

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DARJA ŽUNIČ KLUN

# MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, maj 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO



DARJA ŽUNIČ KLUN

STABILNOST ZMESI PRIMARNEGA AMINA Z NEKATERIMI  
FARMACEVTSKO POMEMBNI MI POMOŽNIMI SNOVMI

STABILITY OF MIXTURES BETWEEN PRIMARY AMINE AND  
SOME PHARMACEUTICALLY IMPORTANT EXCIPIENTS

Ljubljana, maj 2012

*Magistrsko nalogo sem opravljala v Krki, d.d., na oddelku za stabilnost.*

## **Zahvala**

*Za vso pomoč, strokovne nasvete in skrben pregled naloge se iskreno zahvaljujem izr. prof. dr. Vojku Kmetcu in Andreju Gartnerju, uni. dipl. ing. kem.*

*Hvala tudi predsedniku komisije izr. prof. dr. Alešu Obrezi in članici komisije izr. prof. dr. Saši Baumgartner za pregled naloge in koristne nasvete.*

*Iskrena hvala dr. Lidiji Pezdirc za opravljene LC-MS analize.*

*Prav tako se zahvaljujem tovarni zdravil Krki, d.d., Novo mesto, ki mi je omogočila podiplomski študij.*

*Ne nazadnje se močno zahvaljujem Hinku in mojim najbližjim za podporo in razumevanje na moji študijski poti. Brez vaše pomoči in spodbude bi bila pot težja.*

*Pričujoče delo posvečam Maji in Ajdi*

## **Izjava**

*Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom izr. prof. dr. Vojka Kmetca.*

*Ljubljana, maj 2012*

*Darja Žunič Klun, mag. farm.*

**KAZALO VSEBINE**

|                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. POVZETEK .....                                                                                                      | 1  |
| 2. SEZNAM OKRAJŠAV .....                                                                                               | 3  |
| 3. UVOD.....                                                                                                           | 4  |
| 3.1. Predformulacijske študije.....                                                                                    | 4  |
| 3.2. Kompatibilnostne študije .....                                                                                    | 5  |
| 3.3. Kemijske interakcije .....                                                                                        | 6  |
| 3.3.1. Neencimske porjavitvene reakcije.....                                                                           | 7  |
| 3.4. Maillardova reakcija .....                                                                                        | 8  |
| 3.4.1. Pomen Maillardove reakcije v Stabilnosti zdravil.....                                                           | 12 |
| 3.4.2. Reducirajoči sladkorji.....                                                                                     | 14 |
| 3.5. Karamelizacija .....                                                                                              | 17 |
| 3.6. Vrste kompatibilnostnih študij.....                                                                               | 20 |
| 3.7. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC).....                                                          | 24 |
| 4. NAMEN RAZISKOVALNEGA DELA .....                                                                                     | 25 |
| 5. EKSPERIMENTALNI DEL .....                                                                                           | 27 |
| 5.1. Materiali, reagenti in aparature .....                                                                            | 27 |
| 5.2. Kratka predstavitev uporabljenih pomožnih snovi .....                                                             | 28 |
| 5.3. Priprava binarnih zmesi .....                                                                                     | 34 |
| 5.4. Priprava vzorcev binarnih zmesi in pomožnih snovi za stresno testiranje stabilnosti v kontroliranih pogojih ..... | 34 |
| 5.5. Analize .....                                                                                                     | 34 |
| 5.5.1. HPLC analiza vsebnosti 5-HMF, kondenzacijskih produktov, N-formil produkta in ostalih sorodnih substanc .....   | 35 |
| 5.5.2. HPLC analiza vsebnosti 5-HMF .....                                                                              | 36 |
| 5.5.3. Videz vzorcev .....                                                                                             | 37 |
| 6. REZULTATI IN RAZPRAVA .....                                                                                         | 38 |

|        |                                                                                                        |    |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6.1.   | Stresno preizkušanje stabilnosti binarnih zmesi v trdnem stanju .....                                  | 38 |
| 6.1.1. | Rezultati vsebnosti posameznih nečistot v stresno obremenjenih binarnih<br>zmeseh.....                 | 40 |
| 6.1.2. | Rezultati vsebnosti 5-HMF v stresno obremenjenih binarnih zmesih in<br>posameznih pomožnih snoveh..... | 53 |
| 6.1.3. | Videz vzorcev .....                                                                                    | 57 |
| 7.     | ZAKLJUČEK .....                                                                                        | 62 |
| 8.     | LITERATURA .....                                                                                       | 65 |

## 1. POVZETEK

S stresnim oziroma pospešenim preizkušanjem stabilnosti binarnih zmesi modelne spojine, ki je primarni amin, z različnimi reducirajočimi oz. nereducirajočimi pomožnimi snovmi smo ugotavljali interakcije med posameznimi komponentami. Cilj naloge je bil ugotoviti, ali lahko kondenzacijski produkti med reducirajočim sladkorjem in aminom in N-formil produkt, ki so znani kot označevalci Maillardove reakcije, v prisotnosti tipičnih reducirajočih sladkorjev (npr. laktoza, glukoza), služijo tudi kot pokazatelji tovrstne reakcije v prisotnosti določenih nereducirajočih sladkorjev oz. pomožnih snovi. V ta namen smo v raziskavo vključili laktozo, saharozo, manitol, maltitol (tekoči in praškast) in glicerol. Omenjene pomožne snovi se pogosto uporabljajo v farmacevtski industriji, hkrati pa glede na razpoložljive literaturne podatke obstaja možnost potencialnih interakcij v Maillardovi reakciji.

Cilj naloge je bil tudi ugotoviti, ali je tvorba N-formil produktov v preiskovanih zmesih povezana s prisotnostjo 5-hidroksimetilfurfurala (5-HMF). Zato smo z izpostavitvijo posameznih pomožnih snovi pospešenim in stresnim pogojem stabilnosti ugotavljali, v kateri od testiranih pomožnih snovi se tvori 5-HMF in pod kakšnimi pogoji (vpliv T in/ali vlage). Poleg tega smo preverili, ali 5-HMF dodatno nastaja tudi v stresno izpostavljenih binarnih zmesih kot intermediat Maillardove reakcije.

Posamezne pomožne snovi in ustrezne binarne zmesi z modelno spojino smo postavili na odprte (40°C / 75% RH) in zaprte (60°C, 80°C) nadzorovane pogoje. Pri tem smo vzorce za analize odvezemali ob v naprej načrtovanih terminih. Za zasledovanje značilnih pokazateljev Maillardove reakcije in analizo vsebnosti 5-HMF v binarnih zmesih in posameznih pomožnih snoveh smo uporabili validirani metodi tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC). Za natančno identifikacijo, kateri od vrhov na HPLC kromatogramu pripada kondenzacijskim produktom oz. N-formil produktu, ki so nam služili kot označevalci Maillardove reakcije v nalogi, smo posamezne binarne zmesi analizirali z LC-MS analizo.

Pokazali smo, da je zmes z laktozo v primerjavi z ostalimi zmesmi najmanj stabilna oziroma je porast markerjev Maillardove reakcije tako na odprtem (40°C/75%RH) kot tudi na zaprtem pogoju (60°C) največji. Po drugi strani pa rezultati HPLC meritev binarnih zmesi modelne spojine s saharozo, manitolom in praškastim maltitolom na odprtem pogoju 40°C/75% RH kot tudi na zaprtem pogoju pri temperaturi 80°C kažejo, da so te zmesi zelo stabilne. Tekoči maltitol po treh mesecih na zaprtem pogoju sicer pri nižji temperaturi testiranja, 60°C, kaže

večji porast zlasti v smeri kondenzacijskih produktov. Pri tem smo ugotovili, da sočasno s procesom Maillardove reakcije poteka še proces hidrolize tekočega maltitola. Dokazali smo, da na hitrost in obseg Maillardove reakcije modelne spojine, ki je primarni amin, v prisotnosti izbranih pomožnih snovi poleg vrste pomožne snovi pomembno vplivata zlasti povišana temperatura in količina proste vode v zmesi. V binarni zmesi z glicerolom smo uspeli identificirati le N-formil produkt. Ostalih nečistot, ki bi bili morebitni kondenzacijski produkti modelne spojine z reducirajočimi sladkorji, nismo detektirali.

Dokazali smo, da je tvorba N-formil produktov v preiskovanih zmesih razen pri zmesi z glicerolom povezana s tvorbo 5-HMF. Ugotovili smo, da 5-HMF nastaja tekom stresnega testiranja tako pri karamelizaciji posameznih pomožnih snovi kot tudi v nadaljnjih stopnjah Maillardove reakcije pri razpadu kondenzacijskih produktov. Ugotovili smo tudi, da na razlike v vsebnosti 5-HMF poleg vrste pomožne snovi, povišane temperature in časa izpostavljenosti vpliva tudi količina proste vode v posamezni pomožni snovi.

Vizualno smo spremljali tudi morebitne barvne spremembe stresno obremenjenih vzorcev. Spremembo videza tekočega maltitola (rumeno obarvanje) smo detektirali že pri zelo nizki vsebnosti 5-HMF (5ppm). Ugotovili smo, da so barvne spremembe binarnih zmesi v primerjavi s posameznimi pomožnimi snovmi intenzivnejše, saj so rezultat dveh procesov - karamelizacije in Maillardove reakcije. Opazili smo barvne spremembe v smeri rumene, roza, rjave oziroma temno rjave barve. Vizualne spremembe binarnih zmesi smo detektirali že pri vsebnosti skupnih Maillardovih nečistot pod 0.1%.

Zaključujemo, da smo v okviru naloge ugotovili, da lahko v Maillardovi reakciji reagirajo tako tipični reducirajoči sladkorji kot tudi druge pomožne snovi, ki vsebujejo reducirajoče sladkorje kot nečistote. Pri tem imajo pomemben vpliv vrsta pomožne snovi, povišana temperatura, količina proste vode in čas. Pokazali smo tudi, da lahko procese Maillardove reakcije spremljamo z ustreznimi selektivnimi analiznimi tehnikami in tudi vizualno.

**2. SEZNAM OKRAJŠAV**

|          |                                                                                   |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| HPLC     | tekočinska kromatografija visoke ločljivosti                                      |
| LC-MS    | tekočinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo                       |
| RRt      | relativni retencijski čas                                                         |
| ARP      | Amadorijev premestitveni produkt                                                  |
| 5-HMF    | 5-hidroksimetilfurfural                                                           |
| ICH      | Mednarodna konferenca o harmonizaciji (International Conference on Harmonization) |
| Ph. Eur. | evropska farmakopeja                                                              |
| UV       | svetloba ultravioletnega spektra                                                  |
| UZ       | ultrazvok                                                                         |
| RH       | relativna vlažnost                                                                |
| T        | temperatura                                                                       |
| p.a.     | za analize (pro analisi)                                                          |
| ESTD%    | odstotek nečistote preračunan na zunanji standard                                 |
| pmd      | pod mejo detekcije                                                                |



### 3. UVOD

Farmacevtska oblika je kombinacija zdravilne učinkovine s pomožnimi snovmi. Pomožne snovi so vključene v farmacevtsko obliko predvsem z namenom omogočiti proizvodnjo, aplikacijo zdravila ali izboljšati absorpcijo zdravilne učinkovine (1, 2).

Pomožne snovi bistveno vplivajo na stabilnost in biološko uporabnost zdravilne učinkovine. Čeprav jih opisujemo kot farmakološko inertne, lahko sprožijo in/ali sodelujejo v kemijskih in fizikalnih interakcijah z zdravilno učinkovino, kar lahko posledično vpliva na kakovost, varnost in učinkovitost zdravila. Poleg tega pomožne snovi niso popolnoma čiste in lahko vsebujejo reaktivne nečistote, razpadne produkte kot posledica proizvodnje in/ali shranjevanja. Zato je pomembno, da jih obravnavamo kot multi komponentne snovi, ki lahko na različne načine vplivajo na obstojnost zdravilne učinkovine (1, 2, 3).

V farmacevtski obliki je zdravilna učinkovina v neposrednem stiku z eno ali več pomožnimi snovmi. V večini farmacevtskih oblik je količina pomožnih snovi veliko večja kot je količina učinkovine, zato imajo v teh primerih pomožne snovi lahko signifikanten vpliv na prisotno učinkovino. Poznavanje interakcij med zdravilno učinkovino in pomožnimi snovmi je zato ključnega pomena pri izboru primernih pomožnih snovi za določeno farmacevtsko obliko, ki naj bo stabilna in ustrezne kakovosti (2).

#### 3.1. Predformulacijske študije

Predformulacijske študije so prvi korak v razvoju ustrezne farmacevtske oblike, ki vključujejo raziskavo fizikalno kemijskih lastnosti same zdravilne učinkovine in kombinacije s pomožnimi snovmi z namenom pripraviti kakovostno, varno in učinkovito zdravilo. Namen študij je razumevanje lastnosti vsake posamezne komponente zdravila in optimizacija procesa izdelave farmacevtske oblike (4, 5, 6).

Glavne cilje predformulacijskega programa lahko razdelimo v tri skupine (5, 7):

- določiti fizikalno-kemijske lastnosti nove zdravilne učinkovine,
- določiti kinetiko fizikalnih in kemijskih pretvorb (hitrost nastanka razpadnih produktov) in
- določiti kompatibilnost s potencialnimi pomožnimi snovmi.

Glede na navedene cilje je potrebno problematiko predformulacijskih študij proučevati z različnih vidikov: analitike, stabilnosti in farmacevtske tehnologije.

### 3.2. Kompatibilnostne študije

Kompatibilnostne študije so del predformulacijskih študij, kjer proučujemo združljivost zdravilne učinkovine s potencialnimi pomožnimi snovmi in ovojnino. Z izborom ustrezne kombinacije pomožnih snovi želimo pripraviti farmacevtsko obliko s primernimi biofarmacevtskimi lastnostmi, ki bo stabilna in bo omogočala ekonomično proizvodnjo (7).

Vrednotenje interakcij zdravilne učinkovine ali različnih zdravilnih učinkovin z ovojnino je predvsem v primeru tekočih farmacevtskih oblik zelo pomembno. Načinov vrednotenja tovrstne kompatibilnosti je veliko, vendar jih v tej nalogi ne obravnavamo.

Inkompatibilnost torej pomeni neracionalno kombinacijo sestavin v farmacevtski obliki. Reakcije zdravilnih učinkovin s pomožnimi snovmi večinoma prinesejo slabosti, lahko pa tudi prednosti. Delimo jih na kemijske, fizikalne in fiziološke (2).

Kemijske interakcije vključujejo kemijsko reakcijo med zdravilno učinkovino in pomožnimi snovmi ali zdravilno učinkovino in nečistotami, razpadnimi produkti prisotnimi v pomožnih snoveh, kar vodi do nastanka novih molekul.

Fizikalne interakcije so dokaj pogoste, vendar jih je težko interpretirati. Glavna razlika od kemijskih interakcij je, da ne vključujejo kemijskih sprememb, molekule ohranijo svojo molekulsko strukturo. Pri fizikalnih interakcijah lahko sicer pride do spremembe vodikovih vezi, vendar niso vpletene kemijske spremembe, ki bi vodile do drugačne molekule.

Fiziološke oziroma biofarmacevtske interakcije se navadno pojavijo po aplikaciji zdravila. V večini primerov gre za fizikalne interakcije, z razliko, da prihaja do teh interakcij med zdravilno učinkovino oziroma pomožnimi snovmi in telesnimi tekočinami, ki primarno vključujejo vodne raztopine, ter, da lahko te interakcije vplivajo na hitrost absorpcije zdravilne učinkovine (2,8).

### 3.3. Kemijske interakcije

Kemijske interakcije skoraj vedno prinašajo slabosti za končni izdelek, saj pri tem nastajajo razpadni produkti, ki jih je potrebno glede na ICH smernico Q3B, odvisno seveda od njihove količine, ustrezno kvantificirati, identificirati ali celo kvalificirati (2,9).

V literaturi so navedene tri vrste kemijske inkompatibilnosti:

- a) intrinzična kemijska razgradnja zdravilne učinkovine, kjer gre navadno za reakcije hidrolize, oksidacije, izomerizacije, dehidracije, fotolize, polimerizacije,
- b) inkompatibilnost zaradi tvorbe kovalentnih vezi med zdravilno učinkovino in pomožno snovjo ter
- c) kemijske interakcije zdravilnih učinkovin z nečistotami pomožnih snovi.

Reakcije zdravilnih učinkovin s pomožnimi snovmi ali njihovimi nečistotami večinoma vključujejo reakcije nukleofilnih učinkovin (npr. amini, sulfhidrili, fenoli) z elektrofilnimi pomožnimi snovmi ali nečistotami (npr. estri) ali reakcije elektrofilnih učinkovin (npr. estri, amidi, alkilhalidi) z nukleofilnimi pomožnimi snovmi ali nečistotami (npr. alkoholi) (10).

Pomožne snovi so lahko po sestavi anorganske ali organske, sinteznega, polysinteznega izvora ali pridobljene iz bioloških oziroma naravnih materialov. Mnoge vsebujejo reaktivne funkcionalne skupine, ki lahko interagirajo z drugimi spojinami. V nekaterih primerih lahko to izkoristimo za stabilizacijo nestabilnih spojin, vendar se bolj pogosto zgodi, da te interakcije vodijo v izgubo kvalitete (1, 11). Posamezne funkcionalne skupine so v prisotnosti določenih vrst pomožnih snovi podvržene določenim tipom reakcij ( tabela 1).

