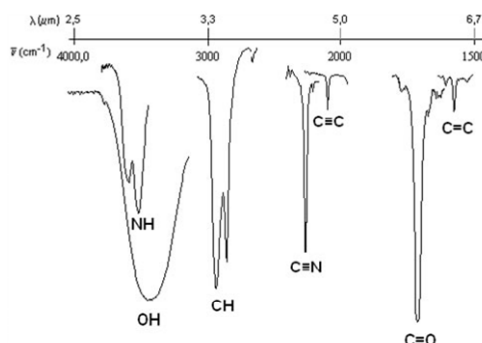
Princip uporabe spektroskopije v IR območju (37, 38, 39)

Vez med dvema atomoma deluje kot nekakšna vzmet, ki se konstantno krči, razteza in zvija (to nam shematično prikazuje slika 1.6).



Slika 1.6: Raztezanje, nihanje in rotacije vezi med dvema atomoma

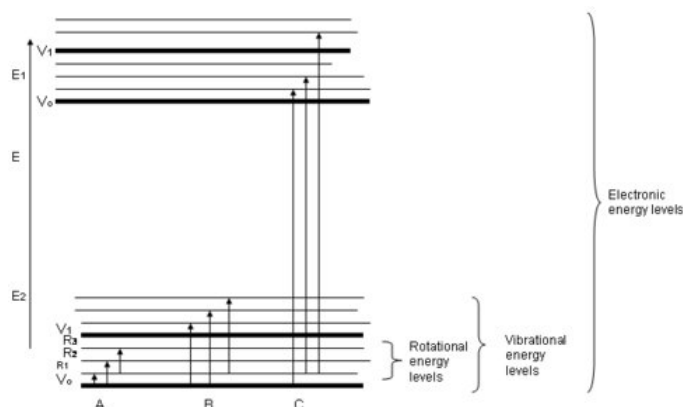
Pri obsevanju molekule s svetlobo se absorbira samo tista frekvenca, ki ustreza frekvenci vibracij (to je energija, ki je potrebna za prehod med posameznimi energetske nivoji). Zaradi povečane energije se poveča amplituda teh vibracij. Tako se vez, ki povezuje dva atoma še bolj razteguje in krči. Vibracije v molekuli so odvisne od mase atomov, jakosti vezi med njimi in razporeditve le teh. Ker vsaka frekvenca, ki jo molekula absorbira, ustreza specifičnemu nihanju dela molekule, lahko z interpretacijo (srednjega) IR spektra ugotovimo katere funkcionalne skupine so prisotne (nekateri funkcionalne skupine, ki jih lahko vidimo, nam prikazuje slika 1.7).



Slika 1.7: Prikaz nekaterih funkcionalnih skupin, ki jih vidimo v srednjem območju IR.

Znotraj srednjega-IR območja je regija ($1500 - 600 \text{ cm}^{-1}$), ki jo imenujemo »prstni odtis« (*ang. Fingerprint*) in nam, kot že samo ime pove, služi za nedvoumno identifikacijo spojine. Vsaka molekula ima karakterističen spekter, kar omogoča ločevanje celo med različnimi polimorfnimi oblikami, hidrati, idr.

Slika 1.8 prikazuje različne energetske nivoje, kjer molekule rotirajo, vibrirajo ali elektroni prehajajo iz enega nivoja na drug nivo.



Slika 1.8: Energetski prehodi v daljnem-IR (A), bližnjem-IR (B), in UV-VIS (C) področju. Rotacijski prehodi se pojavljajo pri nižji energiji, in so značilni za daljni-IR (A). Rotacijsko-vibracijske prehode lahko detektiramo v bližnjem-IR (B). Prehode iz osnovnega stanja v vzbujeno stanje lahko opazujemo v ultravijoličnem in vidnem (UV-VIS) delu spektra; za te prehode je potrebna večja energija (C) (40).

IR svetlobo lahko absorbirajo molekule, kjer se skupni dipolni moment specifičnih skupin atomov med vibracijami spremeni. Večja kot je sprememba v dipolnem momentu, močnejša bo absorpcija vezi v IR. Homonuklearne diatomske molekule, kot sta O_2 in H_2 , nimajo IR spektra, zato pa jih lahko vidimo v Raman-IR. Ta metoda temelji na spremembi polarizitete vezi med vibracijami, kar pomeni da s to tehniko lahko vidimo IR-neaktivne vibracije. Tehniki IR in raman-IR se med sabo dopolnjujeta in se uporabljata kot komplementarni tehniki (17, 38, 54).

1.5.1 BLIŽNJA INFRARDEČA (NIR) SPEKTROSKOPIJA

Uporaba NIR je primerna za spremljanje organskih spojin, ki vsebujejo funkcionalne skupine, kot so $-OH$, $-NH_2$, $-CH$, $-C=N$, $-C=O$, $-C=C$, $S-H$; pri čemer ima zelo velik vpliv na obliko spektra elektronsko ozadje v katerem se nahajajo določene funkcionalne skupine. Obsega spektralno območje od 780 nm do približno 2500 nm (oziroma od 12800

cm^{-1} do 4000 cm^{-1}). Intenziteta vrhov (absorbcija) in ločljivost sta v bližnjem-IR regiji veliko slabša (10-1000 krat) kot v srednjem-IR, saj tu vidimo nadtone (*ang. overtone*) in kombinacije vezi (več-atomske molekule vidimo kot povprečno frekvenco gibanja dveh sosednjih molekul), ki izvirajo iz osnovnih vibracij vidnih v srednjem-IR (37). V določenih primerih pa lahko iz NIR absorpcijskega traku dobimo veliko boljše informacije (kemijske in fizikalne) o nekem vzorcu, kot če opazujemo v srednjem-IR. Glede na intenziteto dobljenega absorpcijskega traku, lahko določamo različne fizikalne in kemijske lastnosti snovi (42, 43).

Pri sobni temperaturi je večina molekul v svojem osnovnem vibracijskem stanju. Atomi (skupine atomov), ki sodelujejo v kemijski vezi, se gibljejo med sabo s frekvenco, ki je definirana glede na moč vezi in maso vezanih atomov (skupine atomov). Amplituda teh vibracij je velika nekaj nanometrov in se poveča, če dovedemo energijo. Te vibracije se pojavijo pri točno določenih frekvencah, kar lahko vidimo kot absorpcijske trakove v IR spektru.

1.5.1.1 NIR instrument

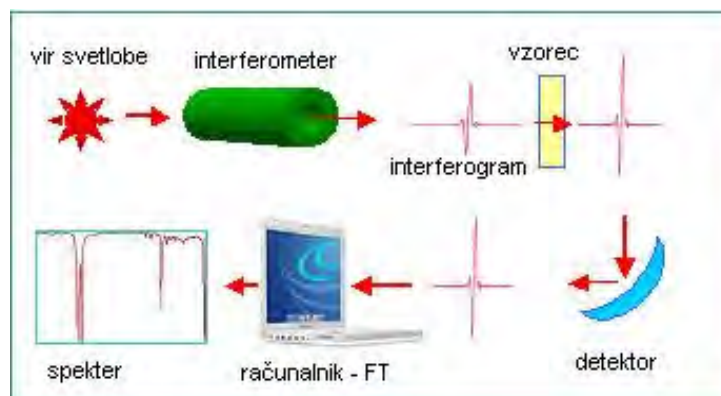
NIR spektrometer je sestavljen iz glavnih delov (9):

- Telo, ki seva svetlobo določene valovne dolžine ali celoten spekter valovnih dolžin (disperzijski spektrofotometer),
- celica, v katero vstavimo merjeni vzorec,
- detektor, ki meri transmitanco (prepuščeno svetlobo) ali refleksijo (odbito svetlobo),
- računalnik s katerim obdelujemo informacije.

Spektrometri se razlikujejo po tem ali lahko merimo samo pri izbrani valovni dolžini ali celoten spekter z eno samo meritvijo (disperzijski). Najpogosteje se uporablja disperzijski oz. Fourier transform spektrometer. Zanj je značilno visoko razmerje signal-šum, velika natančnost valovnih dolžin in dobra resolucija. Tak instrument pa je občutljiv na mehanske tresljaje, ki motijo premikajoča se zrcala.

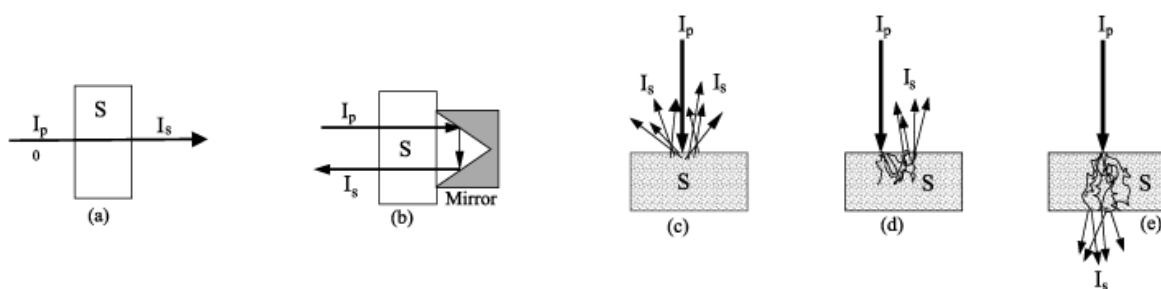
Najpogosteje uporabljen vir svetlobe je volfram-halogenska žarnica, ki seva širokopasovni emisijski spekter, je poceni in ima dolgo življenjsko dobo. IR-svetloba potuje do interferometra, kjer se ustvari interferogram, ki nosi »informacijo« za vse valovne dolžine. Vzorec simultano presevamo z vsemi valovnimi dolžinami. Spremenjen žarek potuje do

detektorja in nato do računalnika, ki s pomočjo Fourier-jeve transformacije (FT) pretvori interferogram v IR spekter (absorbanca oz. transmittanca v odvisnosti valovnega števila oz. valovne dolžine). Princip merjenja z uporabo interferometra in FT prikazuje slika 1.9 (44). Detektorji, ki se uporabljajo za detekcijo v NIR regiji so večinoma sestavljeni iz PbSe, PbS ali InGaAs fotoprevodnih materialov. Skupaj z močnim virom sevanja (volframova ali halogenska žarnica) nudijo ti detektorji zelo visoko razmerje signal-šum (40).



Slika 1.9: Shematska predstavitev FT-IR sistema.

Ko z določeno valovno dolžino presvetlimo vzorec, se žarek odbije, absorbira, prepusti (transmitira) ali razprši (Slika 1.10). Ozke rezine vzorcev, tekočine, disperzije raztopine, so idealne za merjenje prepuščene svetlobe; medtem ko pri grobih, poroznih in praškastih vzorcih raje merimo razpršeno odbojnost (difuzno refleksijo). Slednja tehnika je bolj primerna za opazovanje površinskih lastnosti, kot so: velikost delcev, hrapavost zrn, debelino obloge. Vzorci, ki preveč absorbirajo, so trdni ali kompaktni pa so bolj primerni za merjenje oslabiljene popolne odbojnosti.



Slika 1.10: Načini merjenja pri NIR spektroskopiji: (a) prepuštnost, (b) transflektnanca, (c) difuzna odbojnost, (d) interaktanca, (e) prepuštnost preko medija, ki sipa svetlobo (40)

1.5.1.2 Uporaba NIR (45)

Meritve lahko izvajamo direktno na *in situ* vzorcih. Spekter, ki ga dobimo je zelo kompleksen, saj daje dokaj splošne informacije glede vezi med molekulami in ne moremo

določiti specifičnih struktur. Lahko pa z različnimi kemometričnimi metodami in s pomočjo programov dobimo informacije o kemijskih in/ali fizikalnih lastnosti preučevanih snovi. NIR metode temeljijo na korelaciji med strukturnimi značilnostmi analita, ki jih opazujemo na določenem delu spektru in odzivom, ki je odvisen od različnih parametrov (količine analita, tipa molekul v snovi, velikost delcev, trdnosti snovi). Kvantitativne metode lahko uporabljamo, samo kadar so spremembe v odzivu NIR spektra proporcionalne spremembam v koncentraciji kemijske substance (npr. ZU) ali fizikalnih lastnostih vzorca, ki ga analiziramo. Strukturne značilnosti, ki jih vidimo na spektru nam dajejo neko osnovo za raziskovanje, znanega vzroka ali efekta v povezavi med odzivom instrumenta in podatki o analitu. S pomočjo multivariantnega modeliranja skušamo povezati lastnosti (obdelanega) spektra z referenčnimi vrednostmi merjene lastnosti. Če povezave ne najdemo, model nima nobene kvantitativne vrednosti.

NIR omogoča merjenje različnih parametrov oziroma lastnosti snovi (46, 47):

- homogenost praškovne mešanice
- trdnost tablet
- velikost delca oziroma njihova distribucija
- vlažnost snovi
- debelina obloge
- vsebnost zdravilne učinkovine ali pomožne snovi
- hitrost sproščanja ZU
- polimorfne oblike
- pretočne lastnosti (48)
- spremljanje bioprocsov (npr. fermentacija bakterij, ki izdelujejo antibiotik) (42, 43).

1.5.1.3 Prednosti / slabosti NIR

Metoda predstavlja več prednosti za sam vzorec kot tudi za analizo:

- ni potrebna predpriprava vzorca oz. je le-ta minimalna,
- niso potrebne kemikalije (analitik ni izpostavljen nevarnim vplivom kemikalij – večja varnost, nižja cena analize)
- nedestruktivnost metode,
- hitrost analize (ko je model že postavljen).

Frekvence bližnje IR spektroskopije prehajajo steklo, kar predstavlja veliko prednost, saj lahko nekatere FO (liofilizati, ampule, infuzije) merimo kar v končni ovojnini (49).

Z NIR-om bi lahko večino procesov spremljali tudi on-line oz. in-line (med samo proizvodnjo FO), kar bi omogočilo bolj kontrolirano in konstantno proizvodnjo, pravočasno odkrivanje morebitnih odstopanj ter s tem večjo učinkovitost proizvodnje. Temu na splošno rečemo procesno analizna tehnologija (*ang. Process analytical technology-PAT*), ki je že vpeljana v prehrambeni, naftni, kozmetični, kemijski industriji, v agrikulturi in v industriji plastike ter polimerov. V farmacevtski industriji PAT z NIR tehniko še ni toliko razvita, zaradi zahtevne aplikacije, potrebi po prilagoditvi celotne proizvodnje linije enemu izdelku (velika začetna vlaganja) in visokih regulatornih zahtev (50). Tehnika pa zato veliko obeta v prihodnosti, saj FDA (*ang. Food and Drug administration* – Ameriška agencija zadolžena za hrano in zdravila) spodbuja farmacevtsko industrijsko proizvodnjo po načelu PAT (37, 51).

Slabe strani NIR-a so:

- fizikalne lastnosti vplivajo na spekter (to včasih ni zaželeno),
- včasih je za ekstrakcijo pomembnih podatkov nujna predhodna obdelava spektrov
- potrebna je kalibracija s pomočjo referenčnih metod (HPLC, UV/VIS,...),
- postavitve modela je časovno potratna,
- nerobustnost (majhne spremembe zahtevajo ponovno kalibracijo),
- prenos modela na druge instrumente je težavna in ponavadi zahteva ponovne kalibracije (4).

Za določitev kalibracijskega modela je za izbrano FO pomembno, da si pridobimo čim več različnih kombinacij ali sestav te FO. Na ta način zmanjšamo in prepoznamo razlike, ki jih doprinesejo posamezni faktorji proučevane formulacije, kot so velikost delcev, oblika tablete, sila stiskanja, obloga. Ti faktorji lahko med proizvodnjo nekoliko variirajo in bi lahko vplivali na kalibracijski model. Zaradi tega je pomembno, da posnamemo povprečne spektre, ki zajemajo vse možne variabilnosti (51).

Pri snemanju spektrov imamo pri določeni valovni dolžini veliko prekrivajočih vezi in ni ostrih signalov, ki bi nam direktno posredovali informacijo o merjenem parametru. Zato za pridobivanje in ekstrakcijo potrebnih informacij za interpretacijo NIR spektrov uporabljamo kemometrijo, ki zajema matematične, statistične in logične operacije. S pomočjo kemometrije se skuša postaviti multivariantni kalibracijski model. Če model, statistično gledano, dobro napoveduje rezultate, ga lahko vpeljemo v rutinsko uporabo.

1.5.1.4 NIR-Chemical Imaging

Zadnja leta se veliko raziskuje na področju tehnike NIR-Chemical Imaging (NIR-CI), ki je kombinacija mikroskopa in analizatorja. Nov pristop omogoča kvantitativno prostorsko identifikacijo snovi v vzorcu, kar je neprecenljivega pomena, ko želimo razumeti neko lastnost vzorca. Opazujemo prereze in zunanjo površino FO, glede na prisotne molekule in atome. Določamo lahko: porazdelitev snovi in polimorfnih oblik, vsebnost snovi, vsebnost vode, lokacijo nečistot, debelino in trdoto obloge. S to metodo lahko odgovorimo na vprašanja kaj?, koliko? in kje? je določena sestavina, oz. kako so porazdeljene med sabo. Metoda ima v prihodnosti zelo obetajočo funkcijo na najrazličnejših področjih (farmaciji, medicini, prehrambeni industriji, agrikulturi, kemiji, biologiji,...) (49, 52, 53, 54).

1.5.2 DOLOČEVANJE VELIKOSTI DELCEV Z NIR SPEKTROSKOPIJO

Velikost delcev ZU in pomožnih snovi ima farmacevtski industriji pomembno vlogo, saj vpliva na pretočne lastnosti, mešanje prahov (segregacija), granulacijo in profil sproščanja ZU. V spodaj navedenih raziskavah bomo videli, kako lahko z NIR tehniko, na neinvaziven način, zelo hitro pridemo do informacij o velikosti delcev oz. homogenosti praškovne mešanice in s tem optimiziramo proces.

Bellamy s sodelavci (55) je raziskoval vpliv velikosti delcev in kohezivnih lastnosti prahov na proces mešanja. Variacije velikosti delcev posameznih komponent lahko v praškovni mešanici povzročijo segregacijo, ki vodi v nehomogenost končne FO. Na segregacijo pa vpliva tudi pretočnost prahov, saj imajo prahovi z dobro pretočnostjo manjše privlačne sile med delci, kar omogoča prosto gibanje med mešanjem in posledično segregacijo. V raziskavi so želeli oceniti optimalno velikost delcev mikrokristalne celuloze (MCC) v mešanici z različnimi komponentami (acetilsalicilna kislina, citronska kislina, aspartam, povidon K90). Dodane komponente so imele poleg različnih pretočnih lastnosti tudi različne oblike delcev. Pripravili so mešanice različnih frakcij velikosti delcev (dobili so jih s pomočjo sejalne analize) MCC in dodanih komponent ter preko steklenega dna posode za mešanje, z NIR spremljali homogenost. Ugotovili so, da je za ustrezno homogenost mešanice prahov, optimalna različna velikost delcev MCC. To nakazuje, da sta oblika delcev in kohezivne lastnosti komponent pomembna faktorja, ki ju je potrebno upoštevati skupaj z velikostjo delcev.

NIR je tehnika, s katero lahko zelo hitro, na ne-invazivni način, ugotovimo ustrezno razmerje velikosti delcev komponent in končno točko mešanja, kar pomeni tudi prihranek energije zaradi optimizacije časa mešanja (55).

Dévay s sodelavci je želel s pomočjo merjenja difuzne reflektance, v NIR področju, spremljati rast pelet med high-shear peletizacijo. Med procesom so v različnih poskusih spreminjali hitrost dovajanja veziva in hitrost mešala, s čimer so dobili pelete različnih lastnosti. Vsem dobljenim frakcijam pelet so določili tudi profil sproščanja modelne ZU (teofilin). Pelete so presejali skozi osem različnih sit, velikosti od 100 μm do 1600 μm . Reflektanco presejanih frakcij so merili z UV/VIS/NIR spektrofotometrom v območju 200-2500 nm in dobljene spektre so obdelali s pomočjo Kubelka-Munk transformacije. Model, ki so ga postavili za določevanje velikosti delcev je dobro napovedoval velikost delcev ($R^2=0,9686$). Profil sproščanja ni pokazal direktne povezave z velikostjo pelet, kar lahko razložimo z različno zgradbo dobljenih pelet (različna poroznost). Pri nespremenjenih pogojih peletizacije, ima velikost delcev velik vpliv na sproščanje in tukaj bi NIR tehnika nudila hitro instrumentalno metodo za medprocesno spremljanje velikosti delcev. Postavljen model bi lahko služil, kot ozadje za simultano optimizacijo procesa (56).

2 NAMEN DELA

V farmacevtski industriji se pogosto srečujemo s problematiko sproščanja ZU iz ogrodnih farmacevtskih oblik s podaljšanim sproščanjem, kjer kot funkcionalno pomožno snov za uravnavanje kinetike sproščanja uporabimo HPMC. Iz literature je znano, da imajo fizikalno-kemijske lastnosti HPMC, kot so stopnja substitucije, stopnja polimerizacije in porazdelitev velikosti delcev pomemben vpliv na sproščanje zdravilnih učinkovin. V magistrski nalogi bomo preučili možnost uporabe NIR tehnike pri napovedovanju velikosti delcev HPMC.

Cilj naloge je sprejeti/ovreči naslednje hipoteze:

1. hipoteza: Razviti PLS (*ang. Partial Least Squares*) model, ki ima ustrezno napovedno moč za velikost delcev HPMC znotraj istega substitucijskega tipa HPMC
2. hipoteza: PLS model, ki ga bomo razvili bo dobro napovedoval velikost delcev HPMC, neodvisno od stopnje viskoznosti HPMC
3. hipoteza: PLS model, ki ga bomo razvili bo dobro napovedoval velikost delcev HPMC, neodvisno od substitucijskega tipa HPMC
4. hipoteza: Razviti PCA (*ang. Principal Component Analysis*) model bo sposoben ločiti različne polimerizacijske tipe HPMC

Primerjali bomo vzorce HPMC dveh različnih proizvajalcev (Shin-Etsu in Dow) ter znotraj tega HPMC različnih viskoznosti in tipov substitucije. Na vseh preučevanih vzorcih bomo izvedli sejnalno analizo in tako dobili različno velike frakcije delcev. Vsaki frakciji bomo s pomočjo NIR spektroskopije posneli spekter, kot primarno referenčno metodo za primerjavo rezultatov in postavitev modela, pa uporabili določitev velikosti delcev s pomočjo laserske difrakcije.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 VZORCI

Vzorci HPMC, ki smo jih uporabili za analizo so podani v tabeli IV. Podana je tudi nominalna viskoznost 2 % vodne raztopine, ki jo je določil proizvajalec.

Tabela IV: Serije opredeljene glede na tip substitucije, proizvajalca in stopnjo viskoznosti.

Tip substitucije	Komercialno ime	Proizvajalec	Stopnja viskoznosti [mPas]*	Serijska številka
2208	Methocel K4M	Dow	2831	UD9840
	Methocel K4M	Dow	4332	UE0952
	Methocel K4M	Dow	4159	UE9011
	Methocel K4M	Dow	4386	DT243235
	Methocel K100LV	Dow	100	UE2819
	Methocel K15M	Dow	19048	DT247522
	Methocel K100M	Dow	101866	DT259596
	Metolose 90SH-4000	ShinEtsu	3740	9115412
	Metolose 90SH-4000SR	ShinEtsu	3630	9095326
	Metolose 90SH-4000SR	ShinEtsu	3940	0065328
	Metolose 90SH-4000SR	ShinEtsu	4140	0075413
	Metolose 90SH-15000SR	ShinEtsu	15800	9045146
	Metolose 90SH-100000SR	ShinEtsu	105000	0035141
2910	Methocel E4M	Dow	3887	DT230020
	Metolose 60SH-4000	ShinEtsu	3700	0028034
	Metolose 60SH-4000	ShinEtsu	3830	0058097
2906	Methocel F4M	Dow	4031	DT272625

Opomba: * nominalna viskoznost 2 % (m/m) vodne raztopine HPMC pri 20°C

SR...oznaka za podaljšano sproščanje, HPMC je namenjen podaljšanemu sproščanju (*ang. »Sustained release«*)

Dow – posrednik za distribucijo Dow Chemical Company je Colorcon, Velika Britanija

ShinEtsu – posredovano iz ShinEtsu Chemical Co.,Ltd., Japonska

3.1.2 REAGENTI

- 96 vol % etanol, puriss, Sigma Aldrich, SZBA1600, Švica
- n-heksan, p.a., Merck, K43910476742, Nemčija

3.1.3 APARATURE ZA PRIPRAVO VZORCEV

- Tehnica Mettler PM2000, Švica
- Aparat za sejhalno analizo AS200 digit Retsch, Japonska
- Antistatične kroglice za sita

- Viale z ravnim dnom in ustrezni zamaški, Bruker, Nemčija
- Sita Retch GmbH&Co, velikost in serijska št. so podana v tabeli V

Tabela V: Sita za sejalno analizo, opredeljena glede na velikost odprtin sita in serijsko številko.

Velikost sita [μm]	Serijska številka
200	557756
180	443340
150	454760
125	454758
100	551810
75	5583046
71	03034515
63	5576245
53	03033729
45	451617
32	06027511

3.1.4 NAPRAVE ZA ANALIZO

- Bližnji infrardeči spektrometer, Multi-Purpose Analyzer, Bruker Optics, Nemčija
- Stereomikroskop, Olympus SZX12, Japonska
- Aparat za lasersko difrakcijo: Mastersizer S, Malvern Instruments, Velika Britanija

3.2 METODE

3.2.1 SEJALNA ANALIZA (57)

Sejalna analiza je ena najstarejših metod za razvrstitev prahov in granul glede na porazdelitev velikosti delcev. Delci se porazdelijo glede na njihovo povprečno dimenzijsko velikost (ponavadi odvisna predvsem od širine, debeline delca in manj od dolžine). Mehansko stresanje je najprimernejše za delce, ki so večji od 75 μm ; manjši delci imajo nizko maso, kar ne zagotavlja dovolj velike sile, da bi premagala silo kohezije in adhezije, ki povzroči lepljenje delcev drug na drugega ter lepljenje na sito. Za manjše delce se priporoča uporabo sejanja s pomočjo zračnega toka ali »zvočnega« (ang. *Sonic*) sita.

Priporočena masa vzorca je vsaj 25 g, odvisno od gostote delcev ali granul. Vzorec prenesemo na zgornje sito, sledijo sita padajoče velikosti. Čas stresanja določimo tako, da vsake 5 minut tehtamo sito, stresanje izvajamo do konstantne mase; tresenje mora biti vedno konstantne hitrosti.

3.2.2 NIR (BLIŽNJA INFRARDEČA SPEKTROSKOPIJA) (58)

Teoretične osnove spektroskopije v bližnjem IR območju svetlobe, smo obdelali že v uvodu; tu pa se bomo osredotočili bolj na praktične vidike tehnike.

Faktorji, ki vplivajo na meritve:

- vlaga in ostanki topil,
- temperatura vzorca,
- debelina vzorca,
- heterogenost, sila stiskanja tablet, velikost delcev, obloge tablet,
- polimorfizem,
- staranje vzorcev (kemijske, fizikalne, optične spremembe vzorca).

Preverjanje delovanja instrumenta:

- preverjanje valovne dolžine skale,
- ponovljivost valovne dolžine,
- linearnost in stabilnost odziva,
- šum.

V eksperimentalnem delu smo uporabili instrument Multi-Purpose Analyzer (MPA), Bruker Optics (slika 3.3)



Slika 3.3: Fourier-Transform (FT)-NIR spektrometer

Instrument omogoča merjenje preko različnih enot (63):

- ang. »*sample compartment*« (namenjen predvsem za bistre tekočine)
- ang. »*integrating sphere*« (namenjen za praške granule, heterogene vzorce, emulzije)
- ang. »*external transmision*« (namenjen za tablete ali kapsule, kjer žarek potuje skozi snov)
- ang. »*fibre optics*« (namenjen za merjenje večjih količin trdnih oz. tekočih snovi s pomočjo optične sonde)

Integrating sphere (64)

»Integrating sphere« je enota z votlino sferične oblike obdana z zlatom, ki dobro odbija svetlobo in na ta način zagotavlja dobro sipanje svetlobe v vse smeri. Omogoča merjenje večje površine vzorca naenkrat, saj meri skozi celotno okno (premera približno 12 mm), kamor postavimo vzorec. Ker zbira svetlobo iz vseh kotov, se zmanjša vpliv morebitne nehomogenosti vzorca, neodvisno od postavitve vzorca.

Ponavadi je okno sfere obrnjeno navzgor, kamor lahko postavimo vialo z vzorcem. Prednost tega načina merjenja je tudi nedestruktivnost vzorca ter možnost merjenja toksičnih ali občutljivih materialov, saj vialo lahko zapremo.

Detektor je ponavadi sestavni del sfere in s svojo bližino tudi zmanjša šum naprave.

3.2.2.1 Kemometrične metode za ocenjevanje podatkov - Multivariantni kalibracijski modeli (59, 60)

Kalibracija je proces gradnje matematičnega modela in se navezuje na odziv analiznega instrumenta glede na lastnosti vzorca. To naredimo s pomočjo multivariantnih kalibracijskih metod (56).

Multivariantna kalibracija upošteva kombinacijo velikih količin večdimenzionalnih podatkov, ki jih nosi posneti spekter, z odgovarjajočimi podatki pridobljenimi z referenčno metodo. Za razliko od univariantnih kalibracijskih modelov (npr. pridobivanje podatkov pri UV-VIS spektroskopiji), kjer se samo eden podatek s spektra primerja z referenčno vrednostjo, se pri multivariantnih kalibracijah primerja več izbranih podatkov, z vrednostmi, ki nam jih poda spekter. Rešitve k temu nam ponujajo različne kalibracijske metode (matematične transformacije), kot so :

- multipla linearna regresija (*ang. Multiple Linear Regression - MLR*),
- regresija na osnovi glavnih komponent (*ang. Principal Component Regression -PCR*)
- regresija na osnovi vsote najmanjših kvadratov (*ang. Partial Least Squares - PLS*)
- metoda glavnih komponent (*ang. Principal Component Analysis -PCA*)

Za kvalitativno analizo se najpogosteje uporablja PCA, za kvantitativno pa PLS model.

PCA (42, 43, 49, 54, 61)

To je način identificiranja vzorcev (logičnih povezav) v podatkih, tako da se poudarijo njihove podobnosti oziroma razlike (62). S pomočjo koncentriranja in združevanja zmanjšamo število spremenljivk (*ang.* »Scores«) v osnovnem setu podatkov ter jih prenesemo v manj dimenzionalni prostor, ki ga lahko enostavneje obvladujemo. Osnovno izhodišče te metode je predpostavka, da so merljive količine med seboj odvisne oz. so med njimi določene korelacije. Cilj metode je poiskati tiste koordinate, ki so v danem merskem prostoru najbolj značilne (nosijo največji odstotek informacij). Tu ne gre za izbor nekaj posameznih koordinat izmed večjega števila že znanih, ampak za izbor manjšega števila linearnih kombinacij starih koordinat, predstavljenih v novih oseh. Nove spremenljivke imenujemo latentne oz. glavne spremenljivke (*ang.* *Principal Components* – PC ali *latent variables*) in so osnovane na način tako, da predstavljajo največjo varianco v setu podatkov. Prva PC, ki jo program izračuna predstavlja največji delež informacij o spektrih, zato je njena vrednost največja; vrednost vsake naslednje pa nosi manj in manj informacij, dokler ne ostane samo še šum osnovnih podatkov.

Enostavneje rečemo, da smo s postopkom PCA izluščili iz NIR spektrov tisti del strukture, ki je koreliran z lastnostjo, ki jo v danem setu podatkov iščemo. Ostalo, kar nas ne zanima, s postopkom PCA odstranimo kot šum.

PCA je kvalitativna metoda, s pomočjo katere zelo hitro ugotovimo, ali je kakovost nekega materiala enaka tisti, ki smo jo definirali s setom podatkov kot ustrezno in sprejemljivo. Spremljamo ali zadetki vzorca sovpadajo z zadetki tistih meritev, ki so ocenjeni kot ustrezna kvaliteta. PCA uporabimo torej za vizualizacijo podatkov in je osnova mnogih drugih kemometričnih tehnik.

PLS (43, 49, 59)

PLS metodo uporabimo, kadar želimo z modelom napovedati različne kvantitativne lastnosti vzorca. Cilj PLS metode je ugotoviti linearno povezavo med dvema matrikama; med spektralnimi podatki X in referenčnimi vrednostmi (lastnost, ki jo določamo) Y. Tudi pri tej metodi se spektralni podatki prenesejo v nov merski prostor, kjer so upoštevani samo podatki, ki imajo največjo vrednost. Z variiranjem kvantitativnega parametra in s pomočjo regresije najmanjših kvadratov se izračunajo nove koordinate. Te nove koordinate

tako že nosijo informacijo o kvantitativni vrednosti, vendar te vrednosti niso vzete absolutno, saj vključujejo že neko sistematično napako (t.i. vsoto ostankov).

Metoda temelji na spremembah, ki jih zazna v obeh podatkovnih nizih (spektri in podatki referenčne metode) in iz katerih nato matematično poišče medsebojno soodvisnost.