Tabela 1: Reaktivnost posameznih funkcionalnih skupin (2,4).

| <b>Funkcionalna skupina</b> | <b>Inkompatibilnost</b>  | <b>Tip reakcije</b>                  |
|-----------------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| primarni, sekundarni amini  | mono- in disaharidi      | Maillardova reakcija                 |
| primarni amini              | spojine z dvojnimi vezmi | Michaelovi adiciji analogna reakcija |
| ester                       | bazične snovi            | hidroliza estra                      |
| lakton                      | bazične snovi            | odprtje obroča (hidroliza)           |
| karboksilne kisline         | bazične snovi            | tvorba soli                          |
| alkohol                     | kisik                    | oksidacija do aldehydov in ketonov   |
| sulfhidril                  | kisik                    | dimerizacija                         |

Ena najbolj pogostih interakcij med zdravilnimi učinkovinami in pomožnimi snovmi je reakcija primarnih ali sekundarnih aminov z reducirajočimi sladkorji (aldehidi, ketoni), kar poznamo pod imenom Maillardova reakcija. Gre za kompleksno reakcijo, ki vodi do nastanka cele vrste nizkomolekularnih in visokomolekularnih obarvanih spojin. Več o Maillardovi reakciji bo predstavljeno v nadaljevanju naloge.

Tako kot zdravilne učinkovine tudi pomožne snovi niso povsem čiste. Vsebujejo namreč nečistote, ki so ostanki proizvodnje (izhodne substance, intermediati, reagenti, topila) ali pa gre celo za razpadne produkte. Že količine le-teh v sledovih imajo lahko pomemben vpliv, zlasti, ko je razmerje pomožna snov učinkovina veliko, če imajo majhno molekulsko maso ali če delujejo kot katalizatorji. Navadno poteče reakcija zelo hitro v začetni fazi in se nato upočasni. Obseg razpada učinkovine pa je večinoma omejen s količino prisotne nečistote.

Najbolj pogoste reaktivne nečistote pomožnih snovi, ki povzročajo razpad različnih zdravilnih učinkovin, so reducirajoči sladkorji, aldehidi, hidroperoksidi, organske kisline in estri, težke kovine in kovine v sledovih, nitrati, nitriti ter radikali (1, 10, 11).

### **3.3.1. Neencimske porjavitvene reakcije**

Neencimske porjavitvene reakcije so kemijske reakcije med pomožno snovjo ali njenimi nečistotami in zdravilno učinkovino. Kot že samo ime pove, predstavljajo skupno ime za tri pomembne procese, za katere je značilno, da jih ne katalizirajo encimi, prihaja pa v končni fazi do značilnih rjavo obarvanih sprememb (12).

Med neencimske porjavitvene reakcije uvrščamo (12):

1. Maillardovo reakcijo med sladkorji in amini.
2. Karamelizacijo sladkorjev.
3. Oksidacijo askorbinske kisline.

V okviru naloge bo podrobneje predstavljena zlasti Maillardova reakcija in v manjši meri še karamelizacija.

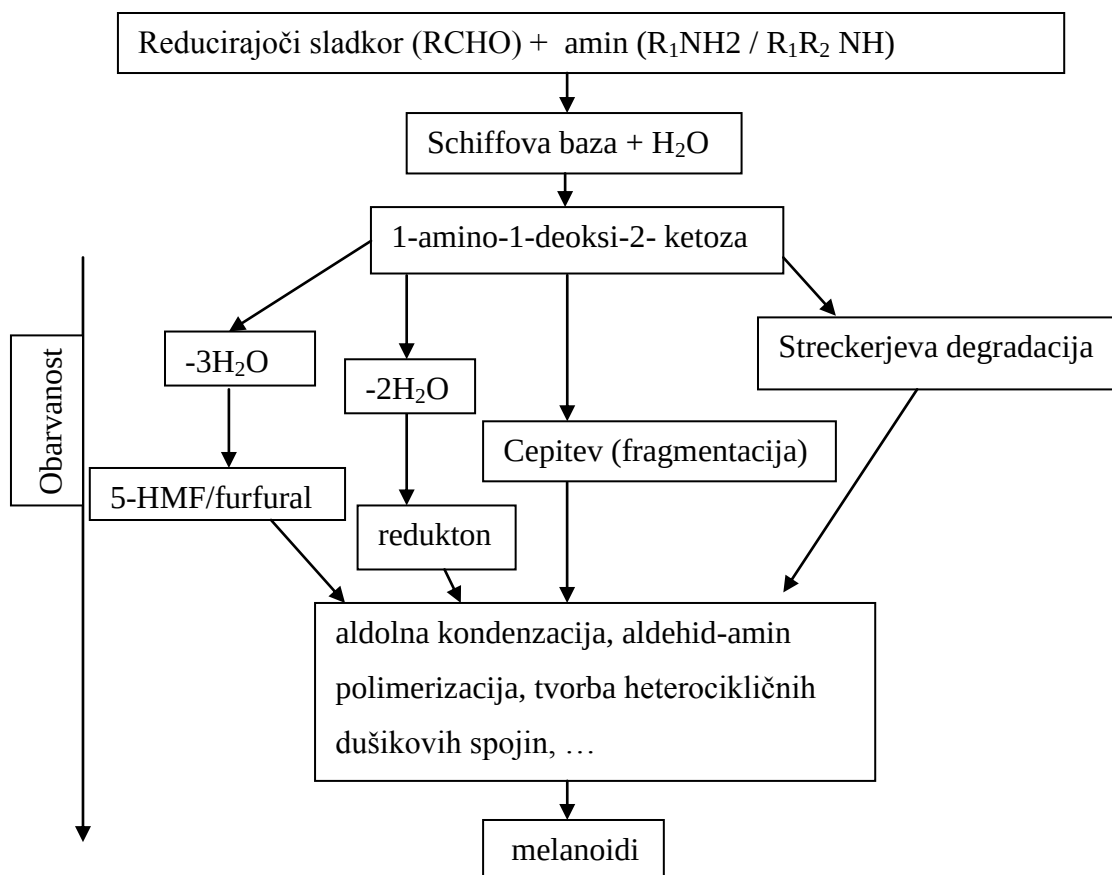
### 3.4. Maillardova reakcija

Maillardovo reakcijo je prvi raziskoval Anglež Ling Who leta 1908, ki je že takrat poročal, da je sprememba barve, ki nastane pri kuhanju, posledica reakcije med sladkorji in proteini. Francoz L. C. Maillard, ki je dal tej reakciji tudi ime, je nato leta 1912 proučeval reakcijo med različnimi reducirajočimi sladkorji in aminokislinami v vodnih raztopinah pri fizioloških pogojih. Pri tem je nastajal ogljikov dioksid in opazil je temnenje raztopin.

Pri Maillardovi reakciji gre za serijo kompleksnih reakcij, ki se začnejo s kondenzacijo proste aminske skupine in reducirajočim sladkorjem v njegovi aciklični, aldehidni obliki in končajo s tvorbo rjavo obarvanih melanoidnih pigmentov. Pri tem nastajajo številne nizkomolekularne in visokomolekularne obarvane spojine (12, 13).

Kljub temu, da je proces Maillardove reakcije zelo kompleksen, ga lahko razdelimo v tri stopnje (slika 1) (12, 13):

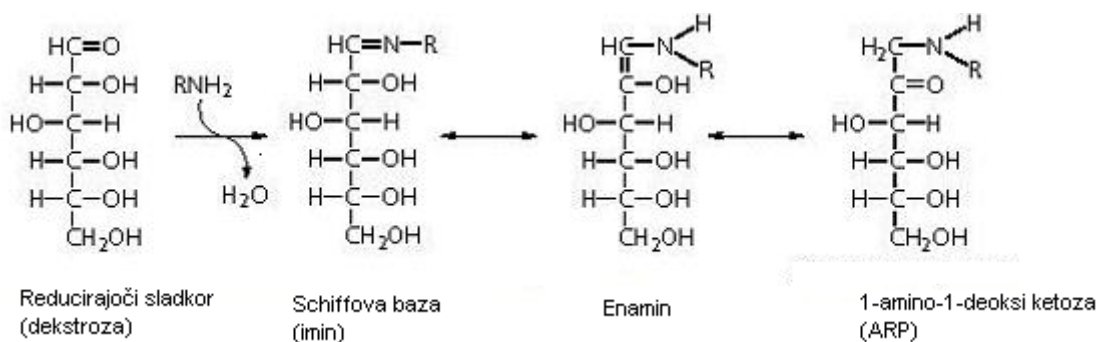
1. V prvi (začetni) stopnji poteče kondenzacija med sladkorjem in aminom, ki ji sledi Amadorijeva premestitev. Na tej stopnji še ne pride do barvnih sprememb.
2. Druga (vmesna) stopnja vključuje dehidracijo in cepitev (fragmentacija) sladkorja. V primeru, da je kot amin vključena aminokislina, pa lahko pride do razpada le-te preko Streckerjeve reakcije. Na tej stopnji lahko tudi že opazimo rahle barvne spremembe, npr. rumeno, roza, škrlatno obarvanje, ki z napredovanjem reakcije postaja vedno bolj izrazito in postopoma prehaja v rjavo.
3. Za tretjo (zadnjo) stopnjo so značilne zlasti aldolna kondenzacija, aldehyd-amin polimerizacija in tvorba heterocikličnih dušikovih spojin. Pri tem kot končni produkti nastajajo melanoidi. Na tej stopnji se pojavi tudi temno rjavo do črno obarvanje.



Slika 1: Shematski prikaz Maillardove reakcije (12).

### **Začetna stopnja:**

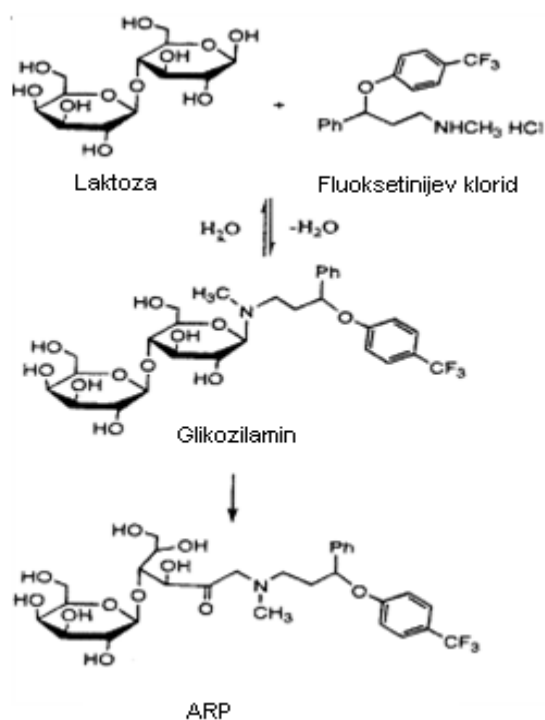
Zlasti dobro raziskana in dokumentirana je začetna faza Maillardove reakcije, kjer se tvori Amadorijev premestitveni produkt (sliki 2 in 3).



Slika 2: Začetna faza Maillardove reakcije s primarnimi aminom, ki vključuje nastanek stabilnega Amadorijevega premestitvenega produkta (ARP) (14).

Prvi produkt začetne reakcije t.i. kondenzacije med sladkorjem in aminom, je glikozilamin. Gre za proces nukleofilne adicije z eliminacijo, kjer se dušikov atom aminske skupine kot nukleofil veže na elektrofilno karbonilno skupino, pri tem se odcepi voda. Baze z deprotoniranjem aminske skupine povečajo njeno nukleofilnost ter s tem katalizirajo reakcijo. Nastali N-substituiran glikozilamin je nestabilen in se, v primeru, da je sladkor aldoza (npr. glukoza), preko Amadorijeve premestitve pretvori v bolj stabilno 1-amino-1-deoksi ketozo (ketozamin) oziroma Amadorijev premestitveni produkt (ARP), medtem ko v primeru ketoze (npr. fruktoza) poteče Heynsova premestitev. Pri Amadorijevi premestitvi gre za izomerizacijo N-substituiranega aldozilamina v 1-amino-1-deoksi ketozo, medtem ko gre pri Heynsovi premestitvi za izomerizacijo ketozilamina v 2-amino-2-deoksi aldozo. Sinteza Amadorijevega premestitvenega produkta (ARP) je reverzibilen proces. Pri sobni temperaturi je sinteza počasna, zlasti zaradi majhne količine odprte oblike sladkorja, ki je potrebna, da reakcija poteče (12, 13).

Blokiranje izomerizacije oziroma premestitve glikozilamina ustavi Maillardovo reakcijo in s tem spremembo barve. ARP je bolj stabilen izomer kot glikozilamin, zlasti v vlažnih in kislih pogojih, čeprav je temperaturno občutljiv. Pri segrevanju poteče dehidracija in razpad ARP (slika 1) (15).



Slika 3: Primer glikozilacije pri sekundarnih aminih, ki se nekoliko razlikuje od glikozilacije primarnih aminov (16).

ARP je pomemben intermediat Maillardove reakcije. Kot je opisano v primeru fluoksetinijevega klorida in pregabalina se lahko ARP tekom shranjevanja akumulira kot nečistota do signifikantnih vrednosti. Čeprav je struktura ARP na slikah 2 in 3 prikazana kot aciklična, ARP v raztopini zaradi mutarotacije obstaja kot mešanica aciklične oblike in cikličnih diastereoizomerov, furanozne in piranozne oblike. Zato se ARP kromatografsko vidi kot več pikov, verjetno zaradi interkonverzije na koloni. Nadaljnje stopnje, kjer sledi razgradnja ARP, so kompleksne in odvisne od reakcijskih pogojev. Številne raziskave, objavljene v literaturi, kažejo na kompleksnost in mnoge možne reakcijske poti, ki vključujejo fragmentacije sladkorjev in tvorbo aromatskih spojin zaradi dehidrationskih in ciklizacijskih procesov (12, 16, 17).

### **Vmesna stopnja:**

Obstajata dve poti dehidracije sladkorne enote ARP, odvisno od pH pogojev. Pod kislimi pogoji je dušikov atom protoniran, enolizacija, ki poteče, vključuje C1 atom, pri tem nastane 1,2-enaminol. Dehidracija treh molekul vode in ciklizacija vodita do nastanka hidroksimetilfurfurala (iz heksoz) in furfurala (iz pentoz), kar kaže na določene skupne lastnosti s karamelizacijo. Hidroksimetilfurfural in furfural lahko kot aldehida reagirata naprej z aminskimi skupinami preko sekundarne Maillardove reakcije. Pod bazičnimi pogoji poteče enolizacija preko C3 atoma sladkorja, pri tem se tvori 2,3-endiol. Tako z dehidracijo dveh molekul vode iz sladkorne enote nastane redukton (12, 18).

Poleg dehidracije ARP je za drugo fazo značilna tudi fragmentacija sladkorne enote ARP. Gre za dealdolizacijo oziroma reverzno aldolno kondenzacijo. Reakcijo katalizirajo amini, pri tem nastanejo aldoli, polimeri in amini.

Streckerjeva degradacija poteče v primeru, da v reakciji sodelujejo aminokisline, kar je v primeru farmacevtskih oblik bolj redko. Vključuje reakcijo med nastalimi reduktoni in aminokislino, pri tem se iz aminokislinske karboksilne skupine eliminira ogljikov dioksid in nastajajo aldehidi. Nastali aldehidi lahko polimerizirajo med seboj, reagirajo s sladkornimi enotami, furfurali ali ostalimi dehidratiranimi spojinami (12).

### **Zadnja stopnja:**

Najpomembnejše reakcije zadnje stopnje so aldolna kondenzacija, aldehyd-amin polimerizacija in tvorba heterocikličnih dušikovih spojin. Polimerizacija produktov druge stopnje in kopolimerizacija z amini vodi do močno rjavo do celo črno obarvanih spojin. Gre za kompleksne kemijske poti, končni produkti so visoko molekularne spojine, imenovane



melanoidi. Sestavljeni so tako iz v vodi topnih in v vodi netopnih pigmentov, značilno pa je, da zelo težko razpadejo. Številni avtorji navajajo, da osnovo melanoida sestavlja sladkorna enota, na katero so pripete različne dušikove spojine (16, 19).

Čeprav je večina produktov Maillardove reakcije nehlapnih kot npr. ARP in melanoidi, so prisotni tudi mnogi hlapni produkti, ki jih lahko identificiramo z GC/MS. Identificirane so bile številne spojine, pri tem pa je razvidno, da so nekatere spojine ali skupine spojin skoraj vedno prisotne ne glede na vrsto amina in sladkorja. Te vključujejo karboksilne kisline (mravljična ali očetna kislina); aciklične karbonilne spojine kot so aldehidi in ketoni; dikarbonilne spojine kot je 2,3-pentandion; furan, 2-furaldehid in furfurilalkohol; ostali kisikovi heterocikli kot so piranoni in furanoni; amidi, formamidi, acetamidi in v primeru primarnega amina še piroli in ostali dušikovi heterocikli (16).

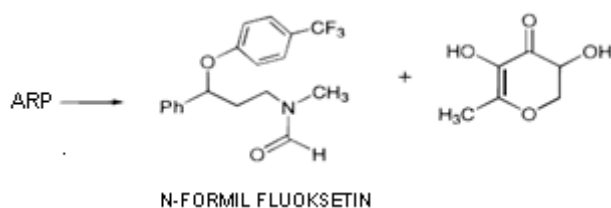
Maillardova reakcija je zlasti podrobno raziskovana in dokumentirana na področju prehrane in živilske industrije, kjer kot amini v večini primerov nastopajo aminokisline in peptidi.

#### **3.4.1. Pomen Maillardove reakcije pri stabilnosti zdravil**

Vpliv Maillardove reakcije na stabilnost zdravil je znan že kar nekaj časa in obravnavan v posameznih člankih, tako v raztopini kot tudi v trdnem. V večini primerov gre za različne primere kompatibilnostnih študij, kjer z različnimi analiznimi metodami ugotavljajo inkompatibilnost med komponentami. Podrobnejše raziskave identifikacije posameznih nečistot, kinetike, natančnega mehanizma razpada zlasti v kasnejših stopnjah reakcije med različnimi sladkorji in amini so na področju farmacevtske tehnologije in stabilnosti zdravil skope oziroma omejene le na zgodnejše faze reakcije. Verjetno je vzrok v tem, da so študije Maillardovih reakcij pogosto komplicirane ravno zaradi sekundarnih razpadov učinkovina – sladkor adukta in reakcij novo nastalih spojin, kar vodi v nastanek mnogih različnih razpadnih produktov, ki so pogosto neznani in tudi niso na voljo kot referenčne substance. Čeprav barvne spremembe niso opazne že v začetni fazi reakcije, so pogosto tiste, ki se zaznajo prej kot absolutna količina kateregakoli razpadnega produkta.