Princip delovanja PLS metode – prikaz na korakih za postavitev modela (45, 59, 60):

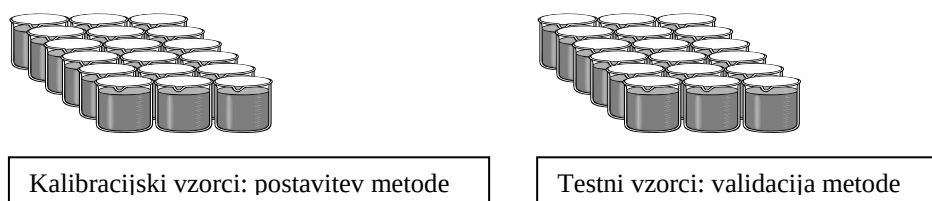
- Posnamemo spektre dovolj velikega števila reprezentativnih vzorcev
- Naredimo analizo z referenčno metodo
- Iz posnetih spektrov naredimo dva niza podatkov; v enem so kalibracijski vzorci, v drugem pa validacijski vzorci (vsi posneti vzorci imajo znano vrednost, določeno z referenčno metodo).
- Spektre lahko obdelamo z različnimi metodami za predobdelavo spektrov (normalizacije, odvodi, glajenje linije, rezanje spektrov...)
- Uporabimo metodo PLS, ki najde linearno regresijo s projiciranjem napovednih oz. opazovanih vrednosti v novi prostor; drugače rečeno, najde najboljšo korelacijo med spektri in referenčnimi podatki .
- Program ponudi različno število faktorjev (rangov), ki ustrezajo medsebojnim spremembam, ki jih je zaznal. Pomembno je, da izberemo optimalno število faktorjev, saj prenizko število faktorjev vodi v *ang. »underfitting«* (pomeni, da v spektru ni zaznanih dovolj sprememb); previsoko število faktorjev pa vodi v *ang. »overfitting«* (pomeni, da se zaznajo že premajhne spremembe – šum).
- S pomočjo validacije metode razberemo statistične podatke, ki nam povedo kakšna je korelacija med spektri in referenčnimi vrednostmi. Če smo s statistiko zadovoljni lahko model shranimo, oziroma ga prilagodimo dokler ne dobimo zadovoljivih rezultatov (izločimo sumljive vrednosti (*ang. »outlier-je«*), spremenimo število faktorjev, naredimo drugačne predobdelave spektrov)
- Na podlagi postavljenega modela, lahko analiziramo nove (neznane) vzorce.

3.2.2.2 Validacija modela

Postavljen model moramo validirati, za kar sta dve možni metodi: eksterna validacija in interna validacija (59, 60).

Validacija testnega niza (eksterna validacija):

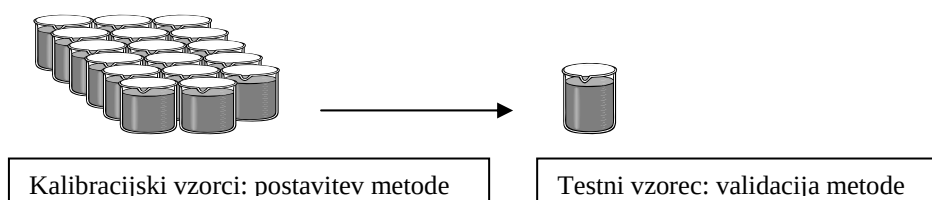
Iz posnetih spektrov (vzorcev) naredimo dva niza; kalibracijski niz in validacijski-testni niz, vsak predstavlja približno 50 % vzorcev (slika 3.1). Slabost te metode je, da niso vsi vzorci uporabljeni za kalibracijo. Metoda je primerna za veliko število vzorcev (npr. 100 in več).



Slika 3.1: Validacija testnega niza.

Navzkrižna validacija (interna validacija):

Iz posnetih spektrov (vzorcev) imamo en niz (kalibracijski niz) in iz tega zaporedno jemljemo po en vzorec za validacijo (ob dovolj velikem številu vzorcev lahko tudi več) terga nato vrnemo nazaj v kalibracijski niz (slika 3.2). To počnemo toliko časa, da so vsi vzorci iz kalibracijskega niza uporabljeni za validacijo, kar je tudi prednost te metode. Slabost tega so dolgi časi potrebni za validacijo in izračun nižje napake, kot pri rutinski uporabi metode.



Slika 3.2: Navzkrižna validacija.

Za vsako validacijo izračunamo napako modeliranja – *ang. root mean square error of calibration* (RMSEC), ki mora biti čim nižja. Z validacijo prepoznamo meritve, ki odstopajo (*ang. »outlier-je«*), najprimernejše območje frekvenc in optimalno število faktorjev. Zelo pomembno je, da dobimo čim boljšo korelacijo med spektralnimi in referenčnimi podatki, saj samo na ta način lahko dobimo dobre analitske rezultate.

Pomembno je, da so vzorci vselej enako pripravljeni oz. enake sestave kot kalibracijski niz vzorcev, saj je za vsako spremembo potrebno ponovno postaviti nov kalibracijski model.

3.2.3 OPTIČNA MIKROSKOPIJA (65)

Karakterizacija delcev s pomočjo optične mikroskopije je primerna za delce velikosti 1 μm ali večje in je še posebej uporabna za nesferične delce. Metoda lahko služi tudi kot osnova za kalibracija hitrejših, rutinskih metod.

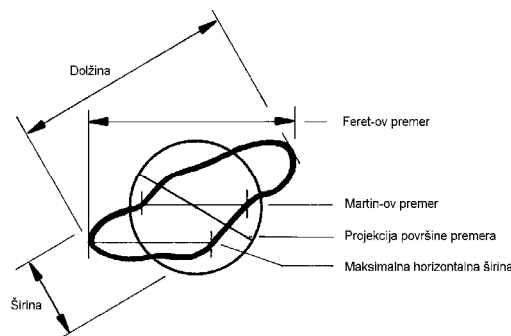
Zahteve za optični mikroskop:

- aparatura mora biti zaščiten pred vibracijami
- natančna postavitev, lega vseh optičnih elementov je ključnega pomena
- enakomerna svetloba, prilagodljive intenzitete z možnostjo barvnih filtrov
- povečava, ki zagotavlja ustrezno ločbo slike delcev

Uporabnost optične mikroskopije:

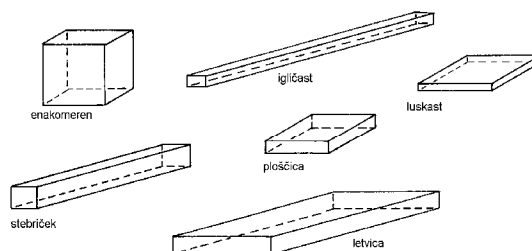
- opredelitev kristaliničnosti substance
- limitni test za določanje velikosti delcev
- opredelitev velikosti delcev
- opredelitev oblike delcev

Pogosto uporabljene dimenzije velikosti delca (Slika 3.4):



Slika 3.4: Pogosto uporabljene dimenzije velikosti delca: *Feret-ov premer*: razdalja med namišljeno paralelno linijo, tangentno na naključno orientiran delec in pravokotno na skalo okularja; *Martin-ov premer*: premer delca v točki, ki razmejuje naključno orientiran delec v dve enaki projekciji površine; *Projekcija površine premera*: premer kroga, ki ima enako površino kot delec; *Dolžina*: najdaljša dimenzija delca orientirana paralelno na skalo okularja; *Širina*: najdaljša dimenzija delca, merjena pod desnim kotom glede na dolžino.

Opredelitev oblike delca predstavlja slika 3.5:



Slika 3.5: Prikaz pogostih oblik delcev

3.2.4 LASERSKA DIFRAKCIJA (66, 67)

Laserska difrakcija je tehnika s katero določujemo porazdelitev velikosti delcev (velikostnega razreda 0,1 μm do 3 mm). Temelji na difrakciji monokromatske svetlobe, ko žarek pade na delec. Tehnika predvideva, da je delec sferičen, zato se rezultati lahko razlikujejo od metod, ki merijo velikost delca glede na druge fizikalne lastnosti (npr. sedimentacija, sejalna analiza). Velikost delcev lahko merimo v različnih disperzijskih sistemih: praški, aerosoli, spreji, suspenzije, emulzije, plinski mehurčki v tekočini.

Naprava za lasersko difrakcijo je sestavljen iz treh glavnih komponent: predel za pripravo vzorca, optična enota (izvor laserske svetlobe in niz detektorjev pod različnimi koti) ter računalniški sistem.

Princip merjenja:

Trden vzorec dispergiramo v ustrezni količini tekočine ali plina (, da dobimo primerno koncentracijo suspendiranih delcev) in zmes »pošljemo« skozi merilno celico, kamor laser seva monokromatsko svetlobo. Delci sipajo svetlobo pod različnimi koti; večji kot je delec, manjši kot sipanja zaznajo detektorji. Ker algoritmi instrumenta za lasersko difrakcijo temeljijo na predpostavki, da so delci sferični, dobimo tem večjo napako, čim bolj se oblika delcev razlikuje od oblike krogle. Rezultat, ki ga dobimo je podan volumsko oz. velikost delca je izražena kot premer krogle, ki bi imela enak volumen kot analiziran delec. Pri pripravi vzorca moramo biti pozorni na koncentracijo vzorca in na morebitne aglomerate, saj zaradi tega lahko pridemo do napačnih rezultatov. Poznavanje oblike delcev v vzorcu (pomagamo si lahko z mikroskopsko analizo) je izrednega pomena, če želimo pravilno interpretirati rezultate z lasersko difrakcijo, saj tehnika še ni dovolj razvita, da bi omogočala nedvoumno sklepanje na velikost in obliko delcev brez komplementarnih tehnik.

Pomembno je še, da se instrumenti za merjenje laserske difrakcije, različnih proizvajalcev in tudi instrumenti istega proizvajalca različnih generacij, med sabo bistveno razlikujejo, tako v pretvorbenih algoritmih, kot tudi konfiguracijah detektorjev. Te razlike lahko bistveno vplivajo na rezultat, zato moramo velikosti delcev vedno primerjati glede na tiste, ki so bili izmerjeni na enakem instrumentu.

4 EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 SEJALNA ANALIZA

4.1.1 POTEK DELA

Pred analizo smo stehali vsa sita z dodanimi kroglicami, ki olajšajo stresanje oz. preprečujejo lepljenje prahu na stene sit. V vsako sito smo dali po štiri kroglice. Natehtali smo približno 30 g vzorca in ga stresli na sito največje velikosti, kateremu so sledila sita padajoče velikosti. V prvi cikel stresanja smo namestili prvih sedem velikostnih sit in izvedli analizo sejanja (20 minut, z amplitudo 50 Hz). Na koncu sejanja smo stehali vsako sito. Iz razlik med začetno in končno maso sita, smo izračunali maso posamezne frakcije (velikostnega razreda delcev). V drugem ciklu je bilo najmanjših sedem velikostnih razredov sit (v padajočem velikostnem redu). Na sito največje velikosti smo stresli ostanek po prejšnjega cikla sejanja ter ponovno izvedli analizo sejanja. Presejane frakcije smo nato ponovno stehali. Na ta način smo dobili porazdelitev velikosti delcev za različne serije in jih primerjali med sabo. Vsako frakcijo smo prenesli v vialo – dopolnili smo jo do približno ene tretjine in jo ustrezno označili. Vzorci so bili tako pripravljeni za direktno meritev z NIR-napravo.

4.2 NIR (Bližnja infrardeča spektroskopija)

PROGRAMSKA OPREMA

Snemanje spektrov smo izvajali s pomočjo programske opreme OPUS verzija 6.5.

DNEVNA VALIDACIJA

Vsakodnevno smo izvajali validacijo posamezne enote, ki smo ga uporabljali za merjenje – v našem primeru je to *Integrating sphere*. Za to se uporablja poseben – močno refleksijski standard (sestavlja ga material *Spectralon®*), ki ga namestimo na okno optične enote.

4.2.1 POTEK DELA

Nastavitve merjenja:

- enota: *integrating sphere*
- resolucija: 8 cm⁻¹
- število posnetkov (*ang. Scan*): 32
- način merjenja: reflektanca

Preveritev ustreznosti signala izvora

Snemanje ozadja: za vsako serijo HPMC posnamemo ozadje pred meritvijo vzorcev

Snemanje vzorcev: vsaki presejani frakciji ene serije smo trikrat posneli spekter. Posneli smo tudi spektre nesejanih frakcij HPMC (povprečni vzorec vsake serije).

Obdelava podatkov in postavitve modela

- PLS model:

Model smo postavili s pomočjo programa Opus Quant2 tako, da smo posnetim spektrom vnesli podatke za velikost delcev, ki smo jih določili z referenčno metodo – lasersko difrakcijo. Naključno smo si izbrali serije, ki so nam služile za postavitev modela in vsaj eno serijo s katero smo preverili napako napovedi modela. Uporabili smo navzkrižno validacijo modela in izključili morebitne »outlier-je« (nezanesljive vrednosti oz. meritve), s čimer smo pripomogli k izboljšanju modela.

- PCA model:

Iz spektrov povprečnih vzorcev smo s pomočjo Opus Quant2 postavili PCA model.

4.3 OPTIČNA MIKROSKOPIJA

4.3.1 POTEK DELA

Vse serije HPMC smo optično ocenili oz. pregledali pod stereo-mikroskopom. Homogen vzorec HPMC smo nanесли na objektno stekelce in ga pogledali pod 63-kratno ali 90-kratno povečavo. Ko smo dobili sliko dobre ločljivosti (s premikanjem mikro- oz. makrovijaka, z zapiranjem zaslonke in prilagoditvijo moči svetlobnega vira) smo jo shranili. Na ta način smo posneli mikroskopske slike vseh preiskovanih serij.

4.4 LASERSKA DIFRAKCIJA

Kot netopilo za suspenzijo delcev HPMC smo si izbrali 96 % etanol, ki je cenovno ugodno netoksično topilo, kar je pri tako veliki količini uporabljenega netopila izjemnega pomena.

4.4.1 POTEK DELA

Vzorec smo suspendirali v etanolu, tako da smo vedno imeli približno enako prepustnost svetlobe skozi suspenzijo delcev (*ang. obscuration*). Hitrost mešala v suspenziji, ki je krožila preko merilne celice, je bila za vse meritve konstantna. Izmerili smo tri paralelke ene frakcije velikosti za vsako serijo. Rezultati so podani v volumskem razmerju velikosti delcev kot premer imenovan D[4,3] (volumski povprečni premer).

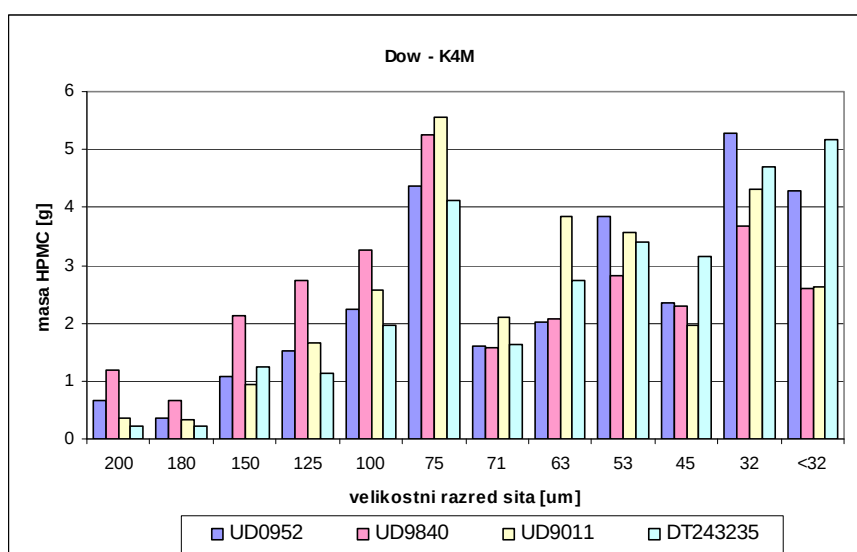
Nastavitve:

- prepustnost svetlobe (*ang. obscuration*): okoli 20 %
- hitrost mešala: 1500 obratov/minuto
- refrakcijski indeks etanola: 1,33
- gostota vzorca: 1,26 g/ml

5.1 SEJALNA ANALIZA

Presejali smo HPMC različnih tipov substitucij in stopenj viskoznosti, različnih serij dveh različnih proizvajalcev (Dow in Shin-Etsu).

Grafični prikaz povprečne porazdelitve delcev znotraj dvanajstih velikostnih razredov proizvajalcev Dow oz. Shin-Etsu je prikazana na sliki 5.1. Abscisa prikazuje velikostni razred sita (v μm), ki je zadržal določen delež HPMC; ordinata pa prikazuje maso (v gramih), ki je ostala na situ pripadajoče velikosti. Tehtali smo približno 30 g HPMC.

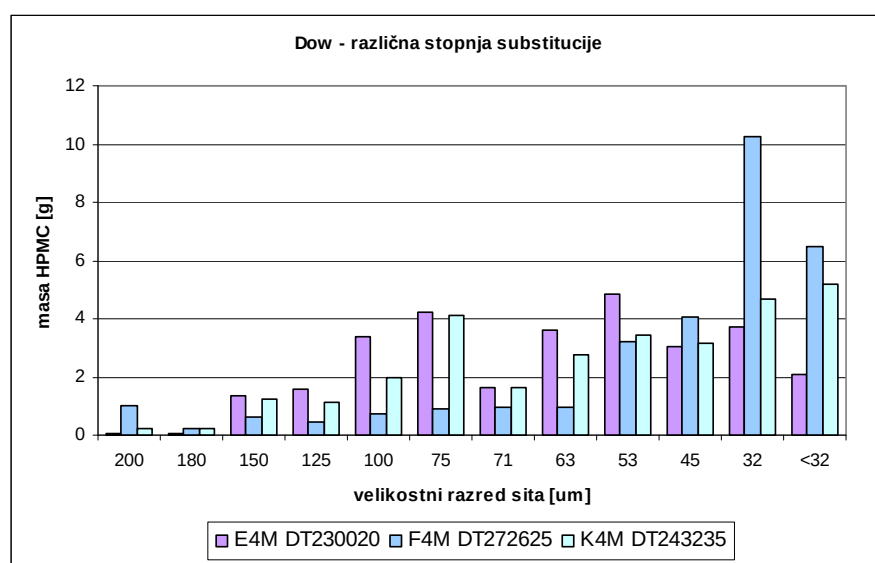


Slika 5.1: Porazdelitev velikosti delcev HPMC K4M (proizvajalec Dow)

Na sliki 5.1 lahko vidimo nekoliko neponovljiv trend porazdelitve delcev različnih serij istega proizvajalca HPMC K4M. Serija UD9840 ima porazdelitev velikosti delcev nekoliko pomaknjeno k večjim velikostim delcev, kar bi lahko imelo za posledico nekoliko hitrejše sproščanje iz FO, kamor bi jo vgradili. V posebni raziskavi je Devjak Novak S. s sodelavci primerjala profile raztapljanja med serijama UD9840 ter UD0952. Prišli so do zaključkov, da ima serija UD9840, kot posledica nižje viskoznosti značilno hitrejše sproščanje od primerjalne serije (68). Poleg nižje viskoznosti serije UD9840, pa verjetno k hitrejšemu sproščanju doprinesejo tudi nekoliko večji delci. Večji delci predstavljajo manjšo specifično površino za omočitev z vodo (medijem), kar zmanjša hitrost hidratacije in geliranja. Voda hitreje penetrira v notranjost FO in posledično hitreje sprošča ZU iz nje (11).

Ravno obratno – pomik velikosti delcev k nižjim vrednostim–lahko opazimo pri serijah DT243235, UD0952 in UD9011. Tu lahko pričakujemo nekoliko bolj upočasnjeno sproščanje ZU iz FO glede na serijo UD9840. Če bi bila velikost delcev HPMC edini parameter, ki bi vplival na hitrost sproščanja ZU iz FO, bi imele FO tega proizvajalca nekoliko neponovljive profile sproščanja.

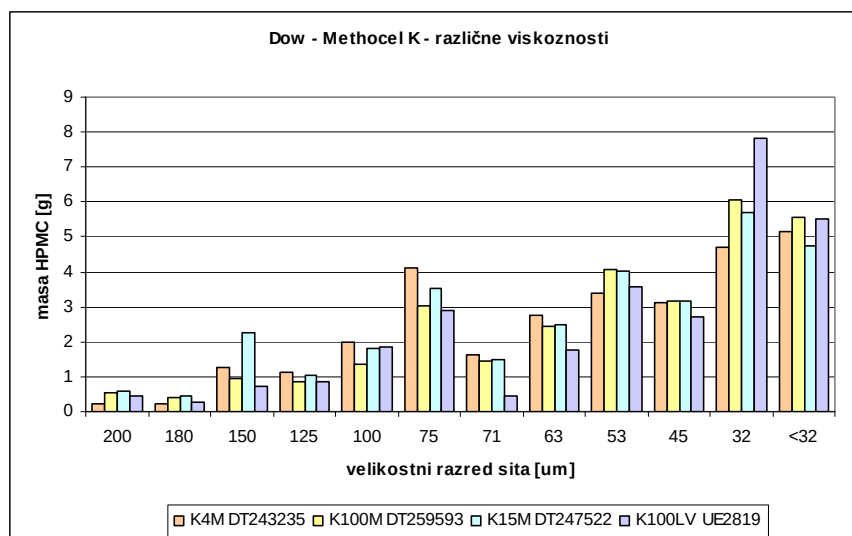
Na splošno lahko iz sejalne analize razberemo, da ima proizvajalec Dow bi- do tri-modalno porazdelitev velikosti delcev.



Slika 5.2: Porazdelitev velikosti delcev HPMC različne stopnje substitucije (proizvajalec Dow)

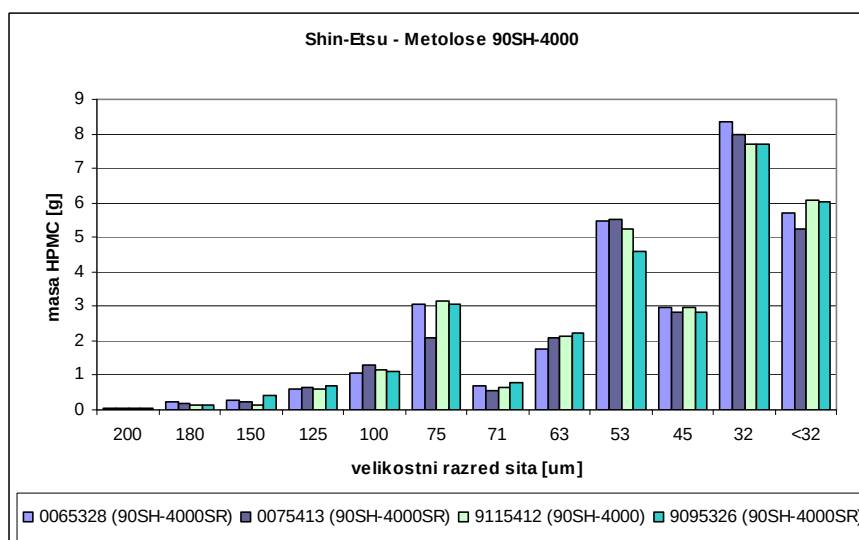
Iz slike 5.2 lahko vidimo veliko razliko v porazdelitvi velikosti delcev glede na stopnjo substitucije, istega proizvajalca, enake viskoznosti HPMC. Tip substitucije 2906 (Methocel F) se sicer v farmacevtski industriji zelo malo uporablja, a smo ga vseeno uporabili za predstavitev porazdelitve delcev različnega tipa substitucije. Na ta način smo dobili dobro predstavo o variabilnosti povezani z velikostjo delcev HPMC. Tip substitucije 2906 še posebej izkazuje premik k manjšim velikostim delcev, medtem ko pri tipu substitucije 2910 (Methocel E) opazimo dokaj enakomerno porazdelitev velikosti.

Slika 5.3 prikazuje kako je različna viskoznost HPMC (proizvajalca Dow) povezana z porazdelitvijo delcev. Na splošno lahko rečemo, da viskoznost ni povezana s trendom te porazdelitve. Nekoliko različni deleži posameznega velikostnega razreda so najverjetneje posledica medserijske variabilnosti (kar prikazuje tudi slika 5.1) in ne različne viskoznosti HPMC.



Slika 5.3: Porazdelitev velikosti delcev HPMC Methocel K različne viskoznosti (proizvajalec Dow)

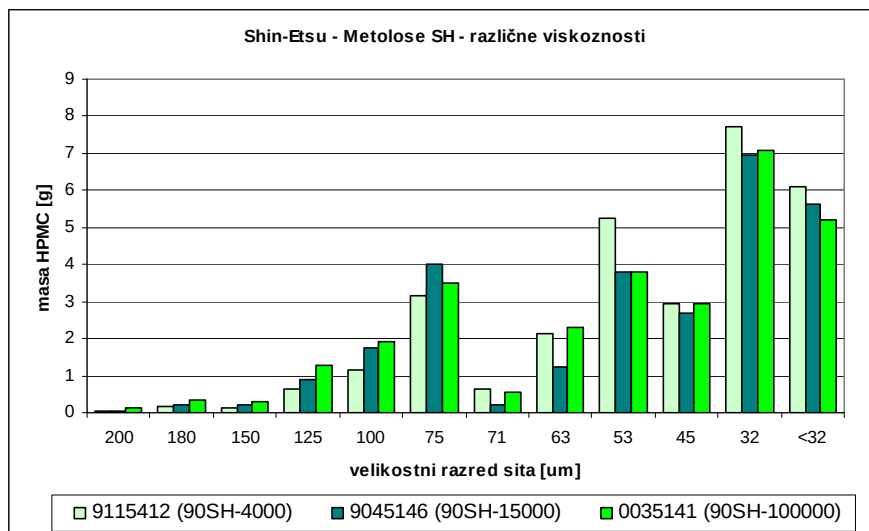
Na sliki 5.4 je prikazana porazdelitev velikosti delcev HPMC, za serije tipa substitucije 2208, proizvajalca Shin-Etsu. Tri serije imajo oznako SR, kar pomeni da je HPMC namenjen predvsem za podaljšano sproščanje. Ne glede na to, lahko vidimo da med njimi ni večjih razlik v porazdelitvi velikosti delcev. Lahko rečemo, da proizvajalec zagotavlja precej enakomerno porazdelitev velikosti delcev. Če predpostavimo, da je velikost delcev ena izmed glavnih faktorjev, ki vpliva na hitrost sproščanja, lahko predvidevamo da bi pri proizvajalcu Shin-Etsu dobili bolj ponovljive profile sproščanja ZU iz FO, kot pri proizvajalcu Dow.



Opomba: kratica SR – HPMC je namenjen za podaljšano sproščanje (*ang.* »sustained release«)

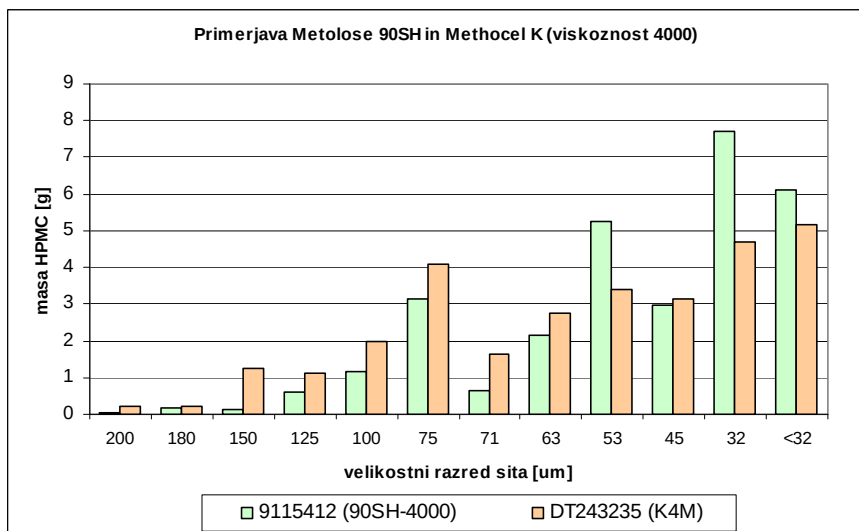
Slika 5.4: Porazdelitev velikosti delcev HPMC Metolose 90SH, viskoznosti 4000

Slika 5.5 prikazuje različno viskoznost istega tipa substitucije, proizvajalca Shin-Etsu. Lahko rečemo, da ni pomembnih razlik v porazdelitvi velikosti različnih viskoznosti HPMC. Proizvajalec zagotavlja precej ponovljive velikosti delcev tako znotraj serij enake viskoznosti (slika 5.4), kot tudi med različnimi viskoznostmi HPMC.



Slika 5.5: Porazdelitev velikosti delcev HPMC Metolose 90SH, različnih viskoznosti

Slika 5.6 nazorno prikazuje razlike v porazdelitvi velikosti delcev HPMC dveh različnih proizvajalcev.



Slika 5.6: Primerjava Methocel K in Metolose 90SH (viskoznost 4000)

Enak tip substitucije ima odvisno od proizvajalca, očitno drugačno porazdelitev delcev, s tem tudi povprečno velikost delcev. Proizvajalec Shin-Etsu ima porazdelitev delcev pomaknjeno k nekoliko nižjim velikostnem razredom velikosti delcev HPMC, glede na proizvajalca Dow, kjer vidimo kar nekaj delcev večjih od 150 μm. Razlog temu je verjetno

drugačna izhodna surovina, postopek proizvodnje in sintezne poti ter pristopi k zagotavljanju kakovosti končne oblike HPMC (18, 21). Če bi želeli v neki farmacevtski obliki zamenjati proizvajalca pomožne snovi HPMC, bi verjetno morali prilagoditi količino oz. vrsto HPMC, da bi dobili primerljiv profil sproščanja ZU.

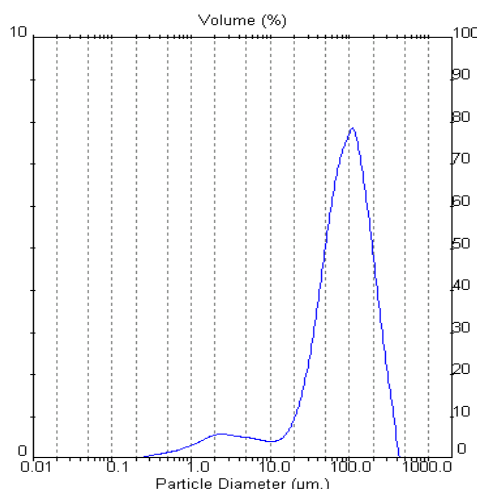
5.2 LASERSKA DIFRAKCIJA

Laserska difrakcija je predstavljala referenčno metodo s katero smo določili velikost delcev posamezne presejane frakcije. Vrednosti so podane v obliki volumnske velikosti delcev, zato se velikostni razredi, ki smo jih dobili s pomočjo sejalne analize razlikujejo od vrednosti dobljene z metodo laserske difrakcije.

Pri frakcijah, kjer smo dobili manj ponovljive meritve med paralelkami smo naredili več kot tri meritve. Vse meritve so podane v tabelah (glej prilogo 1); prikazano je povprečje vseh paralelek, standardna deviacija in relativna standardna napaka za vsako frakcijo velikostnega razreda velikosti delcev HPMC.

Frakcije posameznih serij, ki nimajo vpisane nobene vrednosti za velikost delcev določene z metodo laserske difrakcije, so imele premalo vzorca za zanesljivo meritev z metodo bližnjega infrardečega sevanja, zato tudi nismo določili velikosti delcev z referenčno metodo. Če smo opazili neponovljivost prvih treh paralelek, smo naredili še eno ali dve dodatni meritvi.

Vsaki seriji smo izmerili tudi (povprečni) vzorec tako, da smo dobili povprečno velikost delcev ter distribucijo povprečnega vzorca. Vse serije so imele približno enako obliko porazdelitve, in sicer bi-modalno. Spodnja slika 5.7 prikazuje naključno izbrano serijo, ki je reprezentativna za vse merjene serije .



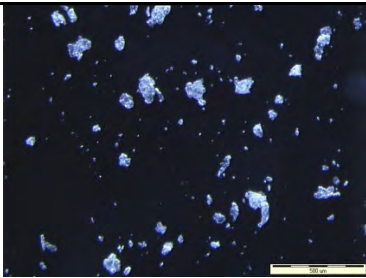
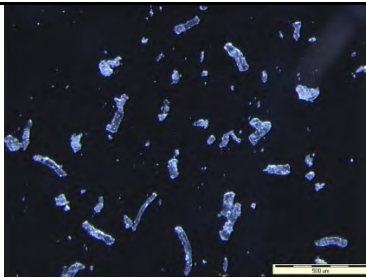
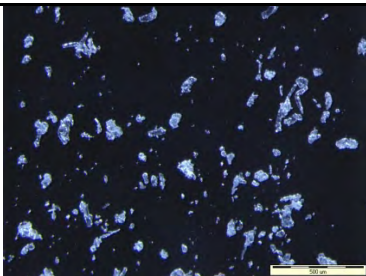
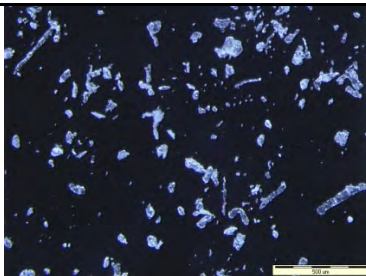
Slika 5.7: Prikaz volumnske porazdelitve velikosti delcev naključnega povprečnega vzorca HPMC (ne-sejana serija DT243235)

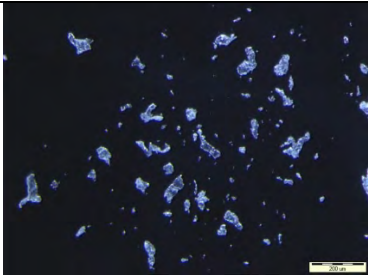
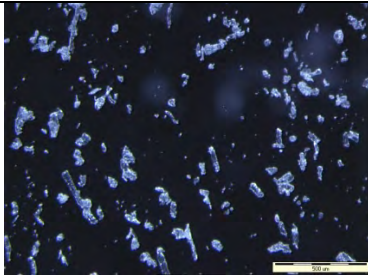
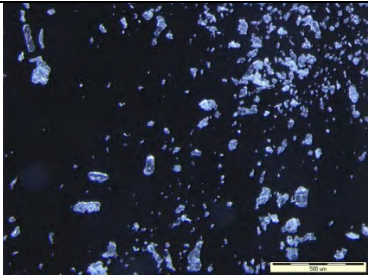
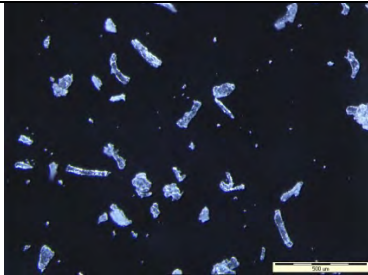
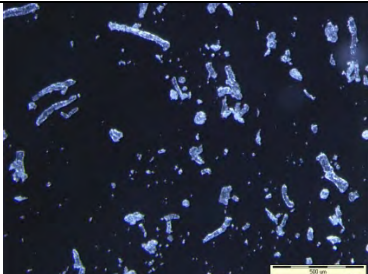
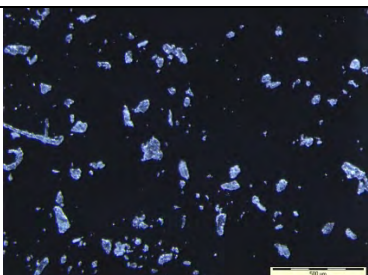
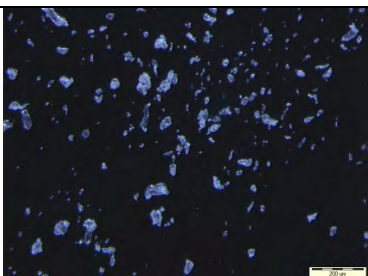
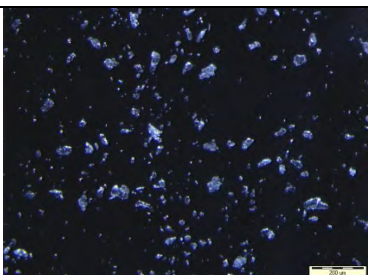
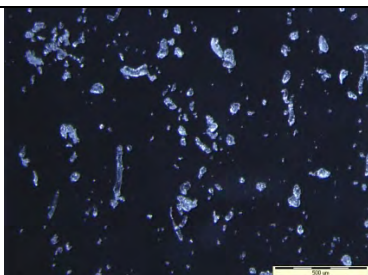
Z lasersko difrakcijo vidimo nekoliko drugačno obliko krivulje, kot pri sejalni analizi, kar smo tudi pričakovali. Tudi, če so prisotni številni manjši delci, imajo le ti veliko manjši (skupni) volumen kot manj številčni veliki delci. Kljub temu pričakujemo linearno soodvisnost med velikostjo delcev, ki smo jih so bili s sejalno analizo oziroma spektri, ki smo jih posneli z NIR-om in velikostjo delcev, ki smo jo določili z lasersko difrakcijo.