Osnovno izhodišče v razumevanju kemije razgradnih poti in njihovega pomena na stabilnost zdravil predstavlja članek o Maillardovi reakciji med fluoksetinijevim kloridom in laktozo. Wirth in sodelavci so proučevali to reakcijo z laktozo v trdnem in v vodni raztopini etanola. Poleg glikozilamina in ARP so kot signifikanten razpadni produkt reakcije med

fluoksetinijevim kloridom in laktozo identificirali še N-formil fluoksetin, vendar pri tem mehanizem nastanka niso podali (slika 4).



Slika 4: Tvorba N-formil fluoksetina iz ARP (16).

Kot možno sredstvo za formiliranje fluoksetina predpostavljajo glioksal, ki naj bi nastajal pri razpadu ARP. Pokazali so, da imajo na hitrost Maillardove reakcije in s tem vsebnost razpadnih produktov, tako v raztopini kot tudi v trdnem, signifikanten vpliv povišana temperatura, dodatek baze, ki deluje kot katalizator in prisotna vlaga. V hitrosti nastanka ARP ni bilo razlike med brezvodno laktozo in laktozo monohidratom, medtem ko je bil proces pospešen pri laktozi obdelani z metodo sušenje z razprševanjem zaradi prisotne določene količine amorfne laktoze in s tem proste vode, ki lahko sodeluje v reakciji. Pri analizi komercialno dosegljivih generičnih zdravil s fluoksetinom kot sekundarnim aminom pa so ugotovili, da so formulacije z laktozo zaradi Maillardove reakcije veliko manj stabilne kot s škrobom (16).

N-formil derivate različnih primarnih aminov kot pomembne markerje Maillardove reakcije sta prepoznala tudi Moore in Casale v raziskavi s kokainom in nekaterimi drugimi sorodnimi primarnimi amini. Nastanek N-formil derivatov razlagajo kot posledico razpada laktoze in glukoze v 5-hidroksimetilfurfural, ki razpade naprej v levulinsko kislino in mravljično kislino. Slednja pa nastopa kot formilirajoče sredstvo. Dokazali so, da kislo pH območje in povišana temperatura pospešujeta reakcijo. Kot pomembna in vizualno hitro opažena lastnost Maillardove reakcije je bila obarvanost stresno izpostavljenih vzorcev zmesi. S kolonsko in tankoplastno kromatografijo so ugotovili številne spojine, ki so bile obarvane rumeno, roza, rdeče, rožnato in modro in so odgovorne za obarvanost testiranih vzorcev. Te spojine sicer niso identificirali, vendar trdijo, da so nastale kot kondenzacijski produkti reakcije med 5-hidroksimetilfurfuralom in različnimi amini, prisotnimi v vzorcu (20).

Čeprav je Maillardova reakcija v zdravilih že dolgo poznan proces, so v začetku znanstveniki poročali, da lahko reagirajo le primarni aromatski amini. To je npr. pokazal Duvall s sodelavci

v raziskavi reaktivnosti med različno metiliranimi amfetamini in laktozo, kjer je podal zaključke na podlagi vizualne ocene spremembe barve in merjenja optične gostote, ne pa z merjenjem karakterističnih Maillardovih produktov. Kasnejše raziskave so pokazale, da, kljub temu da obstajajo razlike v hitrosti in obsegu reakcije med primarnimi in sekundarnimi amini, ki reagirajo počasneje, skoraj vsi primarni in sekundarni, alifatski ali aromatski amini ter njihove soli lahko reagirajo v Maillardovi reakciji. S terciarnimi amini pa reakcija ne poteče (15, 16, 21).

Podobne zaključke glede Maillardove reakcije na področju farmacije je v svoji raziskavi podal tudi Serajuddin, ki je s sodelavci v študijo Maillardove reakcije z laktozo vključil spojine s terciarnimi, sekundarnimi in primarnimi aminskimi skupinami ter amidnimi skupinami. Analiziral je fizikalne in kemijske parametre posameznih zmesi po enem in treh tednih izpostavljenosti 50°C v trdnem in ob prisotnosti vlage. Pokazal je, da terciarni amini in amidi ne reagirajo, medtem ko se pri sekundarnih in primarnih aminih tvorijo glikozilamini. Pokazal je, da sta za nastanek glikozilamina v trdnem pomembna mikrokooljska vsebnost vlage in bazičen pH. Reakcija najverjetneje poteče v področju sorbirane vode med pomožno snovjo in učinkovino, zato je za potek reakcije nujna prisotnost vode. Brez vode se tvori zelo malo glikozilamina. Kljub temu so že sledovi vode dovolj, da se reakcija sproži, saj le ta nastaja pri reakciji in s tem pospešuje nove interakcije. V primeru prevelike količine vode je reakcija upočasnjena, ker je ravnotežje premaknjeno v levo (22).

Serajuddin s sodelavci kot tudi večina drugih raziskovalcev zagovarja, da je za potek reakcije pomemben bazičen pH (pH 6-10), saj se pod kislimi pogoji aminska skupina protonira, s čimer se zmanjša njena nukleofilnost in posledično njena reaktivnost, medtem ko se v prisotnosti baz (magnezijev stearat in natrijev stearilfumarat) zaradi zvišanja pH poveča nukleofilnost aminske skupine. Vendar pa je Maillardova reakcija katalizirana tako v kislem kot tudi bazičnem, poteče pa tudi v nevtralnem (22, 23, 24).

Lahko zaključimo, da na hitrost in identiteto razpadnih produktov Maillardove reakcije vplivajo temperatura, vlaga, pH in čas. Pomembna pa je tudi narava amina oz. njegova nukleofilnost, narava sladkorne enote ter njuno razmerje oziroma koncentracija.

### **3.4.2. Reducirajoči sladkorji**

Reducirajoči sladkor je katerikoli sladkor z aldehydno funkcionalno skupino oziroma ima sposobnost tvorbe le-te z izomerizacijo v raztopini. Prosta aldehydna funkcionalna skupina

omogoča sladkorju vlogo reducirajočega sredstva, ki lahko preko redoks reakcije reducira določene spojine. Med reducirajoče sladkorje spadajo tako določeni monosaharidi kot so glukoza, galaktoza, gliceraldehid, fruktoza, disaharida laktoza in maltoza ter različni glukozni polimeri kot so škrob, glukozni sirup, maltodekstrin in dekstrin. Pomembno je, da lahko ena od sladkornih enot obstaja v odprti aldehydni obliki. Saharoza in trehaloza sta kot disaharida, kjer sta oba anomerna C atoma povezana preko glikozidne vezi in nimata možnosti odprtja sladkorne enote, uvrščena med nereducirajoča sladkorja. Sladkorji s ketonsko skupino v aciklični obliki (ketoze) kot je npr. fruktoza so prav tako reducirajoči, saj lahko z izomerizacijo v raztopini nastane aldehydna oblika (25, 26, 27).

V Maillardovi reakciji lahko reagirajo tako monosaharidni kot disaharidni reducirajoči sladkorji, pomembna je le količina odprte aldehydne ali ketonske oblike preko katere poteče reakcija. Količina le-te se razlikuje med posameznimi sladkorji, na splošno pa velja, da več kot je prisotne aciklične oblike, hitreje poteče reakcija. Kot primer je fruktoza, ki ima večjo količino aciklične oblike kot npr. glukoza, zato začetne stopnje Maillardove reakcije potečejo hitreje. Poleg tega, večji kot je sladkor, počasnejša bo reakcija. Pentoze (sladkorji s petimi C atomi) reagirajo hitreje kot heksoze (sladkorji s šestimi C atomi) in disaharidi. Obstaja pa tudi razlika med ketozami (monosaharidi s ketonsko skupino) in aldozami (monosaharidi z aldehydno skupino). Aldehydna karbonylna skupina je bolj elektrofilna kot ketonska, zato aldoze reagirajo hitreje kot ketoze (12, 25, 28, 29). Nereducirajoči sladkorji kot so manitol, maltitol, saharoza in trehaloza pa po literaturnih podatkih ne reagirajo v Maillardovi reakciji (16).

Ker je laktoza ena od najbolj uporabljenih pomožnih snovi v farmacevtski industriji, je tudi kot reducirajoči sladkor predstavljena v večini študij Maillardove reakcije z različnim zdravilnimi učinkovinami, ki vsebujejo aminske skupine kot funkcionalno skupino. Med različnimi oblikami laktoze je ugotovljena razlika v reaktivnosti. Laktoza obdelana z metodo sušenje z razprševanjem je zaradi vsebnosti določene količine amorfnega dela, kar je posledica postopka pridobivanja, bolj higroskopska in vsebuje več proste vode za reakcijo kot npr. kristalinična brezvodna laktoza ali laktoza monohidrat, kar se kaže z večjo nestabilnostjo v prisotnosti določenih aminov. Med laktozo monohidratom in brezvodno laktozo ni bistvenih razlik, v določenih primerih je bila reakcija z brezvodno laktozo nekoliko počasnejša zaradi predhodne pretvorbe v monohidrat (16, 30, 31).

Poleg tega, da so lahko že same pomožne snovi reducirajoči sladkorji, se lahko le-ti pojavijo tudi kot nečistote v nereducirajočih pomožnih snoveh kot so npr. mikrokristalna celuloza (MCC), škrob, manitol, maltitol in saharoza. Navadno so te nečistote prisotne v manjši količini. Nekatere od teh pomožnih snovi vsebujejo tudi aldehidne skupine (32).

Reducirajoči sladkorji kot nečistote v pomožnih snoveh so lahko produkt samega pridobivanja posamezne pomožne snovi ali pa nastanejo kot razpadni produkti polisaharidnih pomožnih snovi tekom shranjevanja ( temperatura in vlaga ).

Primer je MCC, ki se navadno pridobiva s kontrolirano hidrolizo  $\alpha$ -celuloze iz rastlin z razredčenimi kislinami. V nekaterih serijah MCC je zato v sledovih prisotna glukoza. George s sodelavci poroča o inkompatibilnosti Avicela (MCC) v Vigabatin tabletah. Produkti Maillardove reakcije med vigabatinom, primarnim aminom, in glukozo, nečistoto v MCC, so bili vzrok za obarvanje tablet tekom shranjevanja v prisotnosti vlage in povišane temperature ( 32, 33).

V drugi študiji je bila prav tako MCC odgovorna za obarvanje zrn v kapsulah. Približno 40 ppm glukoze je bilo določene v posameznih serijah MCC. Obarvanje granulata v kapsulah je bilo dokaz za potek Maillardove reakcije med glukozo in L-fenilalaninom. Pri tem avtorji sumijo, da lahko radikali oziroma reaktivne kisikove spojine, ki nastajajo že v začetni fazi Maillardove reakcije, vplivajo na oksidacijo nekaterih spojin (34).

Škrob je sestavljen iz amiloze in amilopektina. Tekom pridobivanja iz različnih rastlinskih semen, gomoljev ( koruza, pšenica, krompir, tapioka), ki vključuje med drugim tudi grobo mletje, spiranje in mokro sejanje, prihaja do razgradnje škroba v manjše enote, aldoze.

Manitol se pridobiva s katalitično ali elektrolitično redukcijo monosaharidov kot sta manoza in glukoza. Sledovi obeh reducirajočih sladkorjev manitola sta povzročila oksidativni razpad cikličnega heptapeptida v liofilizirani formulaciji (32).

Znano je, da so, poleg reducirajočih sladkorjev, v MCC, škrobu in laktozi prisotni kot nečistote tudi aldehidi (formaldehidi, acetaldehidi, furfuralaldehid in verjetno še drugi) in manjše karboksilne kisline (npr. mravljična kislina, očetna kislina). Njihove količine so lahko tudi do nekaj 100 ppm. Formaldehid v reakciji z aaminsko skupino tvori N-metil derivate. V literaturi je znana tovrstna reakcija s fenfluraminom. Poleg tega je formaldehid občutljiv na oksidacijo in v prisotnosti zračnega kisika deloma oksidira do mravljične kisline, ki pa lahko naprej reagira s primarnimi amini, pri čemer se tvorijo N-formil derivati (10, 20, 32, 35).

Laktoza se v farmacevtski tehnologiji veliko uporablja zlasti kot polnilo v trdnih farmacevtskih oblikah (tablete). Inkompatibilnost laktoze z zdravilnimi učinkovinami, ki so primarni ali sekundarni amini, je dobro poznana. Gre za disaharid galaktoze in glukoze. Oba reducirajoča sladkorja najdemo v laktozi obdelani z metodo sušenja z razprševanjem kot monosaharida, nečistoti. Prav tako je prisoten tudi 5-hidroksimetilfurfural, heksozni razpadni produkt, ki najverjetneje nastane pri visoki temperaturi v procesu sušenja z razprševanjem. Kot aromatski aldehyd lahko 5-hidroksimetilfurfural sodeluje v reakcijah s primarnimi aminskimi skupinami, pri čemer nastane Schiffova baza in ostale spojine, ki so vzrok za barvne spremembe (1, 36, 37). Podobno se zgodi pri glukozi, ki se uporablja v določenih parenteralnih raztopinah. Pri sterilizaciji z avtoklaviranjem prihaja do izomerizacije v fruktozo in tudi do tvorbe 5-hidroksimetilfurfurala (38).

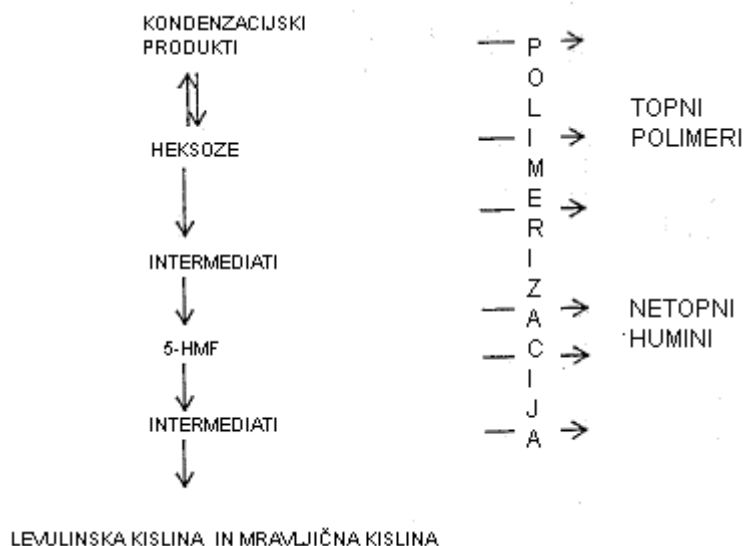
### 3.5. Karamelizacija

Za karamelizacijo so značilne kompleksne kemijske reakcije, do katerih lahko pride, če ogljikove hidrate oziroma sladkorje (monosaharidi, disaharidi, polisaharidi) segrevamo pri relativno visoki temperaturi (120°C) (37).

Karamelizacija obsega naslednje kemijske procese (39, 40):

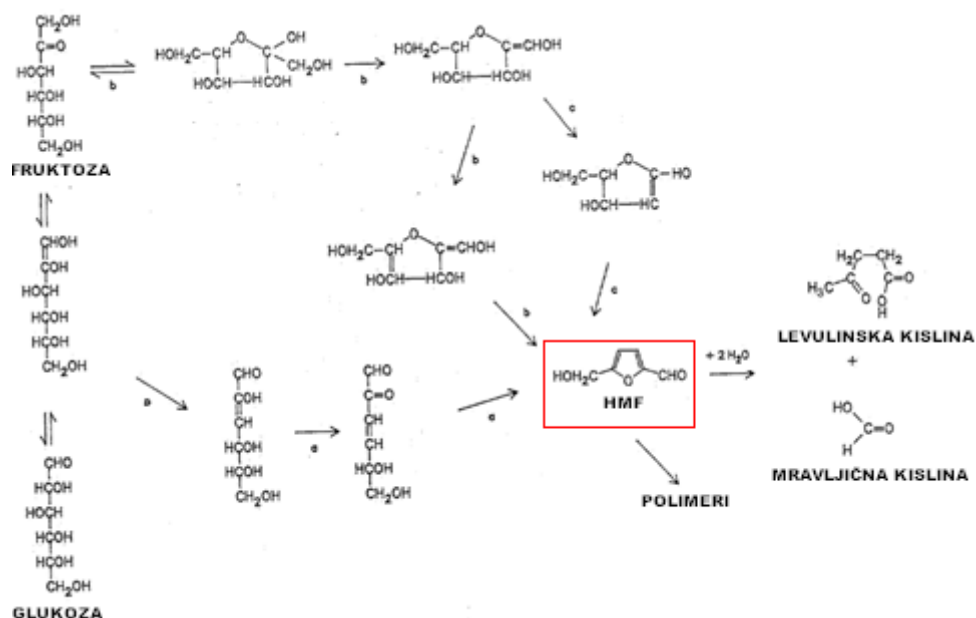
- hidrolizo disaharidov in polisaharidov (npr. hidroliza saharoze do glukoze in fruktoze),
- odprtje ciklične oblike sladkorne enote v aciklično obliko,
- kondenzacijske procese, kjer posamezne sladkorne enote z odcepitevijo ene molekule vode reagirajo med seboj (tvorijo se npr. anhidridi dveh molekul fruktoze),
- izomerizacijo aldoz v ketoze,
- nadaljni dehidrationski procesi,
- fragmentacije ter
- polimerizacije nastalih spojin.

Pri karamelizaciji dejansko govorimo o pirolizi oziroma termičnem razpadu sladkorjev. Odvisno od reakcijskih pogojev (T, čas, pH, prisotnost vode, vrste sladkorja) nastajajo številne hlapne in nehlapne spojine ter v vodi topne in netopne nizkomolekularne in visokomolekularne polimerne spojine (slika 5) (41).



Slika 5: Shematski prikaz karamelizacije heksoz (41).

Za primer lahko podamo saharozo, ki že pri samem segrevanju hidrolizira do fruktoze in glukoze, ki sta termično nestabilni in se pretvorita v 5-hidroksimetilfurfural (5-HMF), furfural, 2-metilfuran, 5-metil-2-furaldehid, furfuralalkohol, levulinsko kislino, mravljično kislino, različne polimerizate in številne neidentificirane spojine (42).



Slika 6: Predvideni mehanizmi dehidracije glukoze. Kot je razvidno iz slike je možnih več poti sinteze 5-HMF (a, b, c) (41).

Kljub raznovrstnosti spojin, ki se tvorijo v kemijskih procesih, je iz literature razvidno, da je 5-HMF pomemben intermediat in pokazatelj karamelizacije. Nastaja v procesu dehidracije iz heksoz (slika 6) in iz tistih disaharidov, oligosaharidov in polisaharidov, ki lahko hidrolizirajo na heksoze. Pri nadaljnjem segrevanju heksoz 5-HMF lahko reagira naprej v mnogih kemijskih reakcijah, med katerimi so najbolj znane polimerizacije ter hidroliza do levulinske in mravljične kisline (slika 6) (41, 43).

Študije, objavljene v literaturi kažejo, da je sinteza 5-HMF katalizirana zlasti v kislem in poteka predvsem pri segrevanju, lahko pa tudi pri skladiščenju.

Za razliko od Maillardove reakcije karamelizacija poteka pri višjih temperaturah, za njen zagon je tako potrebno več aktivacijske energije. Na hitrost reakcije poleg temperature in časa izpostavljenosti vpliva tudi vrsta sladkorja, prisotnost vode in pH. Katalizirana je tako v kislem ( $\text{pH} \leq 3$ ) kot tudi v bazičnem ( $\text{pH} \geq 9$ ). Poleg tega, kisli razgradni produkti, ki nastajajo pri termičnem razpadu ogljikovih hidratov delujejo na proces karamelizacije avtokatalitično.

Obstajajo razlike v reaktivnosti posameznih ogljikovih hidratov v procesu karamelizacije. Na splošno lahko rečemo, da je hitrost karamelizacije večja v prisotnosti ketoz kot pa aldoz, prav tako je večja v prisotnosti monosaharidov kot di- ali polisaharidov (hidroliza). Pri tem je pomembna količina odprte aldehydne ali ketonske oblike, preko katere poteče reakcija. Količina le-te se razlikuje med posameznimi sladkorji, na splošno pa velja, da več kot je prisotne aciklične oblike, hitreje poteče reakcija. Kot primer sta glukoza in ksiloza, ki sta bolj stabilni v ciklični kot aciklični obliki, medtem ko je fruktoza bolj stabilna v aciklični ketonski obliki, zato so enolizacija in nadaljnji procesi dehidracije hitrejši v prisotnosti fruktoze (41, 42, 44, 45).

Številne polimerne spojine, ki se tvorijo tekom karamelizacije so tudi vzrok za obarvanost, ki je ena od fizikalnih lastnosti karamelizacije. Pri tem je značilno rumeno obarvanje, ki s časom postopoma prehaja v temno rjavo obarvanje. Prekurzor polimernih spojin, ki dajejo rjavo obarvanje, naj bi bil 5-HMF (iz heksoz) oziroma furfural (iz pentoz) (46).

Tako kot Maillardova reakcija je tudi karamelizacija precej dobro poznana na področju prehrane in živilske industrije. Na področju farmacije je omejena v glavnem na tekoče peroralne ali parenteralne farmacevtske oblike, ki vsebujejo saharozo ali glukozo. Pri tem raziskave kažejo, da karamelizacija v sirupih s saharozo ni problematična, saj so koncentracije 5-HMF pod  $0,1 \mu\text{g/ml}$ , v povsem drugačni luči pa jo moremo obravnavati pri parenteralnih



raztopinah z glukozo ali fruktozo, ki se sterilizirajo z avtoklaviranjem ali s suho sterilizacijo. Poleg tega, 5-HMF so kot nečistoto zasledili tudi v laktozi, kjer naj bi nastajal pri visoki temperaturi v procesu sušenja z razprševanjem. V prisotnosti učinkovin, ki so primarni ali sekundarni amini, pa lahko 5-HMF reagira s prostimi aminskimi skupinami, o čemer smo že predhodno pisali (stran 17) (38, 47).

Za vrednotenje 5-HMF so v uporabi spektrofotometrične in kromatografske metode (48, 49, 50).

### **3.6. Vrste kompatibilnostnih študij**

Glavni cilj kompatibilnostnih študij je v najkrajšem možnem času napovedati kompatibilnost, toda kljub njihovi pomembnosti ne obstaja noben splošno sprejet pristop. Za izbor ustrezne pomožne snovi si zato pri napovedi možne fizikalno-kemijske interakcije med zdravilno učinkovino in pomožno snovjo veliko pomagamo z literaturnimi podatki in strokovnimi izkušnjami. Tako se pri učinkovinah z aminskimi skupinami izogibamo uporabi laktoze in drugih reducirajočih sladkorjev zaradi možne Maillardove reakcije.

Izvedba predformulacijskih, kompatibilnostnih študij ni strogo podvržena določenim pravilom (ICH smernicam), ampak sta njihov razvoj in obseg prepuščena predformulacijski skupini. Običajno uporabljamo stresna testiranja, v katerih so zmesi zdravilne učinkovine in pomožnih snovi izpostavljene kratkotrajnim ekstremnim pogojem (temperatura, vlaga, oksidanti, pH, ionska moč, topila, svetloba). Navadno pripravimo binarne zmesi učinkovine in pomožnih snovi v razmerju 1:1 ali v realnem, predvidenim razmerju učinkovine in pomožne snovi v končni formulaciji. Homogeno zmešano binarno zmes izpostavimo povišani temperaturi z ali brez prisotnosti vlage in analiziramo ob določenih časovnih točkah. Pri tem vzorce vizualno ocenjujemo za kakršne koli barvne spremembe ali fizikalne lastnosti ter kvantitativno določimo vsebnost zdravilne učinkovine in razpadnih produktov z uporabo stabilnostno indikativne metode, kot je npr. HPLC. Ta pristop se imenuje izotermično stresno testiranje (IST) in je pogosto uporabljen pristop testiranja inkompatibilnosti (4). Poleg IST so za študije inkompatibilnosti zelo uporabne tudi termoanalizne tehnike kot je to npr. diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC). Gre za princip spreminjajoče se temperature, kjer le-to zvezno spreminjamo. Z DSC analizo že na majhni količini vzorca (1mg) opazujemo možne interakcije, ki nakazujejo na inkompatibilnost med učinkovino in pomožno snovjo. Interakcije se izražajo s spremembami v tališčih in obliki ter površini pikov v termogramu. Uporabnost DSC metode se kaže predvsem v njeni hitrosti pridobivanja informacij o fizikalno-kemijskih

interakcijah med dvema komponentama. Ravno zaradi visokih temperatur, katerim je vzorec izpostavljen tekom analize (tudi do 300°C ali več), je potrebna previdnost pri interpretaciji rezultatov. Vsaka sprememba namreč še ne pomeni zagotovo inkompatibilnosti, prav tako pa tudi odsotnost karakterističnih sprememb v termogramu še ne izključuje interakcije. Zato je potrebno pridobljene rezultate z DSC potrditi z IST in uporabo bolj selektivnih analiznih metod kot so npr. HPLC ali HPLC/MS, spektrofotometrija, TLC in druge (4, 50, 51). V literaturi najdemo številne tovrstne raziskave inkompatibilnosti, zlasti z laktozo, ki je verjetno ena od najbolj uporabljenih pomožnih snovi v trdnih farmacevtskih oblikah. V nadaljevanju je predstavljenih nekaj primerov inkompatibilnosti laktoze z zdravilnimi učinkovinami, ki vsebujejo v svoji strukturi amin kot funkcionalno skupino.

Hartauer in Guillory sta z uporabo DSC pokazala inkompatibilnost aminofilina z laktozo. Dodatno sta s FT-IR analizo binarnih zmesi (razmerje aminofilin/laktoza 1:5), po treh tednih pri 60°C, potrdila, da gre za kemijsko interakcijo med etilendiaminskim delom aminofilina in laktozo (52).

Desai je s sodelavci pokazal uporabnost DSC in X-ray difrakcije kot uporabni tehniki v študiji inkompatibilnosti etamsilata in flukonazola z laktozo. DSC termograma binarnih zmesi etamsilata in flukonazola z laktozo sta glede na termograme posameznih komponent pokazala dodatne pike, s čimer je bila nakazana inkompatibilnost učinkovin s pomožno snovjo. Analiza pripravljenih zmesi z X-ray difrakcijo je dodatno potrdila kemijsko interakcijo med komponentami, do katere pride že pri sobni temperaturi (53).

Verma in Garg sta na podlagi DSC rezultatov, skupaj z IR in HPLC analizo stresnih binarnih zmesi, uspešno razvila farmacevtsko obliko s podaljšanim sproščanjem z glipizidom, ki je bila stabilna 3 mesece na pospešenem pogoju 40°C/75% RH (51).

Z DSC so bile proučevane tudi inkompatibilnosti med laktozo in ranitidinijevim kloridom, aceklofenakom, oksprenololijevim kloridom in številnimi drugimi spojinami (54, 55, 56).

DSC sorodna termoanalizna tehnika je mikrokolorimetrija, ki je prav tako popularna v kompatibilnostnih študijah za detekcijo sprememb v trdnem stanju. Cavatur s sodelavci je pokazal uporabnost izotermične mikrokolorimetrije za detekcijo Maillardove reakcije med učinkovino kot primarnim aminom in laktozo. Binarne zmesi obeh komponent v razmerju 1:1 so analizirali pri 50°C, 60°C in 70°C v prisotnosti 200µl vode. Že z vizualnim vrednotenjem vzorcev pri 60°C so ugotovili rjavo obarvanje, kar je lahko dokaz Maillardove reakcije in

slednje tudi nedvoumno potrdili s spremembo v toplotnem toku v termogramu. Pokazali so, da je hitrost reakcije odvisna od temperature, pri višji temperaturi je razpad učinkovine hitrejši (57).

V bolj poglobljenih študijah so razpadni produkti identificirani z masno spektrometrijo, NMR, in ostalimi relevantnimi tehnikami. Identifikacija razpadnih produktov igra zelo pomembno vlogo v razvoju zdravil. Združitev visoko ločljivostne tekočinske kromatografije (HPLC) in masne spektrometrije (MS) je vodila do nastanka ene od najbolj pomembnih tehnik v farmacevtski analitiki, LC-MS, ki je zelo občutljiva za detekcijo nizkih vsebnosti neznanih spojin v kompliciranih sistemih kot so formulacije.

Monajjemzadeh s sodelavci se je v svoji raziskavi osredotočil na določevanje Maillardovih produktov v začetni fazi reakcije med aciklovirjem, primarnim aminom, in laktozo z uporabo HPLC, FTIR in LC-MS/MS analiznih tehnik. Najprej so z DSC analizo binarnih zmesi aciklovirja in brezvodne laktoze ter laktoze v obliki monohidrata pokazali inkompatibilnost med komponentami. FTIR analiza se je v tem primeru pokazala kot neuporabna zaradi prekrivanja določenih pikov. Binarne in različne večkomponentne zmesi aciklovirja in magnezijevega stearata, brezvodne laktoze, laktoze v obliki monohidrata ter z ali brez prisotnosti vode, izpostavljene 95°C, so po določenih časovnih intervalih analizirali. Z validirano HPLC analizo so določili vsebnosti aciklovirja in neznanega razpadnega produkta, ki nastane pod stresnimi pogoji. Z LC-MS/MS analizo so neznano nečistoto uspešno identificirali, čeprav je bila le-ta prisotna v zelo majhni količini. Gre za Schiffovo bazo, ki je produkt Maillardove reakcije med aciklovirjem in laktozo (18).

Razumljivo je, da se kemijska stabilnost zdravilne učinkovine v binarni zmesi lahko razlikuje od tiste v večkomponentnih sistemih ali prototipnih formulacijah. Tak primer je podal Abdoh s sodelavci. Proučevali so interakcije amlodipinijevega besilata kot primarnega amina z različnimi pomožnimi snovmi kot so brezvodna laktoza, magnezijev stearat, koruzni škrob, mikrokristalna celuloza, krospovidon, kalcijev karbonat in druge. Binarne zmesi učinkovine s posameznimi pomožnimi snovmi v razmerju 1:1 po 2 mesecih v odprtih vsebnikih pri 65°C in 40°C/75% RH niso pokazale inkompatibilnosti med komponentami. Nadaljne raziskave stresne stabilnosti večkomponentnih zmesi in prototipnih formulacij so pokazale nestabilnost amlodipinijevega besilata v kombinaciji z laktozo, magnezijevim stearatom in vodo. Glavni razpadni produkt Maillardove reakcije je bil dokazan s HPLC analizo (58).

V literaturi se pojavlja tudi vedno več predlogov, da bi za kompleksno zmes opravili simulacijo pogojev, ki jim bo izpostavljena zmes (mehanska obremenitev v terilnici za simulacijo mletja, dodatek topila za simulacijo granuliranja). Po poročanju določenih raziskovalcev naj bi Mailardova reakcija potrebovala določeno začetno aktivacijsko energijo, ki jo lahko vnesemo že npr. s pritiskom tekom tabletiranja, čeprav npr. Wirth s sodelavci z dodatnim mletjem in mešanjem stresnih zmesi med sekundarnim aminom in laktozo ni pokazal razlik v stabilnosti (16, 31).

Kakršen koli pristop k študiji kompatibilnosti uporabimo, je pomembno, da učinke pomožnih snovi ovrednotimo zlasti v odvisnosti od temperature, vlage in časa. Vlaga in temperatura sta primarna faktorja interakcij med učinkovino in pomožno snovjo, saj imata ključno vlogo v razpadu zdravilne učinkovine, njun vpliv pa je kljub temu potrebno obravnavati v odvisnosti od časa. Pospešujeta večino reakcij. Tudi če vlaga ne sodeluje v reakcijski shemi, omogoča oziroma olajša mobilnost molekul, s čimer se povečuje reaktivnost sistemov.

Voda lahko vstopa v interakcijo s trdno snovjo preko treh najpomembnejših poti: adsorpcija na površino trdne snovi, kristalno vezana in kondenzirana oziroma »bulk« voda.

Adsorbirane molekule vode na površini trdne snovi so lahko v monosloju (H-vezi) ali večsloju, odvisno od relativne vlažnosti. Načeloma se kristalno vezana voda kot tudi adsorbirana voda v prvem sloju, ki je v direktnem kontaktu s trdno snovjo, opisuje kot tesno vezana, ki ni na voljo za raztapljanje ali kakršnekoli druge interakcije. Kondenzirano oziroma »bulk« vodo in adsorbirano vodo v višjih plasteh pa opisujemo kot prosto, nevezano vodo, ki lahko služi za raztapljanje, omočenje, ostale spremembe v trdni snovi ter interakcije z ostalimi snovmi (59).

Voda ima lahko pomemben vpliv na stabilnost, odvisno od tega, kako močno je vezana in ali lahko pride v stik z učinkovino. Pomembnost vključitve vode v proces stresnega testiranja kompatibilnosti je zato še toliko bolj pomembno, saj vode ne moremo popolnoma izločiti iz formulacije. Mnoge pomožne snovi so higroskopne, večinoma vsebujejo več proste vode kot zdravilne učinkovine in z doseganjem termodinamično najbolj stabilnim stanjem, se voda v formulaciji sčasoma porazdeli med različne komponente. Tako je lahko zdravilna učinkovina v formulaciji izpostavljena relativno visoki količini vode (59).

Pomembno je poudariti, da pravilno zasnovana kompatibilnostna študija na osnovi strokovnih izkušenj, fizikalno-kemijskih lastnosti sestavin in literaturnih podatkov pomožnih snovi lahko

močno zmanjša obseg analiz. Hkrati pa z njo pridobimo pomembne razvojne podatke o potencialnih stabilnostnih problemih izbrane farmacevtske oblike. Zato je pomembno, da že v predformulacijski fazi detektiramo vse potencialne razpadne produkte, namesto da jih odkrivamo tekom redne stabilnostne študije. Kljub vsemu, realno sliko o kompatibilnosti dobimo šele s pospešenim in dolgoročnim testiranjem stabilnosti, ki mora biti izvedeno v skladu s smernicami ICH, predvsem glavno ICH smernico za stabilnostna testiranja novih zdravilnih učinkovin in zdravil Q1A (60). Kakovost izbrane sestave farmacevtske oblike mora ostati znotraj zahtevanih mej skozi celoten rok uporabnosti, s čimer pa bo zagotovljena tudi varnost in učinkovitost zdravila.