5.3 OPTIČNA MIKROSKOPIJA

Pri pregledu posameznih serij z optično mikroskopijo smo opazili, da imajo nekatere serije veliko večji delež delcev, ki so igličaste oblike oziroma oblike stebrička. In sicer lahko rečemo, da se pri proizvajalcu Shin-Etsu v veliko večji meri pojavljajo slednje oblike delcev, kot pri proizvajalcu Dow. Tu lahko še enkrat poudarimo, da imata proizvajalca različni izhodni surovini ter sintezni poti, kar lahko pojasni razlike v obliki delcev (18, 21). V spodnji tabeli VI so nazorno prikazane mikroskopske slike in iz njih vidne razlike med proizvajalcema. Glede na to, da smo pri sejalni analizi proizvajalca Shin-Etsu dobili zelo nizek delež zgornjih velikostnih razredov velikosti delcev, sklepamo da so igličasti delci prehajali sita preko najmanjšega premera svoje velikosti.

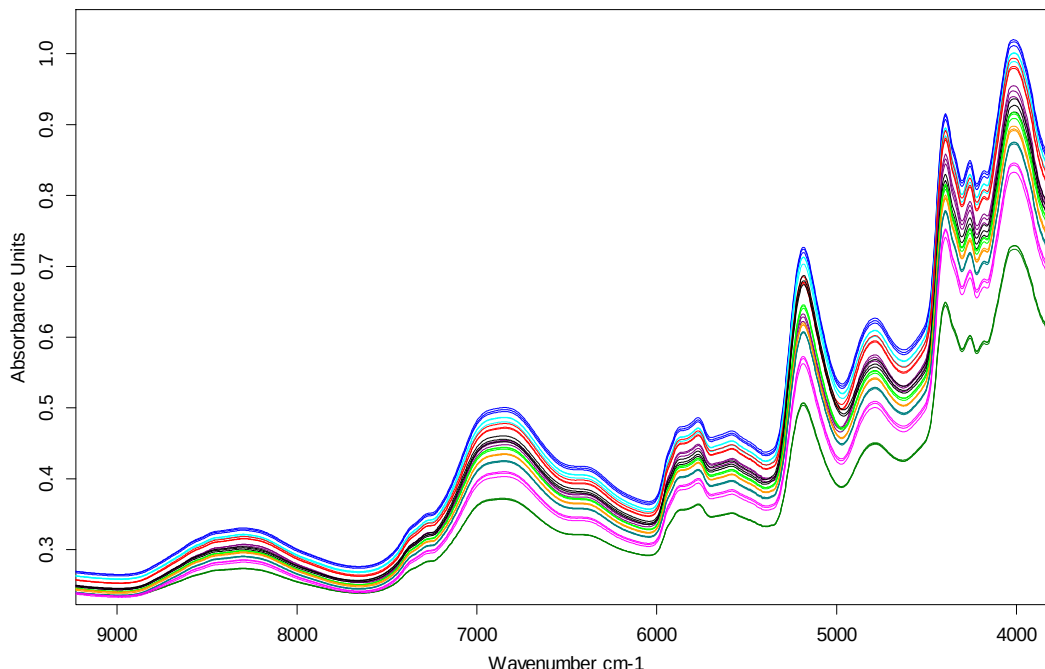
Tabela VI: Prikaz mikroskopskih slik HPMC.

Tip Substitucije	Proizvajalec Dow	Proizvajalec Shin-Etsu
2208	 K4M UD9840	 90SH-4000 9115412
	 K4M UD0952	 90SH-4000SR 9095326

	 K4M UE9011	 90SH-4000SR 0065328
	 K4M DT243235	 90SH-4000SR 0075413
	 K100LV UE2819	
	 K15M DT247522	
	 K100M DT259593	
2910	 E4M DT230020	 60SH-4000 0028034

5.4 BLIŽNJA INFRARDEČA SPEKTROSKOPIJA

Po sejalni analizi smo vsem frakcijam določene serije posneli spektre. Spektri so se večinoma pri vseh serijah vizualno zelo lepo ločili glede na naraščajoči oz. padajoči velikostni razred velikosti delcev (prikazano na sliki 5.8)



Slika 5.8: Prikaz spektralnega območja od 9200 do 3800 (serija: DT243235), kjer HPMC najbolj izraža nadtone in kombinacije vezi. Spektri se lepo ločijo glede na velikost delcev HPMC od 150 μm (modra barva) do manj od 32 μm (zelena barva).

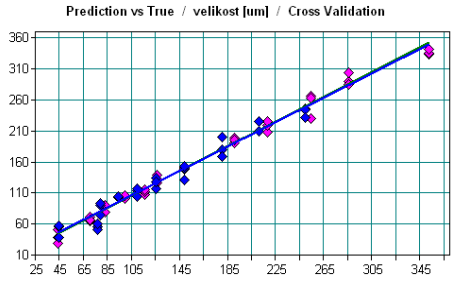
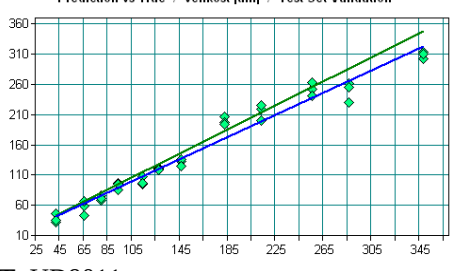
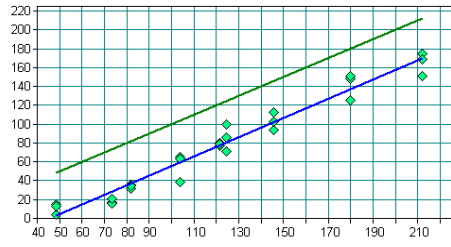
Posnetim spektrom smo s pomočjo programa Opus–Quant2 postavili PLS model in preverili njegovo napovedno moč z naključno izbrano serijo.

Določili smo determinacijski koeficient (r^2), ki nam pove kolikšen del variance A, pojasnimo z varianco B. Večji je r^2 , boljše je korelacija med spektralnimi podatki in vrednostmi, ki predstavljajo velikost delcev. Napako modela smo določili s pomočjo RMSECV (ang. *Root mean square error of cross validation*); napako napovedi modela pa z RMSEP (ang. *Root mean square error of prediction*). RMSECV in RMSEP sta kvantitativno merilo za natančnost, s katero so bili napovedani kalibracijski vzorci. Bias je povprečje odklonov med pravimi in napovedanimi vrednostmi. Nižje vrednosti »bias-a« pomenijo boljši model, saj je manjša razlika med merjenimi in pravimi vrednostmi. RPD (ang. *Residual prediction deviation*) je količnik standardne deviacije referenčne vrednosti in z »bias-om« popravljene napake napovedi testnega seta. Je kvalitativno merilo za ocenitev validacijskih rezultatov; večji kot je RPD, boljše je kalibracija. Za ocenitev kakovosti validacije, je večjega pomena določiti RPD, kot RMSEP (59).

Model št. 1

V modelu št. 1 (tabela VII) smo z modelnimi serijami proizvajalce Dow, želeli preveriti ali lahko postavimo model, ki nam bo dobro napovedoval velikost delcev znotraj istega substitucijskega tipa HPMC (2208).

Tabela VII: Grafični in statistični prikaz modela št. 1 z modelnimi serijami K4M (Dow).

Serije: M - modelne; T - testne	R^2 [%]	RMSECV oz. RMSEP [%]	Bias	RPD
 M: DT243235, UE0952	98,4	10,4	0,29	7,8
 T: UD9011	95,4	19,7	10,6	5,5
 T: 9115412	14,38	45,5	44,4	5,0

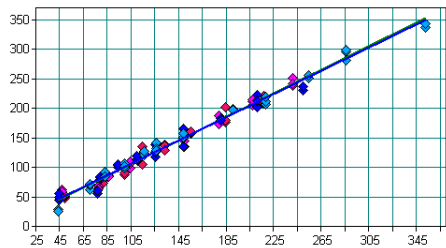
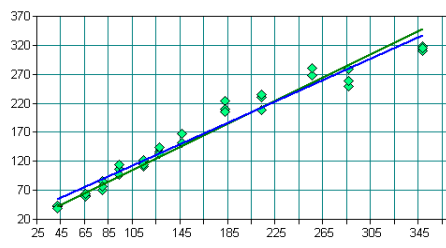
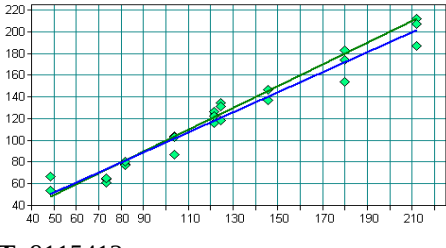
Iz zgornjih podatkov vidimo, da ima postavljen model velik delež pojasnjene variance (r^2), zelo nizek bias in relativno visok RPD, kar nakazuje da bo model sposoben dobro napovedovati velikosti delcev. Pri testiranju modela s serijo UD9011 (proizvajalec Dow) dobimo relativno veliko napako pri napovedi velikosti delcev (RMSEP = 19,7%) in RPD 5,5. Za boljšo napovedno moč modela bi verjetno morali v kalibracijski model vključiti več serij, oz. izvesti več ponovitev sejalne analize in meritev NIR-spektrov. Ko model testiramo s serijo, ki pripada drugemu proizvajalcu (Shin-Etsu), kot modelne serije, vidimo nepričakovan horizontalen premik premice in zelo veliko napako (RMSEP = 45,5 %).

Predvidevali smo, da je vzrok lahko različna oblika delcev oz. različen izhodni material, ki ga proizvajalca uporabljata za sintezo HPMC. Pri podrobnem pregledu serij pod mikroskopom smo ugotovili, da se pri proizvajalcu Shin-Etsu pojavi med različnimi serijami večji delež igličaste oblike delcev, kot pri proizvajalcu Dow. To verjetno vpliva na NIR-spektre in posledično pride tudi do horizontalnega premika premice pri testiranju modela. Da bi se temu izognili smo model »nadgradili«, tako da smo v modelnih serijah upoštevali tudi drugega proizvajalca (Shin-Etsu) – glej model št.2.

Model št. 2

Med modelne serije modela št. 1 smo dodali spektre in pripadajoče vrednosti drugega proizvajalca (Shin-Etsu), prav tako tipa substitucije 2208.

Tabela VIII: Grafični in statistični prikaz modela št. 2 z modelnimi serijami proizvajalca Dow in Shin-Etsu.

Serie: M - modelne; T - testne	R ² [%]	RMSECV oz. RMSEP [%]	Bias	RPD
 M: DT243235, UE0952, 9095326, 0075413	98,5	8,67	-0,0655	8,29
 T: UD9011	95,9	18,6	-2,54	5,0
 T: 9115412	95,7	10,2	3,4	5,12

Ko v model št. 2 (tabela VIII) vključimo dodatne serije Shin-Etsu, se statistični parametri modela še nekoliko izboljšajo. Iz tega sklepamo, da večje število modelnih serij res nekoliko izboljša model, kot smo predvidevali. Model smo nato testirali s serijama obeh proizvajalcev. Napovedna moč za napovedovanje velikosti delcev proizvajalca Shin-Etsu se je izrazito izboljšala. Iz tega je razvidno, da podatki vnešeni pri modeliranju (spektri drugega proizvajalca), upoštevajo značilnosti delcev drugega proizvajalca, s čimer dobimo bolj robusten model.

Na splošno lahko rečemo, da je model sposoben najti podobnosti v spektrih, ki so odgovorne za velikost delcev in izločiti tiste razlike, ki vplivajo samo pri enem od proizvajalcev.

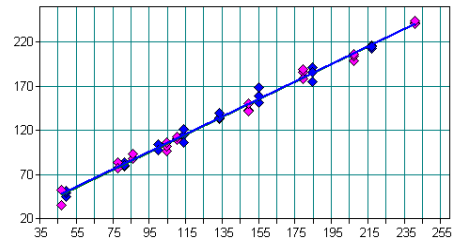
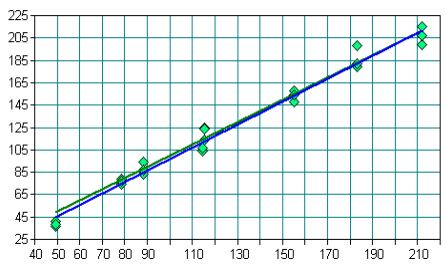
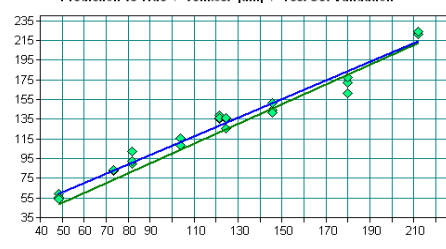
Model št. 3

V tem modelu smo želeli preveriti, kakšna je napovedna moč modela, če kot modelne serije uporabimo samo serije proizvajalca Shin-Etsu. Če se napovedna moč zelo poveča, bi bilo smiselno uporabljati različne modele, glede na to katerega proizvajalca preučujemo.

Model št. 3 (tabela IX) z modelnimi serijami proizvajalca Shin-Etsu, ima statistično gledano boljšo napovedno moč, saj je pojasnjena varianca zelo velika in tudi standardna napaka napovedi se je močno znižala. Kaže, da se serije proizvajalca Shin-Etsu bolj »prilagodijo« modelu, kot če v modelu uporabimo serije obeh proizvajalcev. Toda pri testiranju modela z dvema serijama tega proizvajalca nismo opazili take razlike v moči napovedi, kot bi jo pri tako statistično dobrem modelu pričakovali. Predvidevamo, da bi lahko bila razloga manjše število modelnih serij in/ali modelne serije, ki so tipa SR («sustained release»). Glede na to, da testna serija 9115412 nima te oznake, dobimo statistično slabše napovedne vrednosti. V obeh primerih bi morali povečati število modelnih serij in v modelu upoštevati tudi serije brez oznake SR.

Zaključimo lahko, da ni toliko pomembno, da imamo za vsakega proizvajalca svoj model, ampak koliko različnih serij model zajema, saj s tem pridobimo na robustnosti modela.

Tabela IX: Grafični in statistični prikaz modela št. 3 z modelnimi serijami proizvajalca Shin-Etsu.