### **3.7. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)**

HPLC je splošno priznana analizna metoda s širokim področjem uporabe. Uvrščamo jo med separacijske analizne tehnike, kjer je kromatografska ločba zasnovana na porazdelitvi komponent vzorca med dvema fazama, mobilno fazo in stacionarno fazo. Za mobilno fazo se uporablja tekočina (organska topila, puferne raztopine, voda), stacionarna faza pa je v trdnem stanju, nanese ali kemično vezana je na delce polnila v kovinskih kolonah. Pri HPLC kromatografiji ločimo posamezne komponente vzorca, ki jih kvalitativno ali kvantitativno ovrednotimo. Pri analizi lahko uporabimo izokratsko ali gradientno elucijo. Izokratska elucija se uporablja takrat, ko se injicirani vzorec izpira skozi kolono z mobilno fazo enake sestave. Izokratska elucija je najpogostejše uporabljena in je primerna, kadar imajo komponente vzorca podobno afiniteto za stacionarno fazo in se zelo hitro eluirajo iz kolone druga za drugo. Gradientna elucija vključuje spremembe v sestavi mobilne faze. S spreminjanjem sestave mobilne faze dosežemo separacijo komponent vzorca, ki imajo različno afiniteto do stacionarne faze. Moč mobilne faze se povečuje od začetka do konca separacije. Ta način dovoljuje resolucijo komponent, ki se slabo vežejo na stacionarno fazo, po drugi strani pa zagotavlja, da retencijski časi poznejših pikov niso predolgi.

Prednosti HPLC metode se kažejo v točnosti, natančnosti in specifičnosti tudi za majhne količine nastalih razpadnih produktov. HPLC prevladuje kot stabilnostno indikativna metoda zaradi visoke zmogljivosti za ločevanje komponent vzorca, občutljivosti in specifičnosti. HPLC tehnika nam tako omogoča vrednotenje vsebnosti in identifikacije učinkovin, raziskave in detekcijo nečistot v učinkovinah ter identifikacijo in kvantifikacijo razpadnih produktov (5, 6, 61).

#### 4. NAMEN RAZISKOVALNEGA DELA

Iz literaturnih virov je razvidno, da se lahko reducirajoči sladkorji pojavijo kot nečistote v določenih nereducirajočih pomožnih snoveh kot sta npr. mikrokristalna celuloza in škrob. Te nečistote so lahko produkt samega pridobivanja pomožne snovi ali pa nastajajo tekom shranjevanja. Navadno so prisotne v zelo majhni količini, vendar nekateri znanstveniki poročajo, da lahko te nečistote sodelujejo v procesih Maillardove reakcije in karamelizacije.

Zato je namen naloge ugotoviti, ali lahko kondenzacijski produkti med reducirajočim sladkorjem in aminom in N-formil produkt, ki so znani kot označevalci Maillardove reakcije v prisotnosti tipičnih reducirajočih sladkorjev (npr. laktoza, glukoza), služijo tudi kot pokazatelji tovrstne reakcije v prisotnosti določenih nereducirajočih sladkorjev oz. pomožnih snovi. V ta namen bomo v raziskavo vključili saharozo, manitol, maltitol (tekoči in praškast) in glicerol. Ker je Maillardova reakcija z laktozo kot tipičnim reducirajočim sladkorjem zelo dobro raziskana in predstavljena v strokovnih člankih, bomo v testiranje vključili še laktozo za lažje razumevanje in interpretacijo rezultatov. Kot modelno spojino za proučevanje Maillardove reakcije bomo uporabili zdravilno učinkovino, ki je primarni amin.

Preko zasledovanja markerjev Maillardove reakcije bomo ugotavljali, ali obstajajo razlike v stabilnosti posameznih binarnih zmesi modelne spojine z izbranimi pomožnimi snovmi in ali so le-te signifikantne na nivoju predformulacijskih študij. Ker sta vlaga in temperatura ključna faktorja pospešitve reakcij med učinkovinami in pomožnimi snovmi, je namen ugotoviti njun vpliv na hitrost in obseg nastanka markerjev v testiranih binarnih zmesih.

Mehanizem nastanka N-formil produktov podrobno ni poznan. Domneva se, da je za formiliranje dušikovega atoma aminske skupine odgovorna mravljična kislina, ki nastaja pri razpadu 5-hidroksimetilfurfurala (5-HMF). Zato je cilj ugotoviti, ali je tvorba N-formil produktov v preiskovanih zmesih povezana s prisotnostjo 5-HMF. 5-HMF je pomemben produkt in značilni marker karamelizacije heksoz. Ugotavljali bomo, v kateri od testiranih pomožnih snovi se tvori 5-HMF in pod kakšnimi pogoji (vpliv T in/ali vlage). Poleg tega, 5-HMF lahko nastaja v nadaljnjih stopnjah Maillardove reakcije, in sicer v procesih dehidracije pri razpadu ARP. Zato bomo preverili, ali 5-HMF dodatno nastaja tudi v stresno izpostavljenih binarnih zmesih kot intermediat Maillardove reakcije.

Ker je sprememba videza pomembna in značilna lastnost Maillardove reakcije in karamelizacije, bomo poleg HPLC analize značilnih markerjev Maillardove reakcije in 5-

HMF spremljali tudi izgled stresno obremenjenih vzorcev. S primerjavo vizualne ocene barvne spremembe in količino značilnih nečistot bomo ugotavljali pomen spremembe videza kot pokazatelja v prepoznavanju Maillardove reakcije oz. karamelizacije z izbranimi pomožnimi snovmi na predformulacijskem nivoju.

## 5. EKSPERIMENTALNI DEL

### 5.1. Materiali, reagenti in aparature

#### **Pomožne snovi:**

Laktoza kristalna 200 mesh, lot UE3434 (Friesland Campina Domo B.V., Nizozemska)  
Saharoza (kristalni sladkor), lot. UE5130 (Pfeifer & Langen, Nemčija),  
Manitol, lot UE5937 (Cargill N.V. Palco GMBH, Italija),  
Maltitol, praškast- Maltisorb P90, lot UE5852 (Roquette Freres, Italija),  
Maltitol, tekoči- Lycasin 80/55, lot UE3590 (Roquette Freres, Italija),  
Glicerol, koncentriran, lot UB8022 (Oleon, Orka, podjetje za trgovino in storitve, Slovenija).  
Navedene pomožne snovi so ustrezale kakovosti Ph. Eur.

#### **Modelna spojina :**

Zdravilna učinkovina, ki je primarni amin.

#### **Standardi oz. referenčne spojine:**

Delovni standard modelne spojine, čistost 99.3% (Krka d.d., Novo mesto),  
Delovni standard 5-HMF, čistost 99.6% (Krka d.d., Novo mesto).

#### **Reagenti:**

H<sub>2</sub>O, demineralizirana voda (Milli Q Millipore, ZDA),  
etanol, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH, Baker HPLC analyzed (J.T.Baker, ZDA),  
acetonitril, CH<sub>3</sub>CN, gradient grade for HPLC (Merck, Nemčija),  
natrijev dihidrogenfosfat, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, p.a. (Fluka, Nemčija),  
fosforjeva(V) kislina, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%), Baker analyzed (J.T.Baker, ZDA),  
trietilamin, TEA, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, p.a. (Sigma Aldrich, Nemčija).

#### **Aparature:**

HPLC instrument Agilent Technologies 1100 (Agilent Technologies, Nemčija) z variabilnim UV detektorjem in kolonskim termostatom,  
Analitska tehtnica MC 210 P (Sartorius, Nemčija),  
pH meter (Metler Toledo, Švica),  
Ultrazvočna kadička Branson 8510 (Branson Ultrasonic Corp., ZDA),  
Centrifuga (Multifuge 1 S-R, Heraeus Nemčija),  
LTQ-Orbitrap (Thermo Scientific, Nemčija) - instrument za LC-MS analizo.

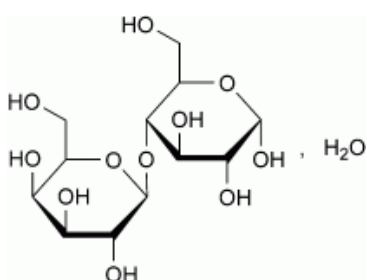


## 5.2. Kratka predstavitev uporabljenih pomožnih snovi

### Laktoza monohidrat

*Definicija:* Je monohidrat  $\alpha$ -laktoze, ki je ena od izomernih oblik laktoze v trdnem kristaliničnem stanju. Lahko vsebuje tudi različne količine amorfnе laktoze.

Laktoza je disaharid glukoze in galaktoze s kemijskim imenom O- $\beta$ -D-galaktopiranozil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glukopiranoza monohidrat in empirično formulo  $C_{12}H_{22}O_{11}$  (62, 63). Strukturna formula laktoze monohidrata je prikazana na sliki 7.



Slika 7: Strukturna formula laktoze monohidrata (62).

*Opis:* bel ali skoraj bel kristaliničen prašek.

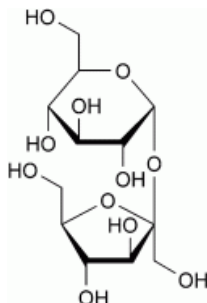
*Topnost:* lahko, vendar počasi topna v vodi in praktično netopna v 96% etanolu.

Laktoza monohidrat vsebuje približno 5% kristalno vezane vode. Glede na zahteve v Ph. Eur. so dovoljene vsebnosti za vodo od 4.5% do 5.5%. Laktoza kot reducirajoči sladkor reagira v Maillardovi reakciji in v procesu karamelizacije. Značilno je, da se tekom shranjevanju lahko rjavo obarva, še posebno v toplih in vlažnih pogojih (62, 64).

Laktoza je ena od najbolj pogosto uporabljenih pomožnih snovi v farmacevtski industriji. V glavnem se uporablja kot polnilo v tabletah, kapsulah, praških in v manjši meri v liofiliziranih izdelkih. Poleg tega se uporablja tudi kot nosilec učinkovine v praških za inhaliranje in v določene druge farmacevtske namene. Pridobiva se iz kravjega mleka. Glede na fizikalne karakteristike, kot so velikosti delcev in pretočne lastnosti, so komercialno na voljo različne oblike laktoze (64).

## Saharoza

**Definicija:** Saharoza je disaharid glukoze in fruktoze s kemijskim imenom  $\beta$ -D-fruktofuranozil- $\alpha$ -D-glukopiranozid in empirično formulo  $C_{12}H_{22}O_{11}$ . Vsebuje lahko do 0.5% vode (62). Strukturna formula saharoze je prikazana na sliki 8.



Slika 8: Strukturna formula saharoze (62).

**Opis:** bel ali skoraj bel kristaliničen prašek ali suhi, brezbarvni ali beli kristali.

**Topnost:** dobro topna v vodi, težko topna v 96% etanolu in praktično netopna v brezvodnem etanolu.

Saharoza je higroskopna, absorbira lahko do 1% vode. Je nereducirajoči sladkor, zato kot taka ne reagira v Maillardovi reakciji, razen v primeru hidrolize na glukozo in fruktozo. Znano je, da ob prisotnosti katalizatorjev, to je razredčenih mineralnih kislin pa tudi baz pri segrevanju poteče hidroliza saharoze do glukoze in fruktoze. Nastane ekvimolarna zmes glukoze in fruktoze, to je invertni sladkor. Do hidrolize pa lahko pride že pri samem segrevanju raztopine saharoze brez dodatka mineralnih kislin. Ravno zaradi tega je za saharozo priporočljivo shranjevanje v dobro zaprtih vsebnikih v hladnem in suhem prostoru (42).

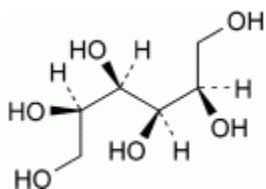
Glede na literaturne podatke saharoza karamelizira pri segrevanju pri temperaturi 160°C ali več. Pri tem je potrebno poudariti, da proces karamelizacije oziroma dehidracije sladkorne enote poteče šele po predhodni hidrolizi saharoze do glukoze in fruktoze. Hidroliza saharoze se začne že pri segrevanju nad 110°C (64, 65, 66).

Saharoza je široko uporabna pomožna snov v farmaciji. V obliki sirupa se uporablja kot vezivo pri vlažni granulaciji v procesu tabletiranja, kot sredstvo za oblaganje tablet ali kot vehikel v peroralnih tekočih farmacevtskih oblikah. V praškasti obliki se uporablja v glavnem kot polnilo in sladilo v žvečljivih tabletah in pastilah.

Pridobiva se iz sladkorne pese ali sladkornega trsa. Glede na zahteve v Ph.Eur. je v čisti obliki in ne vsebuje dodatkov (62, 64).

## Manitol

**Definicija:** Manitol je poliol (sladkorni alkohol) z empirično formulo  $C_6H_{14}O_6$  in s strukturno formulo prikazano na sliki 9. Je D-manitol, izomer sorbitola in kaže polimorfizem (slika 4) (62, 63, 65). Glede na veljavno monografijo v Ph. Eur. je predpisana vsebnost manitola od 98.0% do 102.0% računano na brezvodno substanco. Vsebuje lahko do 0.5% vode (62).



Slika 9: Strukturna formula manitola (62).

**Opis:** bel ali skoraj bel kristaliničen prašek ali sipke granule.

**Topnost:** dobro topen v vodi, topen v alkalnih raztopinah, zmerno topen v piridinu, zelo težko topen v 96% etanolu in praktično netopen v dietiletru.

**Pridobivanje:**

Pridobiva se s katalitično ali elektrolitično redukcijo monosaharidov manoze in glukoze. Oba reducirajoča sladkorja sta lahko prisotna v manitolu kot nečistoti. Glede na veljavno monografijo za manitol v Ph. Eur. je dovoljena vsebnost reducirajočih sladkorjev do 0.2% (32, 62).

**Uporaba v farmacevtske namene:**

Manitol se v farmaciji uporablja v glavnem kot polnilo v tabletah. Še posebej primerna je njegova uporaba pri učinkovinah, ki so občutljive na vlago, saj ni higroskopen. Zaradi sladkega okusa in hladilnega učinka se pogosto uporablja v proizvodnji žvečljivih tablet. Primeren je tako za direktno tabletiranje kot tudi za vlažno granuliranje.

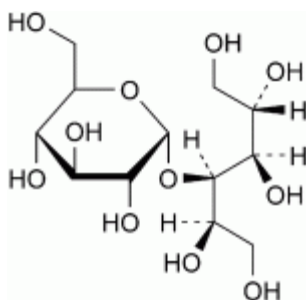
**Stabilnost in predpisani pogoji shranjevanja:**

Manitol je stabilen v suhem in v vodnih raztopinah. Vodne raztopine se lahko sterilizirajo s filtracijo ali z avtoklaviranjem (lahko tudi večkrat), pri tem ni fizikalnih ali kemijskih sprememb. V raztopini manitol ni občutljiv na prisotnost kislin, baz ali zračnega kisika brez prisotnosti katalizatorjev. Manitol ne sodeluje v Maillardovi reakciji. Predpisano shranjevanje za manitol je v dobro zaprtih vsebnikih v hladnem in suhem prostoru (64).

### Maltitol, praškast

*Definicija:* Maltitol je poliol (sladkorni alkohol) s kemijskim imenom 4-O- $\alpha$ -D-glukopiranozil-D-glukitol in empirično formulo  $C_{12}H_{24}O_{11}$ . Je disaharid glukoze in D-sorbitola, ki sta povezana preko glikozidne  $\alpha$ -(1-4) vezi (slika 10) (62, 63, 64). Glede na veljavno monografijo za maltitol v Ph. Eur. je predpisana vsebnost maltitola od 98.0% do 102.0%. Vsebnost vode je lahko do 1.0% (62).

Glede na veljavno monografijo za maltitol v Ph. Eur. je dovoljena vsebnost reducirajočih sladkorjev do 0.2% (62, 64).



Slika 10: Strukturna formula maltitola (62).

*Opis:* bel ali skoraj bel kristaliničen prašek.

*Topnost:* zelo dobro topen v vodi in praktično netopen v brezvodnem alkoholu.

Maltitol je brezvoden, pri sobni T absorbira vlago šele po izpostavljenosti vsaj 89% relativni zračni vlažnosti.

*Pridobivanje:*

Pridobivamo ga s kristalizacijo hidrogeniranega maltoznega sirupa. Maltozni sirup nastaja pri hidrolizi škroba.

*Uporaba v farmacevtske namene:*

V farmaciji se uporablja zlasti veliko v peroralnih farmacevtskih izdelkih. Uporablja se lahko kot sladilo, saj ne povzroča kariesa, je pa približno tako sladek kot saharoza. Uporablja se tudi kot polnilo, kot sredstvo za vlažno granuliranje in oblaganje trdnih farmacevtskih oblik za peroralno aplikacijo.

*Stabilnost in predpisani pogoji shranjevanja:*

Maltitol je termično in kemijsko zelo stabilen. Kot tak ne reagira v Maillardovi reakciji in karamelizaciji. Šele pri segrevanju nad 200°C začne razpadati (odvisno seveda od časa, temperature in ostalih pogojev) (64).

**Maltitol, tekoči**

*Definicija:* Po definiciji Ph.Eur. je tekoči maltitol vodna raztopina hidrogeniranega, delno hidroliziranega škroba, ki je sestavljen iz mešanice D-maltitola, D-glukitola (D-sorbitol) in hidrogeniranih oligo- in polisaharidov. Pri tem je dovoljena vsebnost D-maltitola v vodni raztopini najmanj 50.0% m/m (brezvodna substanca), D-sorbitola največ 8.0% m/m (brezvodna substanca) in celotne brezvodne snovi od 68.0% m/m do 85.0% m/m Vsebnost vode je lahko od 15.0 % m/m do 32.0% m/m (62).

*Opis:* bistra, brezbarvna gosta tekočina.

*Topnost:* meša se z vodo in z glicerolom.

Glede na veljavno monografijo za tekoči maltitol v Ph. Eur. je dovoljena vsebnost reducirajočih sladkorjev do 0.2% (62, 64).

*Pridobivanje:*

Pridobivamo ga s hidrogeniranjem maltoznega sirupa, slednji pa se pridobiva z encimsko hidrolizo škroba. Glede na vsebnost posameznih komponent izhajajo tudi različne fizikalne in kemijske lastnosti maltitola.

*Uporaba v farmacevtske namene:*

Tekoči maltitol se tako kot praškast maltitol uporablja zlasti veliko v peroralnih farmacevtskih izdelkih kot sladilo. Uporablja se tudi kot suspendirajoče sredstvo v peroralnih suspenzijah in kot alternativa saharoznemu sirupu, saj je viskozen, ne povzroča kariesa in ne kristalizira.

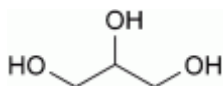
*Stabilnost in predpisani pogoji shranjevanja:*

Tekoči maltitol je pri sobni temperaturi in pH območju 3-9 stabilen 2 leti. Po 3 mesecih shranjevanja pri temperaturi 50°C in pH 2 hidrolizira v manjši meri (1.2%) in se obarva rumeno, medtem ko pri pH 3 hidrolizira le 0.2% tekočega maltitola, pri tem pa ni opaznih barvnih sprememb. Pod istimi pogoji ( $T = 50^{\circ}\text{C}$ ) in pH območju 4-9 ne hidrolizira, je pa opazno rahlo rumenkasto obarvanje.

Predpisano shranjevanje je v dobro zaprtih vsebnikih, zaščiteno pred vlago in toploto (64).

## Glicerol

*Definicija:* Glicerol je kemijsko propan-1,2,3-triol (slika 11) z empirično formulo  $C_3H_8O_3$  (62, 64). Glede na veljavno monografijo v Ph. Eur. je predpisana vsebnost glicerola od 98.0% m/m do 101.0% m/m (brezvodna substanca). Vsebuje lahko do 2.0% vode (62).



Slika 11: Strukturna formula glicerola (62).

*Opis:* bistra, brezbarvna ali skoraj brezbarvna, sirupasta tekočina, ki je spolzka na otip in zelo higroskopska (62, 64).

*Topnost:* meša se z vodo in z etanolom (96 %), težko topen v acetonu (62, 64).

*Pridobivanje:*

Glicerol se v glavnem pridobiva iz olj in maščob kot stranski produkt v proizvodnji mil in maščobnih kislin. Pridobiva se lahko tudi s fermentacijo iz naravnih virov (npr. iz melase pri predelavi sladkorne pese) ali pa tudi sintezno s kloriranjem in saponifikacijo propilena.

*Uporaba v farmacevtske namene:*

Glicerol se veliko uporablja v različne farmacevtske namene, in sicer v oralnih, peroralnih, dermalnih in parenteralnih izdelkih. Je zelo higroskopen, zato služi kot vlažilec zlasti v kozmetičnih in dermalnih izdelkih. Uporablja se tudi kot topilo, kotopilo, sladilo, protimikrobno sredstvo, sredstvo za povečanje viskoznosti ter kot plastifikator želatine v proizvodnji želatinastih kapsul in svečk. Dodaja pa se tudi v filmske obloge.

*Stabilnost in predpisani pogoji shranjevanja:*

Glicerol je zelo higroskopen. Pod normalnimi pogoji shranjevanja v prisotnosti zračnega kisika čisti glicerol ne oksidira. Razpada pri segrevanju, pri tem se tvori toksičen akrolein. Mešanice glicerola z vodo, etanolom (96%) in propilenglikolom so kemijsko stabilne. Pri shranjevanju pod 20°C lahko kristalizira, pri daljši izpostavitvi svetlobi pa se obarva črno. Predpisano shranjevanje je v dobro zaprtih vsebnikih, v hladnem in suhem prostoru (64).

### 5.3. Priprava binarnih zmesi

Binarne zmesi smo pripravili v razmerju učinkovina : pomožna snov = 1 : 20 (učinkovina : laktoza, učinkovina : saharoza, učinkovina : manitol, učinkovina : praškasti maltiol, učinkovina : tekoči maltitol, učinkovina : glicerol). V čaše smo natehtali ustrezno količino učinkovine in posamezne pomožne snovi. V primeru praškastih zmesi smo le-te stresli v posamezno vrečko. Vrečko smo zaprli na način, da smo vanjo ujeli tudi zadostno količino zraka (približno  $\frac{3}{4}$  volumna vrečke). Tako je bila zaprta vrečka napihnjena z zrakom, da se je pomožna snov lažje mešala z učinkovino. Vrečko z zmesjo smo ročno stresali in homogenizirali 10 min. Enak postopek smo opravili za vsako zmes, vedno smo vzeli novo, čisto vrečko.

V primeru tekočih pomožnih snovi (glicerol in tekoči maltitol) smo natehtane zmesi ročno mešali in homogenizirali s stekleno palčko v čaši (10 min).

### 5.4. Priprava vzorcev binarnih zmesi in pomožnih snovi za stresno testiranje stabilnosti v kontroliranih pogojih

Potrebno količino posamezne pomožne snovi in binarne zmesi, ki je potrebna za predvideno testiranje stresne stabilnosti, smo izračunali na podlagi potrebnega števila analiz. Pomožne snovi in pripravljene binarne zmesi smo polnili v steklene vial, ki smo jih zrakotesno zaprli (zaprt pogoj). Vial smo polnili enakomerno, tako da smo imeli v vseh vialah enako količino zraka. Preostali del zmesi oz. pomožne snovi smo razporedili na petrijevke (odprt pogoj). Zaprte vial smo izpostavili povišani temperaturi 60°C in 80°C, odprte zmesi oz. pomožne snovi v petrijevki pa smo dali na pogoj 40°C/75% RH. Vzorce smo hranili pri ustreznih pogojih 1 teden, 2 tedna, 1 mesec, 2 meseca in 3 mesece.

### 5.5. Analize

Ob planiranih časovnih točkah, smo vzorce, ki so bili izpostavljeni stresnim pogojem, preanalizirali:

- HPLC analiza vsebnosti 5-HMF, kondenzacijskih produktov, N-formil produkta in ostalih sorodnih substanc,
- HPLC analiza vsebnosti 5-HMF (42),
- vizualni opis videza.

### **5.5.1. HPLC analiza vsebnosti 5-HMF, kondenzacijskih produktov, N-formil produkta in ostalih sorodnih substanc**

HPLC analizo vzorcev binarnih zmesi smo izvedli po validirani gradientni HPLC metodi. Pri tem smo uporabili C6 fenil kolono s 3 $\mu$ m delci in ustrezno predkolono.

#### ***Kromatografski pogoji***

Gradientna elucija

Mobilna faza A: 0.02M raztopina fosfatnega pufra z dodatkom trietilamina, pH 5

Mobilna faza B: acetonitril

Čas kromatografiranja: 60 min in dodatnih 6 minut za uravnoteženje sistema

Pretok: 0.8ml/min

Detekcija: UV, valovna dolžina 290 nm (Maillardovi produkti), 284 nm (5-HMF), snemanje

UV spektrov od 210 nm do 400 nm

Injiciranje: 20 $\mu$ l

Temperatura kolone: 30°C

#### ***Topila in raztopine za HPLC meritve***

**Topilo 1:** voda / etanol = 50 / 50

**Topilo 2:** voda

#### **Raztopina standarda učinkovine (RSu1):**

V 25 ml merilno bučko smo natančno natehtali približno 15 mg standarda učinkovine in ga raztopili v 8 ml topila 1 (RSu1).

#### **Raztopina standarda 5-HMF (RSf1):**

V 20 ml merilno bučko smo natančno natehtali približno 12 mg standarda 5-HMF, nato smo ga raztopili v topilu 2 in dopolnili do oznake volumna (RSf1). V 50 ml merilno bučko smo odpipetirali 1,0 ml raztopine RSf1 in dopolnili s topilom 2 do oznake volumna (RSf2).

#### **Raztopina standardov (RS):**

V 100 ml merilno bučko smo odpipetirali 1,0 ml raztopine RSu1 in 2ml raztopine RSf2 ter dopolnili s topilom 1 do oznake volumna (RS).

(RS: pribl. 0.019mg učinkovine/ml in pribl. 0.00024mg 5-HMF/ml)



**Raztopina vzorca (RV):**

Za vsako binarno zmes smo natančno natehtali približno 315mg zmesi po 2 paralelki v 10ml merilne bučke. V vsako merilno bučko smo dodali 4.0 ml topila 1. Pripravljene vzorce smo obdelovali v ultrazvočni kadi približno 15 minut, medtem smo jih večkrat pretresli. Vzorce smo centrifugirali 20 min pri 3500 obratih /min (RV: pribl. 3.75mg učinkovine /ml).

**Meritve:**

V ustrezen kromatografski sistem smo injicirali raztopine vzorcev, posneli kromatograme in spremljali odzive 5-HMF, kondenzacijskih produktov, N-formil produkta in ostalih sorodnih substanc učinkovine. Obdelava podatkov je potekala po odstotkovni metodi, normirani na zunanji standard učinkovine oz. zunanji standard 5-HMF (ESTD %). Ker za znane nečistote kondenzacijski produkti in N-formil produkt ni na voljo ustreznega standarda, smo vsebnost teh nečistot računali ob predpostavki, da je odziv učinkovine in nečistot pod predpisanimi kromatografskimi pogoji enak. Dosegli smo dobro ločbo znanih nečistot in ostalih sorodnih substanc učinkovine.

Nekatere vzorce binarnih zmesi smo ob koncu testiranja pri stresnih pogojih analizirali z LC-MS analizo z namenom natančne identifikacije značilnih Maillardovih nečistot. Zaradi nezdržljivosti MS analizatorja s fosfatnim pufrom je bil le-ta zamenjan z acetatnim pufrom, ostali pogoji so ostali nespremenjeni (glej stran 35, točka 5.5.1.).

**5.5.2. HPLC analiza vsebnosti 5-HMF**

HPLC analizo vsebnosti 5-HMF v stresno izpostavljenih vzorcih pomožnih snovi smo izvedli po validirani izokratski HPLC metodi (42). Pri tem smo uporabili C18 kolono s 5 $\mu$ m delci.

***Kromatografski pogoji***

Izokratska elucija

Mobilna faza : voda / etanol = 90 / 10

Čas kromatografiranja: 10 min

Pretok: 1ml/min

Detekcija: UV, valovna dolžina 284 nm, snemanje UV spektrov od 210 nm do 400 nm

Injiciranje: 20 $\mu$ l

Temperatura kolone: 30°C

**Topila in raztopine za HPLC meritve**

**Topilo:** voda

**Raztopina standarda 5-HMF (RS):**

V 20 ml merilno bučko smo natančno natehtali približno 12 mg standarda 5-HMF, nato smo ga raztopili v topilu in dopolnili do oznake volumna (RS1). V 50 ml merilno bučko smo odpipetirali 1.0 ml raztopine RS1 in dopolnili s topilom do oznake volumna (RS2). Pripravljeno raztopino RS2 smo še enkrat redčili. 1.0 ml raztopine RS2 smo odpipetirali v 50 ml merilno bučko in dopolnili s topilom do oznake volumna (RS).

(RS: pribl. 0.00024mg 5-HMF/ml)

**Raztopina vzorca (RV):**

Za vsako pomožno snov smo natančno natehtali približno 300mg snovi po 2 paralelki v 10ml merilne bučke. V vsako merilno bučko smo dodali 4.0 ml topila. Pripravljene vzorce smo obdelovali v ultrazvočni kadi približno 10 minut. Vzorce smo medtem tudi večkrat pretresli.

**Meritve:**

V ustrezen kromatografski sistem smo injicirali raztopine vzorcev, posneli kromatograme in spremljali odzive 5-HMF. Obdelava podatkov je potekala po odstotkovni metodi, normirani na zunanji standard 5-HMF (ESTD %).

**5.5.3. Videz vzorcev**

Videz stresno izpostavljenih binarnih zmesi in pomožnih snovi smo opazovali vizualno. Barvne spremembe so podane opisno in/ali slikovno.

## 6. REZULTATI IN RAZPRAVA

Kot je bilo navedeno (stran 34) smo za stresno in pospešeno obremenitev binarnih zmesi in pomožnih snovi uporabili povišane temperature in/ali vlage, ki se navadno uporabljajo za testiranje stresne oz. pospešene stabilnosti v predformulacijski fazi:

- 40°C / 75% RH - odprt vzorec v petrijevki,
- 60°C - zaprt vzorec v stekleni vijali.

Z namenom pospešitve reakcije smo tako kot so to naredili tudi drugi raziskovalci v svojih raziskavah, vzorce dodatno izpostavili še višji temperaturi, 80°C. Skladno z že znanimi utemeljitvami v literaturi so ti rezultati podani za primerjavo in interpretacijo rezultatov znotraj eksperimentalnega dela in niso relevantni za napoved hitrosti in obsega reakcije pri nižjih pogojih oziroma normalnih pogojih shranjevanja (16, 30).

### 6.1. Stresno preizkušanje stabilnosti binarnih zmesi v trdnem stanju

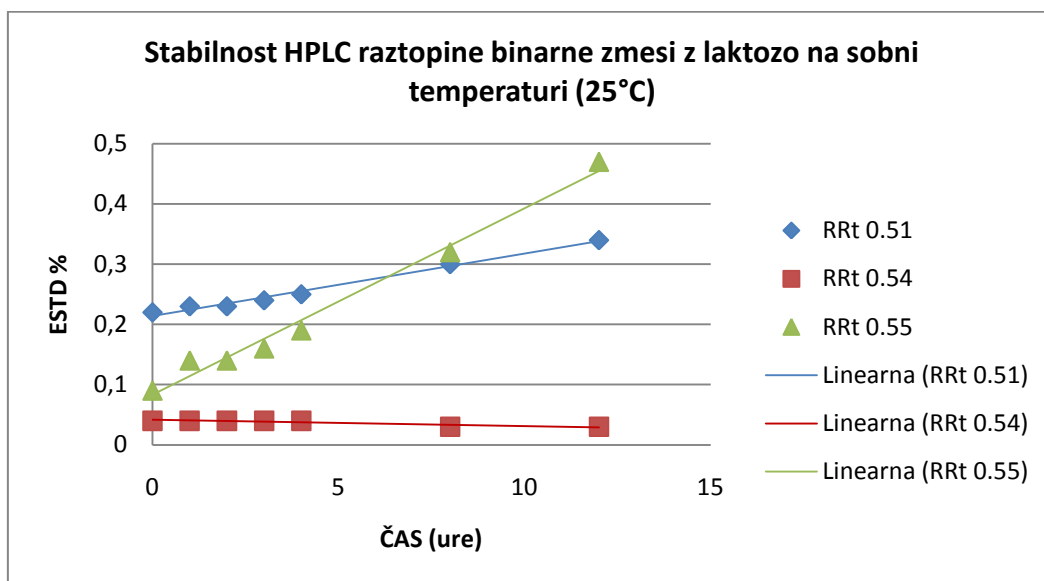
Najprej smo hoteli ugotoviti, ali lahko kondenzacijski produkt med učinkovino z aaminsko skupino in reducirajočim sladkorjem in N-formil produkt, ki sta znana kot značilna markerja Maillardove reakcije v prisotnosti tipičnih reducirajočih sladkorjev (npr. laktoza, glukoza), služita tudi kot pokazatelja tovrstne reakcije v prisotnosti določenih nereducirajočih sladkorjev oz. pomožnih snovi. V ta namen smo stresno obremenjene binarne zmesi modelne spojine s posameznimi pomožnimi snovmi analizirali z ustrezno validirano HPLC metodo, kjer smo spremljali nastanek kondenzacijskih produktov, N-formil produkta ter ostale nečistote.

#### *Stabilnost binarnih zmesi v raztopini za HPLC meritve*

Pred začetkom HPLC analiz smo preverili stabilnost raztopin binarnih zmesi za HPLC meritve. Pri vseh vzorcih razen pri zmesi z laktozo nismo zaznali sprememb po 24 urah hranjenja na sobni temperaturi. Raztopina binarne zmesi z laktozo je pri sobni temperaturi nestabilna, vsebnosti posameznih nečistot s časom naraščajo (tabela 2).

Tabela 2: Nečistote v raztopini binarne zmesi z laktozo za HPLC analizo po 12 urah pri sobni temperaturi (25°C) (RRt - relativni retencijski čas).

| RRt       | 0,51 | 0,54 | 0,55 |
|-----------|------|------|------|
| Čas (ure) |      |      |      |
| 0         | 0,22 | 0,04 | 0,09 |
| 1         | 0,23 | 0,04 | 0,14 |
| 2         | 0,23 | 0,04 | 0,14 |
| 3         | 0,24 | 0,04 | 0,16 |
| 4         | 0,25 | 0,04 | 0,19 |
| 8         | 0,30 | 0,03 | 0,32 |
| 12        | 0,34 | 0,03 | 0,47 |



Slika 12: Graf naraščanja nečistot v raztopini zmesi z laktozo za HPLC analizo na sobni temperaturi (ESTD % - odstotek nečistote preračunan na zunanji standard).

Na osnovi tabele 2 in grafa na sliki 12 je lepo vidno, da nečistoti z RRt 0.51 in 0.55 v raztopini binarne zmesi z laktozo za HPLC analizo s časom linearno naraščajo. Zlasti kritična je nečistota z RRt 0.55, ki že po prvi uri naraste za pribl. 50%. Nečistota z RRt 0.51 narašča počasneje, medtem ko se nečistota z RRt 0.54 praktično ne spreminja. Po osmih urah je sicer viden manjši padec, vendar predvidevamo, da je to zaradi analitske napake.

Pri pripravi raztopin binarnih zmesi z laktozo za HPLC meritve smo zato posebej pazili, da smo jih pripravili tik pred injiciranjem.

### **6.1.1. Rezultati vsebnosti posameznih nečistot v stresno obremenjenih binarnih zmesih**

V tabelah 3-9 so prikazani rezultati HPLC analize binarnih zmesi izpostavljenim stresnim preizkušanjem pri 80°C, 60°C in 40°C/75% RH za različna časovna obdobja. Za vsako od omenjenih binarnih zmesi smo spremljali in podali vsebnosti posameznih znanih nečistot, največjo posamezno in skupno vsoto vseh nečistot. Meritve so bile opravljene v dveh paralelkah, pri tem smo dobili zelo dobro ujemanje obeh vrednosti, končni rezultat pa je predstavljen kot povprečna vrednost obeh paralelek. V tabelah so podani rezultati tistih razpadnih in pretvorbenih produktov, ki se med testiranjem najbolj povečajo. Priloženi so tudi posamezni kromatogrami.