Serije: M - modelne; T - testne	R ² [%]	RMSECV oz. RMSEP [%]	Bias	RPD
 M: 9095326, 0075413	99,18	5,1	0,008	11,1
 T: 0065328	97,8	7,7	2,6	7,2
 T: 9115412	95,4	10,6	-6,9	6,1

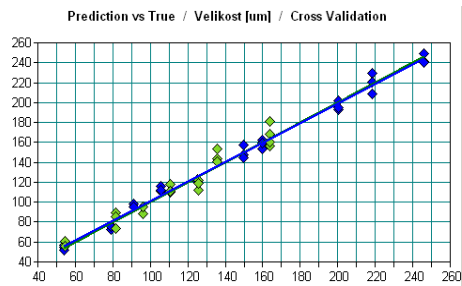
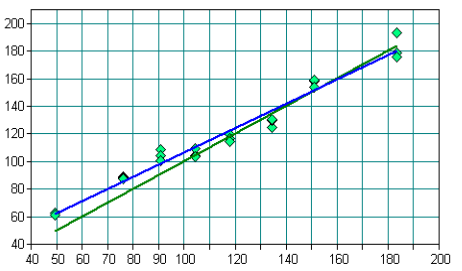
Model št. 4

S tem modelom (tabela X) smo želeli preveriti ali je napovedna moč tipa substitucije 2910 ravno tako velika kot pri tipu substitucije 2208. V modelu smo uporabili serije proizvajalca Shin-Etsu in Dow, saj smo v zgornjih modelih pokazali, da proizvajalec HPMC ne vpliva na napovedno moč, v kolikor kot modelne serije uporabimo vse proizvajalce, katerih vrednosti velikosti delcev želimo kasneje napovedati.

Iz statističnih podatkov postavljenega modela bi sklepali, da bo model dobro služil za napovedovanje velikosti delcev, saj ima primerne statistične predpogoje. Izkazalo pa se je, da pri tipu substitucije 2910 nismo uspeli postaviti tako dobrega modela kot pri tipu substitucije 2208. Iz tega težko sklepamo, da je za to odgovorna vrsta HPMC, zato predvidevamo, da je razlog temu verjetno napaka, ki jo analitik vnese pri bodisi postopku

sejanja, meritvi NIR spektrov ali pri meritvi velikosti delcev z referenčno metodo. Možnost nevede vnesene napake je precejšna, zato je tudi tako pomembno, da imamo veliko število ponovitev in če je le mogoče tudi večje število serij. Pri nalogi smo bili nekoliko omejeni s številom serij, toda vidne so smernice zmožnosti napovedovanja velikosti delcev z NIR spektroskopijo.

Tabela X: Grafični in statistični prikaz modela št. 4 z modelnimi serijami HPMC tipa substitucije 2910. Modelne serije pripadajo proizvajalcema Dow in Shin-Etsu, testna serija proizvajalcu Shin-Etsu.

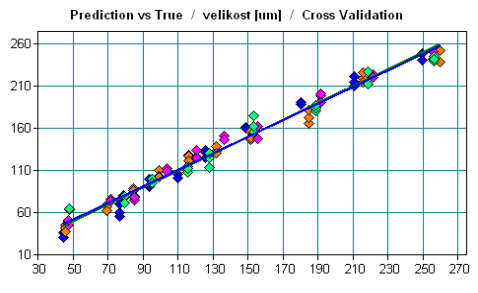
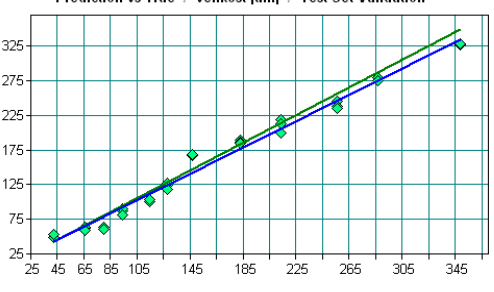
Serie: M - modelne; T - testne	R ² [%]	RMSECV oz. RMSEP [%]	Bias	RPD
 M: DT230020, 0058097	98,5	6,5	-0,4	8,2
 T: 0028034	94,9	9,1	-4,65	5,17

Model št. 5

V tem modelu želimo preveriti, kakšna je napovedna moč modela, ki ima kot modelne serije vključene različne stopnje viskoznosti HPMC. V model so bile vključene serije proizvajalca Dow z viskoznostjo 100, 4000, 15000, 100000 mPas.

Model št. 5 (tabela XI) upošteva razlike, ki jih doprinesejo različne viskoznosti HPMC in s tem dovolj dobro napove velikost delcev ne glede na stopnjo viskoznosti. Statistični parametri modela in testirane serije so podobni, kot pri zgornjih modelih, tako da lahko za optimiziranje modela uporabimo zgornje predpostavke (večje število serij s številčnejšimi ponovitvami meritev).

Tabela XI: Grafični in statistični prikaz modela št. 4 z modelnimi serijami HPMC različne stopnje viskoznosti, proizvajalca Dow

Serije: M - modelne; T - testne	R ² [%]	RMSECV oz. RMSEP [%]	Bias	RPD
 M: DT243235, DT247522, DT259593, UE2819	98,1	8,6	0,08	7,3
 T: UD9011	97,9	13,1	5,0	7,5

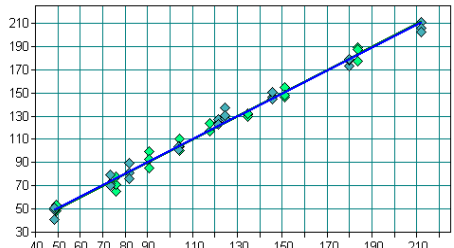
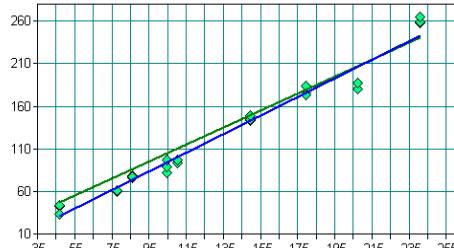
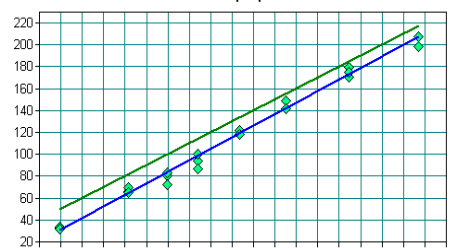
Model št. 6

V model smo vključili serije različnega tipa substitucije (2208 in 2910) ter opazovali ali je le-ta sposoben dobro napovedati velikost delcev HPMC ne glede na tip substitucije. Za postavitev in testiranje modela smo uporabili serije proizvajalca Shin-Etsu.

Iz spodnjih podatkov (tabela XII) vidimo, da ima postavljen model zelo dobre statistične podatke in zato dober potencial, za substitucijsko neodvisno napovedovanje velikosti delcev. To se je pri testiranju izkazalo za ne popolnoma resnično, saj smo dobili nekoliko slabšo statistično oceno napovedi velikosti delcev, glede na modele, ki vsebujejo samo eden tip substitucije HPMC. Če pomislimo na teorijo, ki stoji za spektri ki jih opazujemo v bližnjem infrardečem območju, lahko rečemo da bi morali to tudi pričakovati. Različna tipa HPMC imata precej različno število hidroksipropilnih oz. metilnih substituenov na verigi, kar pomeni da pri določeni valovni dolžini opazimo drugačno intenziteto sevanja, glede na tip substitucije. Glede na to program verjetno težje najde področja v bližnjem infrardečem spektru, kjer teh razlik ni in vpliva samo velikost delcev. Predvidevamo, da je teh področij manj, zato dobimo pri postavitvi modela dobre rezultate, ko želimo testirati

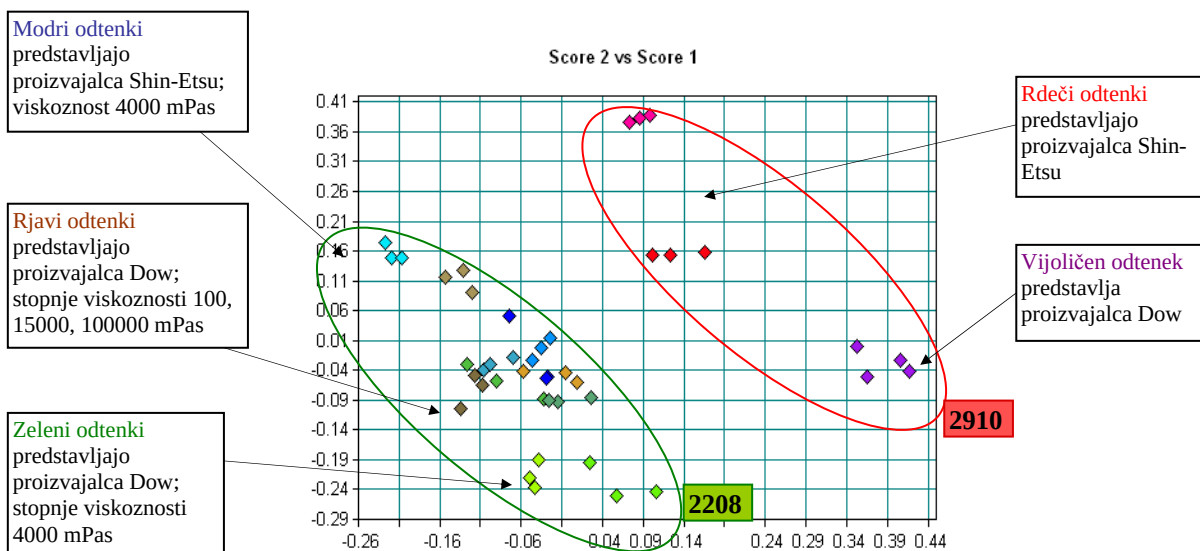
model pa testne serije težje najdejo kolinearnost na enakem področju kot modelni seriji. Morda je pri tem modelu še večjega pomena (veliko) število modelnih serij, ali pa je enostavno bolje da ima vsak tip substitucije HPMC, ki mu želimo napovedati velikost delcev, svoj model.

Tabela XII: Grafični in statistični prikaz modela št. 6 z modelnimi serijami HPMC različnega tipa substitucije (2208 in 2910). Vse serije so od proizvajalca Shin-Etsu.

Serije: M - modelne; T - testne	R ² [%]	RMSECV oz. RMSEP [%]	Bias	RPD
 M: 0028034, 9115412	98,9	4,9	0,046	9,3
 T: 9095326	94,4	14,5	7,9	5,0
 T: 0075413	90,7	15,7	14,7	9,1

Model št. 7

S pomočjo PCA analize smo preverili, kako se različni tipi substitucije oz. stopnje viskoznosti HPMC ločijo v dvodimenzijskem prostoru (slika 5.9). Pri tipu substitucije 2910 smo imeli na voljo nekoliko manj serij, a dovolj za predstavbo in občutek razlikovanja med dvema vrstama HPMC.



Slika 5.9: Predstavlja zadetke različnega tipa substitucije in stopnje viskoznosti HPMC. Rožnata barva predstavlja tip substitucije 2910, zemeljska barva pa tip substitucije 2208.

Lahko rečemo, da se tipa substitucije lepo ločita na dve populaciji. Tip substitucije 2208 ima znotraj populacije sicer nekoliko grupirana področja glede na proizvajalca oz. stopnjo viskoznosti, a vsekakor ne toliko, da bi lahko naredili podpopulacije. Glede na rezultate sklepamo, da bi PCA model lahko uporabili kot hitro identifikacijsko tehniko za ugotavljanje tipa substitucije neznanih tipov HPMC.

Kot temeljno metodo za ločitev HPMC na posamezne frakcije velikosti smo uporabili sejnalno analizo, nekoliko starejšo, a še vedno uporabno tehniko, ki daje relativno dobre rezultate. S pomočjo sejanja smo dobili grobo porazdelitev velikosti delcev različnih serij, dveh proizvajalcev (Shin-Etsu in Dow). Med njima smo opazili pomembno razliko v medserijski variabilnosti porazdelitve velikosti delcev. Pri proizvajalcu Shin-Etsu smo opazili ponovljivo distribucijo velikosti delcev, tudi med različno stopnjo viskoznosti HPMC. Nasprotno pa so serije proizvajalca Dow izkazovale precej neenakomerno medserijsko porazdelitev velikosti delcev HPMC. Menimo, da bi ta razlika lahko botrovala variabilnostim, ki jih pogosto srečujemo pri sproščanju ZU iz ogrodnih FO, ki kot glavno funkcionalno pomožno snov vsebujejo HPMC. Iz tega sklepamo, da bi FO z vgrajenim HPMC proizvajalca Shin-Etsu, imele bolj ponovljiv profil sproščanja ZU iz FO, kot pri proizvajalcu Dow.

V nadaljevanju smo vsem serijam zbranih frakcij HPMC posneli NIR-spektre. Spektri so se vizualno lepo ločili glede na naraščajočo/padajočo velikost delcev, kar se je kasneje izkazalo tudi pri modeliranju. Postavili smo več modelov s katerimi smo želeli ugotoviti njihovo moč pri napovedovanju velikosti delcev neznanih vzorcev. Kot referenčno metodo za ugotovitev velikosti delcev smo uporabili lasersko difrakcijo. Glede na to, da smo s to metodo pridobili informacijo o volumski porazdelitvi velikosti delcev, se le-ta številčno ni ujemala z velikostjo delcev pri sejalni analizi. Kljub temu pa so vrednosti bile v linearnem razmerju s spektri (in velikostnimi frakcijami delcev) kar pomeni, da lahko z modeli napovedujemo velikost delcev samo glede na volumsko razmerje velikosti.

Naša 1. hipoteza je bila, da bo imel model dobro napovedno moč za velikost delcev HPMC, znotraj istega substitucijskega tipa HPMC. Prvi model smo sestavili iz serij proizvajalca Dow, substitucijskega tipa 2208. Postavljen model je imel precej obetajoče statistične rezultate ($r^2=98,4\%$, RMSECV=10,4 %, RPD=7,8), pri njegovem testiranju pa smo dobili nekoliko slabše, a še vedno zadovoljive rezultate ($r^2=95,4\%$, RMSEP=19,7 %, RPD = 5,5). Opazili smo, da je v primeru, ko je bil ta model testiran s serijo proizvajalca Shin-Etsu, njegova napovedna moč izrazito upadla ($r^2=14,4\%$, RMSEP=45,5 %, RPD=5,0). Zato smo se odločili, da model nadgradimo z dodatkom modelne serije HPMC proizvajalca Shin-Etsu. V slednjem primeru se je napovedna moč modela močno izboljšala

($r^2=95,7$ %, RMSEP=8,7 %, RPD=8,29). To pomeni, da je model sposoben v spektrih najti podobnosti odgovorne za velikost delcev in izločiti tiste razlike, ki vplivajo samo pri enem od proizvajalcev, pod pogojem, da z modelnimi serijami vnesemo vse te razlike (vnesemo rezultate serij obeh proizvajalcev).

Preverili smo tudi napovedno moč za tip substitucije 2910, kjer smo dobili nekoliko slabše, a še vedno zadovoljive rezultate ($r^2=94,9$ %, RMSEP=9,1, RPD=5,17). Predvidevamo, da nekoliko slabši rezultati nakazujejo napako analitika bodisi pri sejalni analizi, meritvi NIR-spektrov ali pa pri meritvi velikosti delcev z referenčno metodo, lasersko difrakcijo. Ali pa bi morda morali imeti več serij tega substitucijskega tipa.

Z dobljenimi rezultati smo potrdili 1. hipotezo, saj model osnovan (celo) na serijah različnih proizvajalcev, istega substitucijskega tipa daje zadovoljive statistične vrednosti za napovedovanje velikosti delcev serij teh proizvajalcev.

2. hipoteza je napovedovala, da bo imel model dobro napovedno moč za velikost delcev HPMC, neodvisno od stopnje viskoznosti HPMC. Uporabili smo serije istega substitucijskega tipa, vendar različnih viskoznosti (100, 4000, 15000, 100000 mPas), proizvajalca Dow. Napovedna moč modela je bila precej visoka ($r^2=98,1$ %, RMSECV=8,6 %, RPD=7,3) iz česar smo sklepali, da bo model uporaben za napovedovanje velikosti delcev HPMC, neodvisno od stopnje viskoznosti. To je testna serija tudi pokazala ($r^2=97,9$ %, RMSECV=13,1 %, RPD=7,5), zato 2. hipotezo lahko tudi potrdimo.

Naša 3. hipoteza je napovedovala, da bo imel model dobro napovedno moč za velikost delcev HPMC, neodvisno od substitucijskega tipa HPMC. Kot modelni seriji smo vzeli substitucijska tipa 2208 in 2910, proizvajalca Shin-Etsu. Model ima dobre statistične vrednosti ($r^2=98,5$ %, RMSECV=6,5 %, RPD=8,2), a se je pri testiranju izkazal za nekoliko slabšega (1. testna serija: $r^2=94,4$ %, RMSECV=14,5 %, RPD=5,0; 2. testna serija: $r^2=90,7$ %, RMSECV=15,7 %, RPD=9,1). Predvidevamo, da je stopnja substitucije in s tem delež posamezne substituentne v NIR-spektrih nekoliko težje primerjati med sabo, saj različna količina substituentov absorbira večjo/manjšo intenziteto infrardečega sevanja, zato je težje opredeliti lastnosti spektra, ki so odgovorne za velikost delcev. Glede na to, je bolje, da imamo za vsak tip substitucije svoj model. Te hipoteze tako nismo potrdili, kar je v skladu z različnimi kemijskimi lastnostmi preučevanih HPMC.