Pri posameznih časovnih točkah smo posneli tudi kromatograme stresno obremenjenih pomožnih snovi. Pri vseh stresno izpostavljenih pomožnih snoveh, razen pri tekočem maltitolu, po treh mesecih nismo zaznali drugih nečistot razen 5-HMF. Pri tekočem maltitolu se na pogoju 80°C pokažejo določeni vrhovi v začetnem delu kromatograma, ki pa so kromatografsko dobro ločeni od nečistot Maillardove reakcije v binarni zmesi.

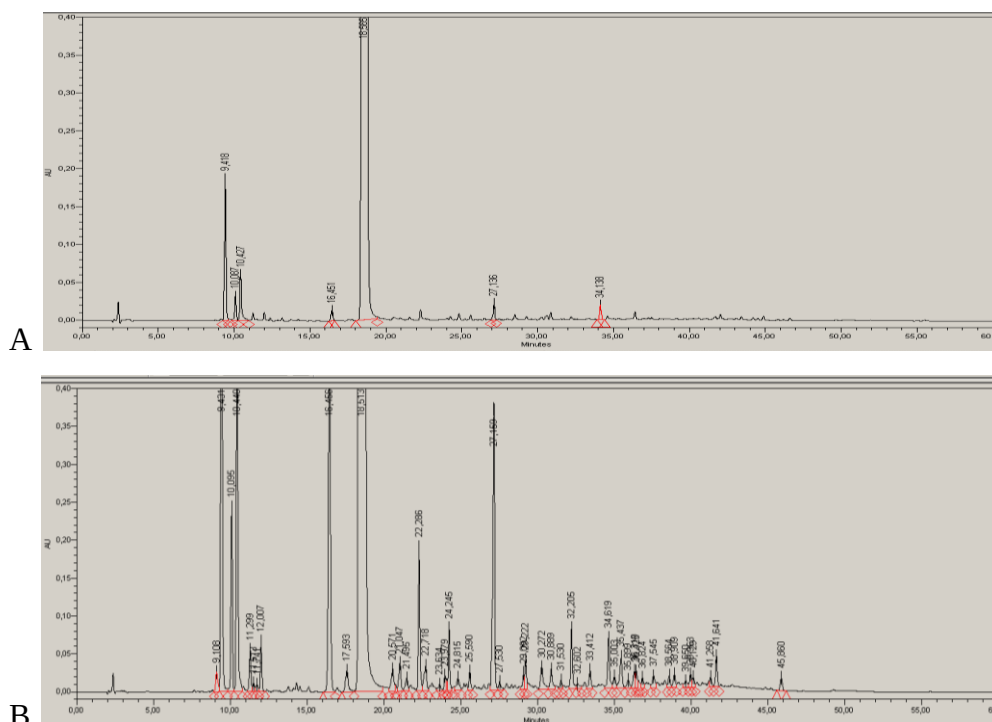
Iz literature je znano, da se v prisotnosti laktoze kot reducirajočega sladkorja in spojin z aminsko skupino pod stresnimi pogoji testiranja tvorijo kondenzacijski produkti med reducirajočim sladkorjem in aminom in N-formil produkt, ki jih znanstveniki uporabljajo kot označevalce Maillardove reakcije v predformulacijskih in formulacijskih študijah. Zato bomo za lažjo interpretacijo in razumevanje Maillardove reakcije na testiranih nereducirajočih pomožnih snoveh najprej predstavili rezultate stresne stabilnosti binarne zmesi z laktozo. V tabeli 3 so podani rezultati HPLC analiz vsebnosti značilnih Maillardovih nečistot v binarni zmesi z laktozo na odprtem pogoju 40°C/75%RH in zaprtem pogoju 60°C. Izpostavitve zmesi z laktozo temperaturi 80°C se je pokazalo za preveč stresni pogoj, saj se je zmes že po enem tednu izpostavljenosti obarvala močno temno rjavo.

Tabela 3: Rezultati HPLC meritev vsebnosti značilnih Maillardovih nečistot v binarni zmesi z laktozo na odprtem pogoju 40°C/75% RH in zaprtem pogoju 60°C.

| Čas                 | R-NH <sub>2</sub> + laktoza |             |             |             |             |             |             |                      |                                          |            |
|---------------------|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------------------|------------------------------------------|------------|
|                     | KP1 (%)                     |             | KP2 (%)     | KP1 (%)     |             | KP2 (%)     |             | N-formil produkt (%) | največja neznana posamezna nečistota (%) | Skupno (%) |
|                     | RRt<br>0.49                 | RRt<br>0.51 | RRt<br>0.54 | RRt<br>0.55 | RRt<br>0.56 | RRt<br>0.60 | RRt<br>0.65 | RRt 0.88             |                                          |            |
| 0                   | pmd                         | 0.26        | 0.06        | 0.06        | <0.03       | pmd         | pmd         | <0.01                | pmd                                      | 0.38       |
| 40°C/75%RH – odprto |                             |             |             |             |             |             |             |                      |                                          |            |
| 7d                  | pmd                         | 0.32        | 0,03        | 0,06        | 0,03        | pmd         | pmd         | <0.03                | pmd                                      | 0.44       |
| 14d                 | pmd                         | 0.32        | <0.03       | 0,07        | 0.04        | pmd         | pmd         | 0.03                 | <0.02                                    | 0.46       |
| 1m                  | pmd                         | 0.28        | pmd         | 0,06        | 0.06        | <0.01       | <0.01       | 0.03                 | <0.03                                    | 0.43       |
| 2m                  | pmd                         | 0.24        | pmd         | 0,04        | 0.08        | <0.01       | <0.01       | 0.03                 | <0.03                                    | 0.39       |
| 3m                  | pmd                         | 0.22        | pmd         | 0,04        | 0,09        | <0.02       | <0.02       | 0.03                 | 0.03                                     | 0.44       |
| 60°C- zaprto        |                             |             |             |             |             |             |             |                      |                                          |            |
| 7d                  | pmd                         | 0.28        | 0.03        | 0.1         | 0.16        | pmd         | pmd         | 0.03                 | 0.11                                     | 0.71       |
| 14d                 | pmd                         | 0.3         | <0.03       | 0.13        | 0.21        | <0.01       | <0.01       | 0.06                 | 0.15                                     | 0.95       |
| 1m                  | <0.01                       | 0.46        | pmd         | 0.2         | 0.37        | <0.03       | <0.03       | 0.18                 | 0.26                                     | 1.73       |
| 2m                  | 0.08                        | 2.77        | pmd         | 0.47        | 1.34        | 0.13        | 0.15        | 1.38                 | 1.05                                     | 11.16      |
| 3m                  | 0.04                        | 0.8         | pmd         | 0.28        | 0.6         | 0.07        | 0.08        | 0.76                 | 0.51                                     | 4.81       |

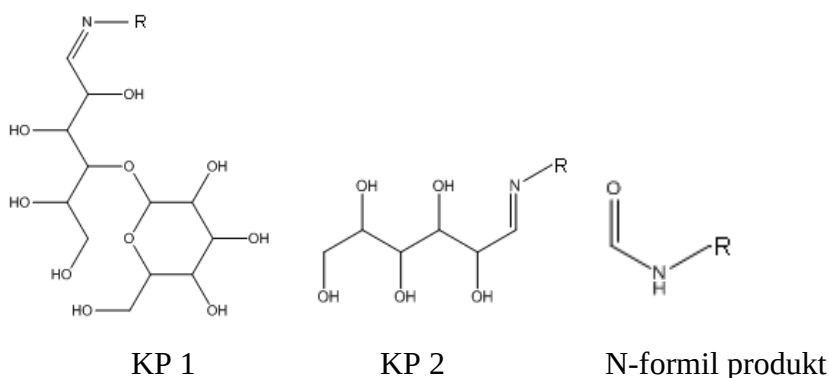
Pri izračunu vsote skupnih nečistot upoštevani le rezultati, katerih vrednosti so enake ali večje od meje poročanja 0.03%.

Legenda: pmd - pod mejo detekcije; RRt - relativni retencijski čas; R - preostali del modelne spojine, d - dnevi; m – meseci.



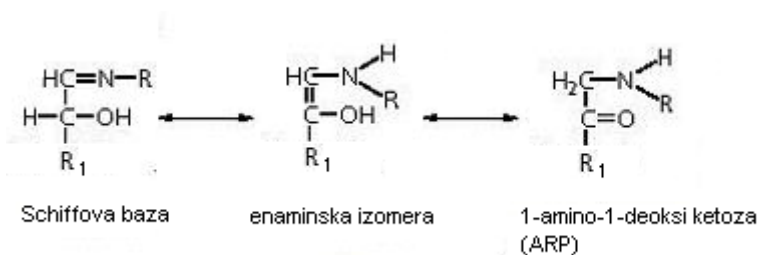
Slika 13: HPLC kromatograma binarne zmesi z laktozo po 3 mesecih na odprtem pogoju 40°C/75% RH (A) in zaprtem pogoju 60°C (B).

Na podlagi rezultatov v tabeli 3 in priloženih kromatogramov (slika 13) je razvidno, da pri izpostavitvi zmesi z laktozo povišani temperaturi in tudi vlagi porastejo določene nečistote, ki kažejo na inkompatibilnost med komponentami v zmesi. S ciljem ugotoviti, ali kateri od vidnih vrhov pripada kondenzacijskim produktom oz. N-formil produktu, ki nam bodo služili kot označevalci Maillardove reakcije v nadaljevanju naloge, smo vzorec ob koncu testiranja pri povišani temperaturi 60°C analizirali z LC-MS analizo. Tako smo identificirali nečistote KP1, KP2 in N-formil produkt s splošnimi strukturami prikazanimi na sliki 14.



Slika 14: Splošne strukture označevalcev Maillardove reakcije.

Lahko rečemo, da sta v danem primeru nečistoti KP1 in KP2 kondenzacijski produkt primarnega amina z laktozo (KP1) in glukozo oziroma galaktozo (KP2). Glede na točno izmerjeno molekulsko maso, predlagano molekulsko formulo in literaturne podatke domnevamo, da sta nečistoti strukturno lahko katerikoli od izomerov začetne stopnje Maillardove reakcije (slika 15) (16, 30).



Slika 15: Predpostavljeni izomeri kondenzacijskega produkta reducirajočega sladkorja s primarnim aminom, ki se tvorijo v začetni fazi Maillardove reakcije ( $R_1$ : preostali del reducirajočega sladkorja; R: preostali del modelne spojine).

Ker sta Schiffova baza in njena enaminska oblika nestabilna izomera, ki zlahka izomerizirata v bolj stabilno 1-amino-1-deoksi ketozo, predpostavljamo, da sta nečistoti v glavnem prisotni v obliki ARP. Skladno z literaturnimi navedbami se KP1 in KP2 zaradi izomerizacije in tudi mutarotacije kromatografsko vidita kot več vrhov pri različnih RRt. Kot je prikazano v literaturi na primeru pregabalina, predvidevamo, da se lahko pod enim vrhom skriva tudi več izomerov oz. diastereoizomerov. Za natančno identifikacijo posameznih spojin bi bilo potrebno v raziskavo vključiti še druge specifične tehnike, npr. preparativno tekočinsko kromatografijo v kombinaciji z NMR (5, 16, 17, 30).

Če primerjamo dobljene rezultate in prikazane kromatograme na odprtem in zaprtem pogoj vidimo, da je reakcija na odprtem pogoju 40°C/75% RH veliko bolj upočasnjena kot na zaprtem pogoju 60°C. Ob upoštevanju, da je reakcija v zmesi, ki je bila izpostavljena 80°C, že po enem tednu praktično skoraj potekla do konca (stran 40) in na podlagi rezultatov v tabeli 3 je razvidno, da na hitrost in obseg Maillardove reakcije modelne spojine z laktozo bistveno bolj vpliva povišana T kot pa povišana vlaga.

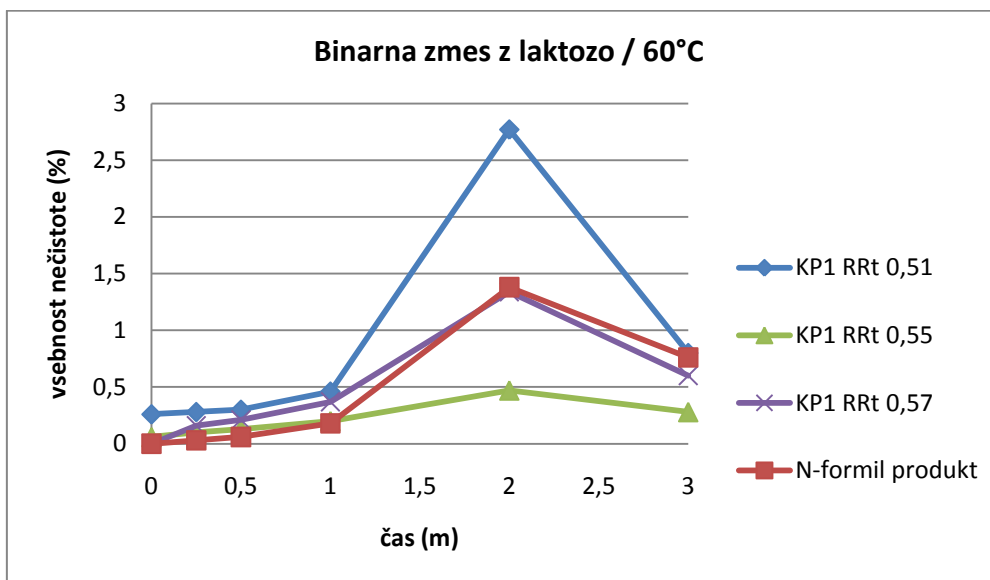
Glede na literaturne podatke je za potek Maillardove reakcije nujna prisotnost vode. Rezultati na zaprtem pogoju kažejo, da je že v sami laktozi dovolj proste vode za sprožitev reakcije. Ker voda sproti nastaja pri kondenzaciji, s tem spodbuja nove interakcije.

Vsebnost nečistote 0.26% z RRt 0.51 in v manjši meri prisotnost določenih drugih nečistot že na začetku testiranja nazorno kažejo, da se začetek Maillardove reakcije, ki vključuje kondenzacijo med reducirajočim sladkorjem in aminske skupine, aktivira zelo hitro, že na sobnih pogojih tekom priprave binarne zmesi. Poleg tega, dobljeni rezultati potrjujejo literaturne podatke, da sta glukoza in galaktoza prisotni kot nečistoti že v sami laktozi. Verjetno pa ima na hidrolizo laktoze in s tem nastanek omenjenih monosaharidov dodaten vpliv še stresno testiranje binarne zmesi pri povišani temperaturi in/ali vlagi.

Iz rezultatov v tabeli 3 in na sliki 16 je lepo vidno, da se sinteza posameznih in skupnih nečistot pri testiranju na 60°C s časom močno povečuje. V prvih 14 dnevih je viden le rahel porast, ki se do enega meseca oziroma še bolj do dveh mesecev naglo dvigne ter doseže maksimalne vrednosti. Od tu naprej pa je opazen padec tako v vsebnosti posameznih kot tudi skupnih nečistot. Opisan trend lahko razložimo s tem, da so ti markerji intermediati, ki se akumulirajo do določenih vrednosti. Z napredovanjem reakcije se ti intermediati nadalje pretvarjajo v druge intermediate, kar se na kromatogramu lepo vidi v nastanku oziroma porastu novih nečistot (slika 13). Vse to v zadnji stopnji vodi do končnih produktov



melanoidov. Ti so zelo težko topni v vodi, kar smo opazili že med pripravo raztopine binarne zmesi po treh mesecih na 60°C. Po centrifugiranju je na dnu raztopine ostala črna oborina, ki se ni raztopila. Poleg tega, Wirth s sodelavci v objavljenem članku poroča, da se v nadaljnjih pretvorbenih stopnjah reakcije sintetizira tudi veliko hlapnih spojin, ki jih s HPLC ne moremo detektirati (16).



Slika 16: Grafično prikazan trend nekaterih znanih nečistot, KP1 z RRt 0.51, RRt 0.55, RRt 0.57 in N-formil produkta, v binarni zmesi z laktozo po treh mesecih na zaprtem pogoju 60°C.