Iz zgornjih ugotovitev sklepamo, da lahko sestavimo model z dobro napovedno močjo velikosti delcev HPMC, za vsak tip substitucije posebej ne glede na stopnjo viskoznosti. Napovedno moč bi lahko izboljšali tako, da bi namesto sit uporabili tehniko sejanja, ki

temelji na odsesavanju delcev (t.i. »Air-Jet sejanje«). Na ta način bi zagotovili enakomernejšo velikost delcev posamezne frakcije, saj bi manjše delce (ti se radi lepijo na ogrodje sita in povzročajo prašenje preko vseh frakcij) enostavno odstranili. Še dodatno robustnost modela pa bi dosegli z večjim številom modelnih serij.

Postavljeni modeli sicer niso toliko izpopolnjeni, da bi imeli dovolj veliko moč napovedovanja velikosti delcev v kvantitativne namene, so pa dober pokazatelj, da bi to lahko nekoč bili.

V 4. hipotezi smo menili, da bo PCA model sposoben med sabo ločiti različne substitucijske tipe HPMC. To nam zelo nazorno prikazuje slika 5.9, s čimer smo to hipotezo tudi potrdili. S PCA modelom bi lahko kvalitativno ločili serije z različnim tipom substitucije, z bolj dodelanim modelom (več modelnih, tudi substitucijsko neustreznih serij) pa verjetno tudi neustrezne stopnje substitucije. Na ta način bi enostavno in hitro izločili serije, ki imajo neustrezen delež posamezne substituyente na polimerni verigi HPMC.

Z mikroskopskimi slikami smo želeli preveriti, zakaj pride do tega, da model sestavljen iz serij enega proizvajalca (Dow), ni sposoben napovedati velikosti delcev serij drugega proizvajalca (Shin-Etsu). Še več, testna serija (proizvajalca Shin-Etsu) je v modelu (serije proizvajalca Dow) pokazala vzporeden premik premice, kar je nakazovalo na to, da obstaja neka lastnost delcev HPMC, ki jo eden od proizvajalcev nima. Predvidevali smo, da je vzrok temu različna oblika delcev, kar so mikroskopske slike tudi potrdile. Proizvajalec Shin-Etsu je imel na videz veliko več igličaste oblike delcev HPMC, kar posledično vidimo tudi v spektrih oz. vzporednem premiku premice. V primeru, ko uporabimo za modelne serije oba proizvajalca, te razlike model prepozna ter jih upošteva pri iskanju kolinearnih povezav med spektri in referenčnimi podatki za velikost delcev.

Glede na to, da je velikost delcev pomemben parameter, ki pogojuje hitrost sproščanja ZU iz FO, je njegovo definiranje pomembno že v predformulacijski fazi. Na tej stopnji se nam zdi zelo pomembno, da imamo hitro, neinvazivno metodo, ki omogoča kontrolo velikosti delcev. Bližnja infrardeča spektroskopija v prihodnosti veliko obeta, saj ponuja enostavno rešitev pri optimiziranju proizvodnje farmacevtskih oblik v farmacevtski industriji. Velikost delcev je samo eden izmed parametrov, ki ga lahko merimo s pomočjo te hitro razvijajoče se tehnike. V magistrski nalogi smo prišli do pomembnih izsledkov, toda za rutinsko uporabo in implementacijo v in/on-line procese je še dolga doba raziskav ter optimizacij te tehnike.

- 1 Formularium Slovenicum – Slovenski dodatek k Evropski farmakopeji 2.0, Ministrstvo za zdravje, Agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke, 2005, 130.
- 2 Banker GS, Rhodes CT: Modern Pharmaceutics: Sustained and controlled-release drug delivery systems. 4th ed. New York: Marcel Dekker inc., 2002: 501-528.
- 3 Gupta Amit M, Agnihotri college of pharmacy, wardha, ppt predstavitev
- 4 Ferlan A: Vrednotenje vpliva izbranih procesnih parametrov na sproščanje modelne učinkovine iz hidrofilnih ogrodnih tablet. Magistrsko delo. Univerza v Ljubljani. Fakulteta za farmacijo, 2009.
- 5 Kapele T: Vpliv ionske moči medija na sproščanje in nabrekanje tablet s hidroksipropilmetil celulozo. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani. Fakulteta za farmacijo, 2006.
- 6 Viridén A, Wittgren B, Larsson A: Investigation of critical polymer properties for polymer release and swelling of HPMC matrix tablets. Eur J Pharm Sci 2009; 36: 297-309.
- 7 Hardy IJ, Windberg-Baarup A, Neri C, Byway PV, Booth SW, Fitzpatrick S: Modulation of drug release kinetics from hydroxypropyl methyl cellulose matrix tablets using polyvinyl pyrrolidone. Int J Pharm 2007; 337: 246-253.
- 8 Pavli M: Načrtovanje, izdelava in vrednotenje ogrodnih tablet s prirejenim sproščanjem na osnovi naravnih polimerov. Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2010.
- 9 Velasco MV, Ford JL, Rowe P, Rajabi-Siahboomi AR: Influence of drug : hydroxypropylmethylcellulose ratio, drug and polymer particle size and compression force on the release diclofenac sodium from HPMC tablets. J Control Release 1999; 57: 75-85.
- 10 Mitchell SA, Balwinski KM: A framework to investigate drug release variability arising from hypromellose viscosity specifications in controlled release matrix tablets. J Pharm Sci 2008; 97: 2277-2285.
- 11 http://www.dow.com/PublishedLiterature/dh_0379/0901b803803797ad.pdf?filepath=methocel/pdfs/noreg/198-02075.pdf&fromPage=GetDoc (dostop maj 2010)
- 12 Bonferoni MC, Rossi S, Ferrari F, Bertoni M, Caramella C: A study of three

hydroxypropylmethyl Cellulose substitution types: effect of particle size and shape on hydrophilic matrix performances. *Pharm Sci* 1996; 4: 277-284.

- 13 Viridén A, Larsson A, Wittgren B: The effect of substitution pattern of HPMCon polymer release from matrix tablets. *Int J Pharm* 2010; 389: 147-156.
- 14 Viridén A, Wittgren B, Andersson T, Larsson A: The effect of chemical heterogeneity of HPMC on polymer release from matrix tablets. *Eur J Pharm Sci* 2009; 36: 392-400.
- 15 <http://www.oxinst.com/products/tablet-dissolution/Pages/imaging-chloropheniramine.aspx> (dostop avgust 2010)
- 16 European Pharmacopoeia 6.3, monografije: Hypromellose, 4171-4173.
- 17 http://en.wikipedia.org/wiki/Main_Page (dostop maj 2010)
- 18 Herder J, Adolfsson Å, Larsson A: Initial studies of water granulation of eight grades of hypromellose (HPMC). *Int J Pharm* 2006; 313: 57-65.
- 19 Rowe CR: *Pharmaceutical Excipients: The internationally acclaimed resource on pharmaceutical excipients*. Pharmaceutical Press and the American Pharmacists Association, London 2005; 346-350.
- 20 <http://coatings.specialchem.com.cn/> (dostop september 2010)
- 21 <http://www.metolose.jp/e/> (dostop avgust 2010)
- 22 <http://www.dow.com/dowexcipients/products/index.htm> (dostop julij 2010)
- 23 Mitchell K, Ford JL, Armstrong DJ, Elliott PNC, Hogan JE, Rostron C: The influence of substitution type on performance of methylcellulose and hydroxypropylmethyl cellulose in gels and matrices. *Int J Pharm* 1993; 100: 143-154.
- 24 Mitchell SA, Balwinski KM: Investigation of Hypromellose particle size effect on drug release from sustained release hydrophilic matrix tablets. *Drug Dev Ind Pharm* 2007; 33: 952-958.
- 25 Ford JL, Rubinstein MH, Hogan JE: Formulation of sustained release promethazine hydrochloride tablets using hydroxypropyl-methylcellulose matrices. *Int J Pharm* 1985, 24: 327-338.
- 26 Cheong LWS, Heng PWS, Wolf LF: Relationship between polymer viscosity and drug release from matrix system. *Pharm Res* 1992; 24 : 1510-1514.
- 27 Escudero JJ, Ferrero C, Jiménez-Castellanos: Compaction Properties, drug kinetics and fronts movement studies from matrices combining mixtures of swellable and

- inert polymers: Effect of HPMC of different viscosity grades. *Int J Pharm* 2008; 351: 61-73.
- 28 Escudero JJ, Ferrero C, Jiménez-Castellanos: Compaction Properties, drug kinetics and fronts movement studies from matrices combining mixtures of swellable and inert polymers: II. Effect of HPMC with different degrees of methoxy/hydroxypropyl substitution. *Int J Pharm* 2010; 387: 56-64.
 - 29 Jamzad S, Tutunji L, Fassihi R: Analysis of macromolecular changes and drug release from hydrophilic matrix systems. *Int J Pharm* 2005; 292: 75-85.
 - 30 Sung KC, Nixon PR, Skoug JW, Ju TR, Gao P, Topp EM, Patel MV: Effect of formulation variables on drug and polymer release from HPMC based matrix tablets. *Int J Pharm* 1996; 142: 53-60.
 - 31 Li CL, Martini LG, Ford JL, Roberts M: The use of hypromellose in oral drug delivery. *JPP* 2005; 57: 533-546
 - 32 Siepe S, Lueckel B, Kramer A, Ries A, Gurny R: Strategies for design of hydrophilic matrix tablets with controlled microenvironmental pH. *Int J Pharm* 2006; 316: 14-20.
 - 33 Tabasi SH, Moolchandani V, Fahmy R, Hoag SW: Sustained release dosage forms dissolution behavior prediction: A study of matrix tablets using NIR spectroscopy. *Int J Pharm* 2009, 382:1-6.
 - 34 Tabasi SH, Moolchandani V, Fahmy Raafat, Hoag SW: Sustained release dosage forms dissolution behavior prediction: A study of matrix tablets using NIR spectroscopy. *Int J Pharm* 2009; 32: 1-6.
 - 35 Tajarobi F, Abrahmsén-Alami S, Carlsson AS, Larsson A: Simultaneous probing of swelling, erosion and dissolution by NMR-microimaging - Effect of solubility of additives on HPMC matrix tablets. *Eu J Pharm Sci* 2009; 37: 89-97.
 - 36 Ek R, Gren T, Henriksson U, Nyqvist C, Öderberg L: Prediction of drug release by characterisation of tortuosity in porous cellulose beads using a spin echo NMR technique. *Int J Pharm* 1995; 124: 9-18.
 - 37 <http://www.science4heritage.org/survenir/> (dostop julij 2010)
 - 38 http://www.gimvic.org/projekti/projektno_delo/2009/2a/spektroskopija/index_teorija_2.html (dostop julij 2010)
 - 39 Burns DA, Ciurczak EW: Book of near-infrared analysis. Marcel Dekker, Inc., New York 1992.
 - 40 Pasquini C: Near Infrared Spectroscopy: fundamentals, practical aspects and

analytical applications. J Braz Chem Soc 2003, 14: no 2.

- 41 Opus – FT-IR tutorial, programska oprema za NIR aparat
- 42 Roggo Y, Chalou P, Maurer L, Lema-Martinez C, Edmond A, Jent N: A review of near spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. J Pharm Biomed Anal 2007; 44: 683-700.
- 43 Laypaert J; Massart DL, Heyden YV: Near-infrared spectroscopy applications in pharmaceutical analysis. Talanta 2007; 72: 865-883.
- 44 <http://www.nuance.northwestern.edu/KeckII/Instruments/FT-IR/index.html>
(dostop oktober 2010)
- 45 Pasquini C: Near infrared spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. J Braz Chem Soc 2003; 14: 198-219.
- 46 Li W, Bashai-Woldu A, Ballard J, Johnson M, Agresta M, Rassmusen H, Hu S, Cunningham J, Winstead D: Applications of NIR in early formulation development Part.I. Semi-quantitative blend uniformity and content uniformity analyses by reflectance NIR without calibration models. Int J Pharm 2007; 340: 97-103.
- 47 Moes JJ, Ruijken MM, Gout E, Frijlink HW, Ugwoke MI: Application of process analytical technology in tablet process development using NIR spectroscopy: Blend uniformity, content uniformity and coating thickness measurements. Int J Pharm 2008; 357: 108-118.
- 48 Sarraguça MC, Cruz AV, Soares SO, Amaral HR, Costa PC, Lopes JA: Determination of flow properties of pharmaceutical powders by near infrared spectroscopy. J Pharm Biomed Anal 2010; 52: 484-492.
- 49 Smola N. Teoretične osnove in uporaba bližnje IR spektroskopije v farmacevtski tehnologiji. Seminarska naloga, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2006.
- 50 Simpson MB: Process Analytical technology: Chapter 3: NearInfrared Spectroscopy for Process Analytical Chemistry- theory, technology and implementation. Blackwell publishing Ltd., Oxford, UK; 2005: 39-90.
- 51 Blanco M, Peguero A: Influence of physical factors on the accuracy of calibration models for NIR spectroscopy. J Pharm Biomed Anal 2010; 52: 59-65.
- 52 http://www.spectroscopyeurope.com/images/stories/ArticlePDFs/NIR_14_3.pdf
(dostop oktober 2010)
- 53 http://www.spectroscopyeurope.com/images/stories/ArticlePDFs/NIR_14_3.pdf
(dostop oktober 2010)

- 54 Blanco M, Villaroya I: NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. Trends anal chem 2002; 21: 240-250.
- 55 Bellamy LJ, Nordon A, Littlejohn D: Effects of particle size and cohezive properties on mixing studied by non-contact NIR. Int J Pharm 2008; 361: 87-91.
- 56 Dévay A, Mayer K, Pál S, Antal I: Investigation on drug dissolution and particle characteristics of pellets related to manufacturing process variables of high-shear granulation. J Biochem Biophys Methods 2006; 69: 197-205.
- 57 European Pharmacopoeia 6.6, 2.9.38. Particle size distribution estimation by analytical sieving, 5112-5114.
- 58 European Pharmacopoeia 6.0; 2.2.40. Near-infrared spectrophotometry, 62-66.
- 59 Conzen JP: Multivariate calibration: A practical guide for developing methods in the quantitative analytical chemistry. Bruker Optik GmbH 2006.
- 60 Niemöller A: Opus quant2: Bruker Optics training, ppt predstavitev
- 61 Smola N: Kvalitativna in kvantitativna analiza oksitetraciklina dihidrata z metodo bližnje infrardeče spektroskopije in korelacija med spektralnimi področji. Doktorsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2000.
- 62 http://www.cs.otago.ac.nz/cosc453/student_tutorials/principal_components.pdf (dostop oktober 2010)
- 63 <http://sirfreakthemighty.wikidot.com/bruker:mpa> (dostop oktober 2010)
- 64 Kemeny G: Applications for the Integrating Sphere in the Near-Infrared Spectral Region. Pike technologies, USA.
- 65 European Pharmacopoeia 6.6; 2.9.37. Optical microscopy, 5110-5111.
- 66 European Pharmacopoeia 6.6; 2.9.31. Particle size analysis by light diffraction, 5103-5107.
- 67 Pavlovič S: Vpliv oblike delcev na rezultate porazdelitve velikosti delcev pridobljene z metodo laserske difrakcije. Seminarska naloga, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2009.
- 68 Devjak Novak S, Kuhelj V, Vrečer F, Baumgartner S: The influence of HPMC viscosity as FCR parameter on the release of low soluble drug from hydrophylic matrix tablets; članek v pripravi.

PRILOGE

Priloga 1: Tabele z vrednostmi velikosti delcev HPMC določene z lasersko difrakcijo

vzorec K4M , proizvajalec: Dow ; serija DT243235						
Velikost sita [μm]	Velikost delcev določena z lasersko difrakcijo [μm]					
	1.paral.	2.paral.	3. paral.	povprečje	SD	RSD [%]
200	336,31	338,65	341,9	339,0	2,81	0,83
180	287,78	292,09	291,03	290,3	2,25	0,77
150	248,15	248,75	251,4	249,4	1,73	0,69
125	210,42	213,41	209,16	211,0	2,18	1,03
100	183,26	179,21	179,13	180,5	2,36	1,31
75	149,84	147,03	150,4	149,1	1,81	1,21
71	125,46	126,19	125,92	125,9	0,37	0,29
63	108,6	110,03	110,6	109,7	1,03	0,94
53	92,7	93,84	95,16	93,9	1,23	1,31
45	79,58	78,28	79,74	79,2	0,80	1,01
32	76,43	78,99	74,35	76,6	2,32	3,03
< 32	44,49	42,55	46,57	44,5	2,01	4,51
Ne-sejani vzorec	102,31	102,53	101,72	102,19	0,42	0,41

vzorec K4M , proizvajalec: Dow ; serija UD9840						
Velikost sita [μm]	Velikost delcev določena z lasersko difrakcijo [μm]					
	1.paral.	2.paral.	3. paral.	povprečje	SD	RSD [%]
200	361,67	360,84	364,4	362,3	1,86	0,51
180	299,37	302,3	302,3	301,3	1,69	0,56
150	264,61	266,75	264,04	265,1	1,43	0,54
125	223,74	224,36	230,12	226,1	3,52	1,56
100	181,98	182,31	182,89	182,4	0,46	0,25
75	148,86	148,52	149,49	149,0	0,49	0,33
71	125,1	125,63	125,13	125,3	0,30	0,24
63	107,93	109,73	109,78	109,1	1,05	0,97
53	90,92	91,77	91,7	91,5	0,47	0,52
45	78,18	80,42	79,73	79,4	1,15	1,44
32	66,78	66,93	66,62	66,8	0,16	0,23
< 32	42,36	42,26	41,76	42,1	0,32	0,76
Ne-sejani vzorec	127,91	124,78	125,47	126,05	1,64	1,30

vzorec K4M , proizvajalec: Dow ; serija UE0952						
Velikost sita [μm]	Velikost delcev določena z lasersko difrakcijo [μm]					
	1.paral.	2.paral.	3. paral.	povprečje	SD	RSD[%]
200	348,96	355,64	352,95	352,5	3,36	0,95
180	284,33	287,85	286,42	286,2	1,77	0,62
150	254,14	254,62	255,23	254,7	0,55	0,21
125	215,42	221,52	216,96	218,0	3,17	1,46
100	190,61	190,64	191,37	190,9	0,43	0,23
75	148,82	150,42	149,17	149,5	0,84	0,56
71	125,76	126,94	125,85	126,2	0,66	0,52
63	115,78	115,95	116,17	116,0	0,20	0,17
53	100,35	99,19	99,7	99,7	0,58	0,58
45	83,22	83,71	83,55	83,5	0,25	0,30
32	70,91	70,06	69,65	70,2	0,64	0,92
< 32	45,33	43,53	43,53	44,1	1,04	2,35
Ne-sejani vzorec	117,33	120,36	117,48	118,39	1,71	1,44

vzorec K4M , proizvajalec: Dow ; serija UD9011						
Velikost sita [μm]	Velikost delcev določena z lasersko difrakcijo [μm]					
	1.paral.	2.paral.	3. paral.	povprečje	SD	RSD [%]
200	348,26	350,39	347,57	348,7	1,47	0,42
180	286,59	287,78	286,13	286,8	0,85	0,30
150	254,76	256,11	257,2	256,0	1,22	0,48
125	213,03	212,32	214,66	213,3	1,20	0,56
100	182,22	182,46	182,98	182,6	0,39	0,21
75	146,22	147,17	148,23	147,2	1,01	0,68
71	126,21	129,48	127,09	127,6	1,69	1,33
63	115,51	112,17	114,79	114,2	1,76	1,54
53	94,47	93,83	94,13	94,1	0,32	0,34
45	80,53	79,93	79,83	80,1	0,38	0,47
32	66,29	65,98	65,76	66,0	0,27	0,40
< 32	42,66	42,45	42,17	42,4	0,25	0,58
Ne-sejani vzorec	115,54	116,46	115,65	115,88	0,50	0,43

vzorec 90SH-4000 , proizvajalec: Shin-Etsu ; serija 9115412						
Velikost sita [μm]	Velikost delcev določena z lasersko difrakcijo [μm]					
	1.paral.	2.paral.	3. paral.	povprečje	SD	RSD [%]
200	/	/	/	/	/	/
180	/	/	/	/	/	/
150	/	/	/	/	/	/
125	207,46	213,35	215,15	212,0	4,02	1,90
100	182,28	178,92	177,87	179,7	2,30	1,28
75	144,08	145,57	147,77	145,8	1,86	1,27
71	124,53	124,87	124,42	124,6	0,23	0,19
63	120,77	122,52	121,76	121,7	0,88	0,72
53	104,14	103,71	103,89	103,9	0,22	0,21
45	81,73	81,63	81,65	81,7	0,05	0,06
32	73,6	73,26	73,05	73,3	0,28	0,38
< 32	48,73	48	48,1	48,3	0,40	0,82
Ne-sejani vzorec	89,57	87,88	89,3	88,92	0,91	1,02

vzorec 90SH-4000SR , proizvajalec: Shin-Etsu ; serija: 0075413						
Velikost sita [μm]	Velikost delcev določena z lasersko difrakcijo [μm]					
	1.paral.	2.paral.	3. paral.	povprečje	SD	RSD[%]
200	/	/	/	/	/	/
180	/	/	/	/	/	/
150	/	/	/	/	/	/
125	213,34	219,02	218,96	217,1	3,26	1,50
100	184,31	183,25	185,96	184,5	1,37	0,74
75	152,71	157,91	155,2	155,3	2,60	1,67
71	/	/	/	/	/	/
63	136,01	131,87	132,7	133,5	2,19	1,64
53	112,63	113,45	116,5	114,2	2,04	1,79
45	98,06	103,73	97,6	99,8	3,41	3,42
32	83,6	83,2	78,05	81,6	3,10	3,79
< 32	50,56	49,44	49,21	49,7	0,72	1,45
Ne-sejani vzorec	99,74	98,32	99,45	99,17	0,75	0,76

vzorec 90SH-4000SR , proizvajalec: Shin-Etsu ; serija: 0065328						
Velikost sita [μm]	Velikost delcev določena z lasersko difrakcijo [μm]					
	1.paral.	2.paral.	3. paral.	povprečje	SD	RSD [%]
200	/	/	/	/	/	/
180	/	/	/	/	/	/
150	/	/	/	/	/	/
125	213,8	210,91	210,63	211,8	1,75	0,83
100	180,94	184,56	183,71	183,1	1,89	1,03
75	155,03	156,4	154,9	155,4	0,83	0,53
71	/	/	/	/	/	/
63	/	/	/	/	/	/
53	115,16	113,02	115,65	114,6	1,40	1,22
45	88,74	88,11	88,44	88,4	0,32	0,36
32	78,95	76,34	79,98	78,4	1,88	2,39
< 32	49,92	49,3	48,96	49,4	0,49	0,99
Ne-sejani vzorec	92,81	93,18	91,4	92,5	0,94	1,02

vzorec 90SH-4000SR , proizvajalec: Shin-Etsu ; serija: 9095326						
Velikost sita [μm]	Velikost delcev določena z lasersko difrakcijo [μm]					
	1.paral.	2.paral.	3. paral.	povprečje	SD	RSD [%]
200	/	/	/	/	/	/
180	/	/	/	/	/	/
150	238,86	241,6	242,06	240,8	1,73	0,72
125	206,81	207,44	207,96	207,4	0,58	0,28
100	178,26	180,27	179,67	179,4	1,03	0,58
75	148,08	150,87	150,17	149,7	1,45	0,97
71	/	/	/	/	/	/
63	111,46	111,78	108,54	110,6	1,79	1,61
53	103,4	104,79	105,87	104,7	1,24	1,18
45	85,75	86,1	86,37	86,1	0,31	0,36
32	78,14	76,03	79,05	77,7	1,55	1,99
< 32	47,08	47,23	46,8	47,0	0,22	0,46
Ne-sejani vzorec	92,14	93,44	93,41	93,0	0,74	0,80

vzorec 60SH-4000 , proizvajalec: Shin-Etsu ; serija 0028034						
Velikost sita [μm]	Velikost delcev določena z lasersko difrakcijo [μm]					
	1.paral.	2.paral.	3. paral.	povprečje	SD	RSD [%]
200	/	/	/	/	/	/
180	/	/	/	/	/	/
150	/	/	/	/	/	/
125	/	/	/	/	/	/
100	184,76	181,69	183,9	183,5	1,58	0,86
75	146,2	152,62	153,85	150,9	4,11	2,72
71	133,29	135,11	135,21	134,5	1,08	0,80
63	114,62	119,46	119,28	117,8	2,74	2,33
53	102,91	104,74	105,41	104,4	1,29	1,24
45	89,75	91,65	91,02	90,8	0,97	1,07
32	76,24	75,81	75,8	76,0	0,25	0,33
< 32	49,28	49,64	49,62	49,5	0,20	0,41
Ne-sejani vzorec	98,07	94,36	97,07	96,5	1,92	1,99

vzorec E4M , proizvajalec: Dow ; serija DT230020								
Velikost sita [μm]	Velikost delcev določena z lasersko difrakcijo [μm]							
	1.paral.	2.paral.	3. paral.	4.paral.	5. paral.	povprečje	SD	RSD [%]
200	/	/	/	/	/	/	/	/
180	/	/	/	/	/	/	/	/
150	237,41	242,31	246,03	253,69	249,33	245,8	6,27	2,55
125	209,18	215,23	220,17	222,31	224,14	218,2	6,05	2,77
100	192,56	194,75	206,71	206,7	200,7	200,3	6,57	3,28
75	158,58	159,98	160,23	/	/	159,6	0,89	0,56
71	147,99	150,24	150,36	/	/	149,5	1,34	0,89
63	121,42	123,5	128,34	128,4	124,19	125,2	3,09	2,47
53	103,52	104,94	107,95	106,1		105,6	1,87	1,77
45	91,11	91,03	91,01	/	/	91,1	0,05	0,06
32	79,54	78,28	79,81	/	/	79,2	0,82	1,03
< 32	54,98	53,69	53,8	/	/	54,2	0,72	1,32
Ne-sejani vzorec	112,21	114,76	115,07	/	/	114,0	1,57	1,38

vzorec K15M , proizvajalec: Dow ; serija DT247522						
Velikost sita [μm]	Velikost delcev določena z lasersko difrakcijo [μm]					
	1.paral.	2.paral.	3. paral.	povprečje	SD	RSD [%]
200	/	/	/	/	/	/
180	297,99	301,08	301,15	300,1	1,80	0,60
150	258,23	260,18	260,57	259,7	1,25	0,48
125	215,13	217,09	215,89	216,0	0,99	0,46
100	184,2	186,31	184,72	185,1	1,10	0,59
75	152,9	149,35	152,96	151,7	2,07	1,36
71	131,27	132,79	131,91	132,0	0,76	0,58
63	115,81	116,07	116,6	116,2	0,40	0,35
53	97,92	100,75	98,39	99,0	1,52	1,53
45	85,23	84,1	84,41	84,6	0,58	0,69
32	69,63	69,46	69	69,4	0,33	0,47
< 32	46,4	45,81	45,58	45,9	0,42	0,92
Ne-sejani vzorec	109,96	108,88	109,58	109,5	0,55	0,50

vzorec K100M , proizvajalec: Dow ; serija DT259593								
Velikost sita [μm]	Velikost delcev določena z lasersko difrakcijo [μm]							
	1.paral.	2.paral.	3. paral.	4.paral.	5. paral.	povprečje	SD	RSD [%]
200	358,37	360,32	369,21	373,86	365,5	365,5	6,35	1,74
180	293,95	293,72	294,86	291,06	/	293,4	1,63	0,56
150	254,8	256,22	256,3	/	/	255,8	0,84	0,33
125	221,35	221,12	221,85	/	/	221,4	0,37	0,17
100	191,27	191,98	192,51	/	/	191,9	0,62	0,32
75	154,3	154,07	159	154,14	/	155,4	2,42	1,56
71	135,04	138,9	137,37	135,47	/	136,7	1,78	1,31
63	120,68	120,83	120,13	/	/	120,5	0,37	0,31
53	103,43	103,41	103,83	/	/	103,6	0,24	0,23
45	84,88	85,87	84,95	/	/	85,2	0,55	0,65
32	71,53	71,45	71,34	/	/	71,4	0,10	0,13
< 32	47,73	47,22	46,93	/	/	47,3	0,41	0,86
Ne-sejani vzorec	106,37	108,76	107,21	109,02	108,89	108,1	1,19	1,10

vzorec 60SH-4000 , proizvajalec: Shin-Etsu ; serija 0058097						
Velikost sita [μm]	Velikost delcev določena z lasersko difrakcijo [μm]					
	1.paral.	2.paral.	3. paral.	povprečje	SD	RSD [%]
200	/	/	/	/	/	/
180	/	/	/	/	/	/
150	/	/	/	/	/	/
125	/	/	/	/	/	/
100	194,27	193,47	194,31	194,0	0,47	0,24
75	163,24	164,18	164,63	164,0	0,71	0,43
71	/	/	/	/	/	/
63	124,43	126,35	126,81	125,9	1,26	1,00
53	110,31	111,64	110,78	110,9	0,67	0,61
45	96,4	95,96	96,52	96,3	0,29	0,31
32	81,85	81,55	81,26	81,6	0,30	0,36
< 32	54,83	54,55	54,65	54,7	0,14	0,26
Ne-sejani vzorec	113,43	113,3	113,95	113,6	0,34	0,30

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ELENA ŠPORAR

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ INDUSTRIJSKE FARMACIJE

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ELENA ŠPORAR

**RAZVOJ MODELA ZA DOLOČANJE VELIKOSTI DELCEV
HIDROKSIPROPILMETILCELULOZE S SPEKTROSKOPIJO
BLIŽNJEGA INFRARDEČEGA OBMOČJA**

**DEVELOPING OF MODEL FOR DETERMINATION OF PARTICLE SIZE
HYDROXYPROPYL-METHYLCELLULOSE BY NEAR INFRARED
SPECTROSCOPY**

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo sem opravljala v laboratorijih tovarne Krka, d.d., v Službi za laboratorijsko kontrolo kakovosti, pod mentorstvom izr. prof. dr. Franca Vrečerja ter delovnim mentorstvom Sabine I Devjak Novak, mag. farm. Meritve laserske difrakcije in mikroskopiranje pa sem opravila na Fakulteti za farmacijo.

Zahvala

Za strokovno vodstvo in nasvete pri izdelavi magistrske naloge ter usmerjanju pri sodelovanju z industrijo, se iskreno zahvaljujem svojemu mentorju izr. prof. dr. Francu Vrečerju. Najlepša hvala tudi delovni mentorici Sabini Ivani Devjak Novak, mag. farm., ki je pokazala veliko dobre volje, podporo in usmerjanje pri mojem raziskovalnem delu.

Hvala tudi vsem, ki so prispevali marsikateri praktični nasvet in s tem pripomogli k boljšemu razumevanju tematike. Še posebej se zahvaljujem dr. Suzani Jus, ki je bila vedno pripravljena sodelovati in pomagati, ko je to bilo potrebno.

Za koristne nasvete in sodelovanje pri določanju velikosti delcev z lasersko difrakcijo se zahvaljujem tudi izr. prof. dr. Odonu Planinšku.

Navsezadnje se moram zahvaliti tudi družini, ki me je ves čas študija moralno podpirala in verjela vame.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Franca Vrečerja in delovne mentorice Sabine Devjak Novak, mag. farm.

KAZALO

POVZETEK	1
SEZNAM OKRAJŠAV	3
1 UVOD	4
1.1 SPROŠČANJE IZ PERORALNIH FARMACEVTSKIH OBLIK	4
1.1.1 FARMACEVTSKE OBLIKE S PODALJŠANIM SPROŠČANJEM	4
1.2 SPROŠČANJE IZ HIDROFILNIH OGRODNIH TABLET	5
1.2.1 POLIMERI ZA HIDROFILNE OGRODNE TABLETE	8
1.3 HIPROMELOZA	9
1.3.1 ODVISNOST KINETIKE SPROŠČANJA ZU OD LASTNOSTI OGRODJA	11
1.3.1.1 Vplivi povezani s polimerom kot tvorilcem ogrodja	11
1.3.1.2 Vplivi povezani z lastnostmi ostalih sestavin FO	17
1.4 PRISTOPI K NAPOVEDOVANJU KINETIKE SPROŠČANJA IZ HIDROFILNIH OGRODNIH TABLET	19
1.5 INFRADREČE (IR) OBMOČJE SPEKTRA	19
1.5.1 BLIŽNJA INFRARDEČA (NIR) SPEKTROMETRIJA	21
1.5.1.1 NIR instrument	22
1.5.1.2 Uporaba NIR	23
1.5.1.3 Prednosti / slabosti NIR	24
1.5.1.4 NIR-Chemical Imaging	26
1.5.2 DOLOČANJE VELIKOSTI DELCEV Z NIR SPEKTROSKOPIJO	26
2 NAMEN DELA	28
3 MATERIALI IN METODE	29
3.1 MATERIALI	29
3.1.1 VZORCI	29
3.1.2 REAGENTI	29
3.1.3 APARATURE ZA PRIPRAVO VZORCEV	29
3.1.4 NAPRAVE ZA ANALIZO	30
3.2 METODE	30
3.2.1 SEJALNA ANALIZA	30
3.2.2 NIR	31
3.2.2.1 Kemometrične metode za ocenjevanje podatkov – multivariantni kalibracijski modeli	32
3.2.2.2 Validacija modela	34
3.2.3 OPTIČNA MIKROSKOPIJA	35
3.2.4 LASERSKA DIFRAKCIJA	37
4 EKSPERIMENTALNO DELO	38
4.1 SEJALNA ANALIZA	38
4.1.1 POTEK DELA	38

4.2 NIR	38
4.2.1 POTEK DELA	38
4.3 OPTIČNA MIKROSKOPIJA	39
4.3.1 POTEK DELA	39
4.4 LASERSKA DIFRAKCIJA	39
4.4.1 POTEK DELA	39
5 REZULTATI IN RAZPRAVA	41
4.1 SEJALNA ANALIZA	41
4.2 LASERSKA DIFRAKCIJA	45
4.3 OPTIČNA MIKROSKOPIJA	46
4.4 NIR	50
6 SKLEP	57
7 LITERATURA	60
PRILOGE	65