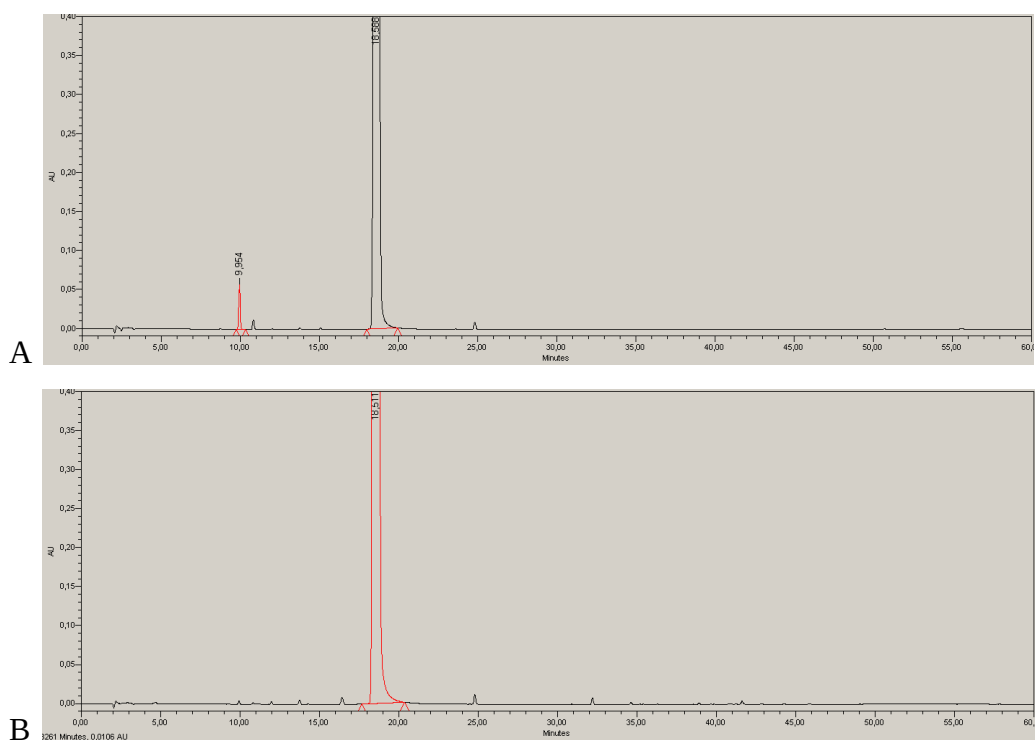
V nadaljevanju naloge bomo preko spremljanja pokazateljev Maillardove reakcije ugotavljali pomen tovrstne reakcije v nekaterih farmacevtsko pomembnih pomožnih snoveh, ki niso reducirajoči sladkorji, lahko pa jih vsebujejo ali pa kako drugače sodelujejo v Maillardovi reakciji. V tabelah 4-8 in priloženih kromatogramih (slike 17-20) so prikazani rezultati stresnega testiranja binarnih zmesi modelne spojine s saharozo, manitolom in maltitolom (tekoči in praškast). V tabeli 9 pa so rezultati povezani z glicerolom.

Tabela 4: Rezultati HPLC meritev posameznih Maillardovih nečistot v binarni zmesi s saharozo.

| čas                 | R-NH <sub>2</sub> + saharoza |              |                                          |            |
|---------------------|------------------------------|--------------|------------------------------------------|------------|
|                     | KP2 (%)                      | N-formil (%) | največja neznana posamezna nečistota (%) | Skupno (%) |
|                     | RRt 0.54                     | RRt 0.88     |                                          |            |
| 0                   | pmd                          | pmd          | pmd                                      | pmd        |
| 40°C/75%RH – odprto |                              |              |                                          |            |
| 14d                 | <0.01                        | pmd          | pmd                                      | pmd        |
| 1m                  | <0.01                        | pmd          | pmd                                      | <0.03      |
| 2m                  | <0.03                        | pmd          | pmd                                      | <0.03      |
| 3m                  | 0.06                         | pmd          | pmd                                      | 0.06       |
| 80°C- zaprto        |                              |              |                                          |            |
| 14d                 | <0.01                        | <0.01        | pmd                                      | <0.03      |
| 1m                  | <0.01                        | <0.01        | pmd                                      | <0.03      |
| 2m                  | <0.02                        | <0.02        | pmd                                      | <0.03      |
| 3m                  | <0.01                        | <0.02        | pmd                                      | <0.03      |

Pri izračunu vsote skupnih nečistot upoštevani le rezultati, katerih vrednosti so enake ali večje od meje poročanja 0.03%.

Legenda: pmd - pod mejo detekcije; RRt - relativni retencijski čas; R - preostali del modelne spojine, d - dnevi; m – meseci.



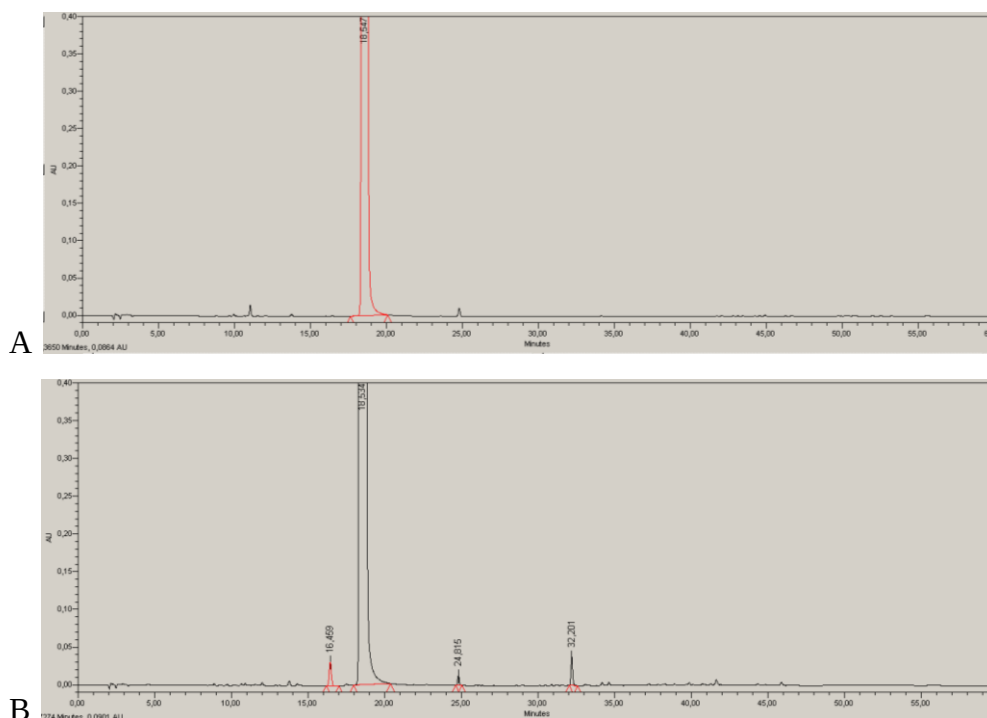
Slika 17: HPLC kromatograma binarne zmesi s saharozo po 3 mesecih na odprtem pogoju 40°C/75% RH (A) in zaprtem pogoju 80°C (B).

Tabela 5: Rezultati HPLC meritev glavnih Maillardovih nečistot v binarni zmesi z manitolom.

| čas                 | R-NH <sub>2</sub> + manitol |                      |                                          |            |
|---------------------|-----------------------------|----------------------|------------------------------------------|------------|
|                     | KP2 (%)                     | N-formil produkt (%) | največja neznana posamezna nečistota (%) | Skupno (%) |
|                     | RRt                         | RRt                  |                                          |            |
|                     | 0.58                        | 0.88                 |                                          |            |
| 0                   | 0.03                        | pmd                  | pmd                                      | 0.03       |
| 40°C/75%RH – odprto |                             |                      |                                          |            |
| 14d                 | <0.03                       | <0.01                | <0.01                                    | <0.03      |
| 1m                  | <0.03                       | <0.01                | <0.01                                    | <0.03      |
| 2m                  | <0.03                       | <0.01                | <0.01                                    | <0.03      |
| 3m                  | <0.02                       | <0.01                | <0.01                                    | <0.03      |
| 80°C- zaprto        |                             |                      |                                          |            |
| 14d                 | <0.03                       | 0.03                 | <0.02                                    | 0.03       |
| 1m                  | <0.01                       | 0.04                 | <0.03                                    | 0.04       |
| 2m                  | <0.01                       | 0.04                 | 0.04                                     | 0.08       |
| 3m                  | <0.01                       | 0.05                 | 0.05                                     | 0.1        |

Pri izračunu vsote skupnih nečistot upoštevani le rezultati, katerih vrednosti so enake ali večje od meje poročanja 0.03%.

Legenda: pmd - pod mejo detekcije; RRt - relativni retencijski čas; R - preostali del modelne spojine, d - dnevi; m – meseci.



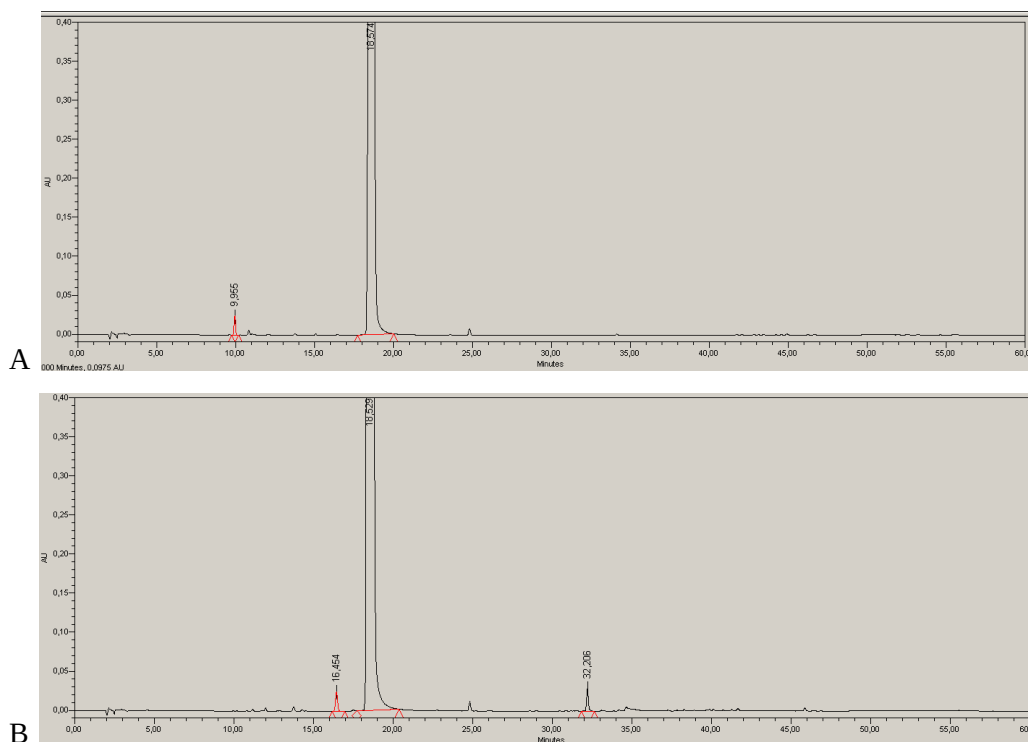
Slika 18: HPLC kromatograma binarne zmesi z manitolom po 3 mesecih na odprtem pogoju 40°C/75% RH (A) in zaprtem pogoju 80°C (B).

Tabela 6: Rezultati HPLC meritev glavnih Maillardovih nečistot v binarni zmesi s praškastim maltitolom.

| čas                 | R-NH <sub>2</sub> + praškasti maltitol |                      |                                          |            |
|---------------------|----------------------------------------|----------------------|------------------------------------------|------------|
|                     | KP2 (%)                                | N-formil produkt (%) | največja neznana posamezna nečistota (%) | Skupno (%) |
|                     | RRt<br>0.54                            | RRt<br>0.88          |                                          |            |
| 0                   | <0.03                                  | pmd                  | pmd                                      | <0.03      |
| 40°C/75%RH – odprto |                                        |                      |                                          |            |
| 14d                 | 0.05                                   | pmd                  | pmd                                      | 0.05       |
| 1m                  | 0.05                                   | <0.01                | <0.01                                    | 0.05       |
| 2m                  | 0.05                                   | <0.01                | <0.01                                    | 0.05       |
| 3m                  | 0.05                                   | <0.01                | <0.01                                    | 0.05       |
| 80°C- zaprto        |                                        |                      |                                          |            |
| 14d                 | <0.01                                  | 0.03                 | <0.02                                    | 0.03       |
| 1m                  | <0.01                                  | 0.03                 | <0.03                                    | 0.03       |
| 2m                  | pmd                                    | 0.03                 | 0.03                                     | 0.03       |
| 3m                  | pmd                                    | 0.04                 | 0.04                                     | 0.08       |

Pri izračunu vsote skupnih nečistot upoštevani le rezultati, katerih vrednosti so enake ali večje od meje poročanja 0.03%.

Legenda: pmd - pod mejo detekcije; RRt - relativni retencijski čas; R - preostali del modelne spojine, d - dnevi; m – meseci.



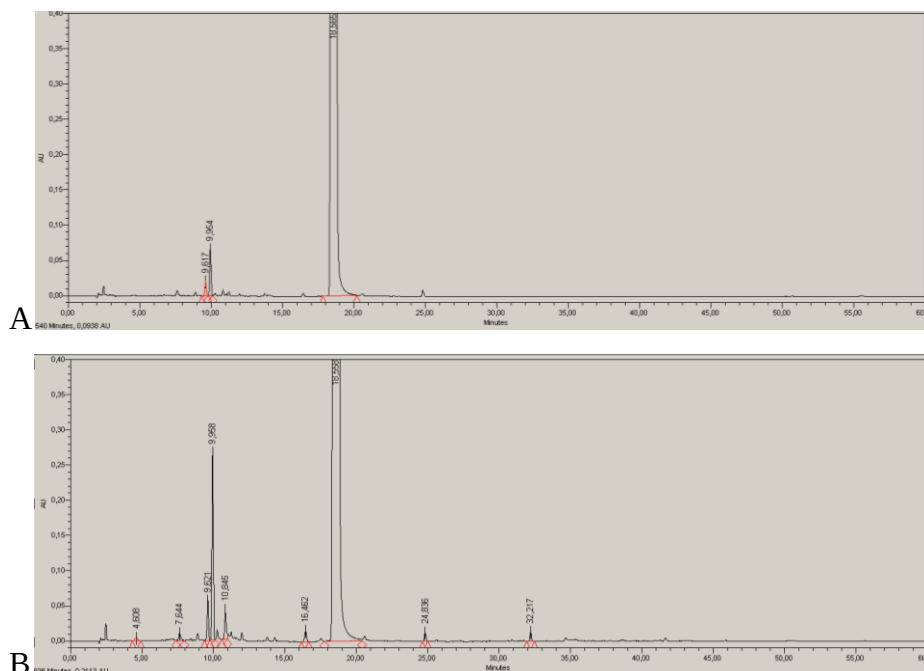
Slika 19: HPLC kromatograma binarne zmesi s praškastim maltitolom po 3 mesecih na odprtem pogoju 40°C/75% RH (A) in zaprtem pogoju 80°C (B).

Tabela 7: Rezultati HPLC meritev glavnih Maillardovih nečistot v binarni zmesi s tekočim maltitolom na odprtem pogoju 40°C/75%RH in zaprtem pogoju 60°C.

| čas                 | R-NH <sub>2</sub> + tekoči maltitol |             |             |                      |                                          |            |
|---------------------|-------------------------------------|-------------|-------------|----------------------|------------------------------------------|------------|
|                     | KP1(%)                              | KP2 (%)     |             | N-formil produkt (%) | največja neznana posamezna nečistota (%) | Skupno (%) |
|                     | RRt<br>0.52                         | RRt<br>0.54 | RRt<br>0.58 | RRt 0.88             |                                          |            |
| 0                   | <0.01                               | <0.03       | pmd         | pmd                  | pmd                                      | <0.03      |
| 40°C/75%RH – odprto |                                     |             |             |                      |                                          |            |
| 7d                  | <0.01                               | 0.05        | <0.01       | <0.01                | pmd                                      | 0.05       |
| 14d                 | <0.01                               | 0.06        | <0.01       | <0.01                | pmd                                      | 0.06       |
| 1m                  | <0.02                               | 0.06        | <0.01       | <0.01                | <0.01                                    | 0.06       |
| 2m                  | <0.02                               | 0.04        | <0.01       | <0.01                | <0.01                                    | 0.04       |
| 3m                  | <0.03                               | 0.07        | <0.01       | <0.01                | <0.01                                    | 0.07       |
| 60°C-zaprto         |                                     |             |             |                      |                                          |            |
| 7d                  | 0.03                                | 0.09        | <0.03       | <0.01                | pmd                                      | 0.12       |
| 14d                 | 0.03                                | 0.12        | <0.03       | <0.01                | <0.01                                    | 0.15       |
| 1m                  | 0.04                                | 0.16        | 0.03        | <0.01                | <0.01                                    | 0.23       |
| 2m                  | 0.06                                | 0.23        | 0.05        | <0.03                | <0.03                                    | 0.34       |
| 3m                  | 0.06                                | 0.28        | 0.06        | 0.03                 | 0.03                                     | 0.46       |

Pri izračunu vsote skupnih nečistot upoštevani le rezultati, katerih vrednosti so enake ali večje od meje poročanja 0.03%.

Legenda: pmd - pod mejo detekcije; RRt - relativni retencijski čas; R - preostali del modelne spojine, d - dnevi; m – meseci.



Slika 20: HPLC kromatograma binarne zmesi s tekočim maltitolom po 3 mesecih na odprtem pogoju 40°C/75% RH (A) in zaprtem pogoju 60°C (B).

Kot je razvidno iz rezultatov v tabelah (4-7) in priloženih kromatogramih (17-20) smo pri vseh stresno izpostavljenih zmesih s saharozo, manitolom in maltitolom (tekoči in praškast) detektirali markerje Maillardove reakcije. Glede na točno izmerjeno molekulsko maso in predlagano molekulsko formulo z LC-MS analizo označeni markerji s splošno strukturo pripadajo spojinam KP1, KP2 in N-formil produktu (sliki 14 in 15). Iz strukturnih razlik v reducirajočih sladkorjih, ki jih posamezne testirane pomožne snovi lahko vsebujejo, izhajajo tudi razlike v RRt-jih spojin KP1 in KP2. Zaradi lažje preglednosti smo nečistoti, ki sta kondenzacijska produkta reducirajočih monosaharidov ali disaharidov z aminom, označili z istima oznakama kot pri binarni zmesi z laktozo.

Če primerjamo dobljene rezultate in prikazane kromatograme za binarne zmesi s saharozo, manitolom in maltitolom na odprtem in zaprtem pogoj vidimo, da sta skladno z že podanimi ugotovitvami pri zmesi z laktozo hitrost in obseg Maillardove reakcije modelne spojine z izbranimi pomožnimi snovmi bistveno bolj povečani s povišano T kot pa s prisotnostjo višje zunanje vlage. Poleg tega dani rezultati potrjujejo, da se začetek Maillardove reakcije, ki vključuje kondenzacijo med reducirajočim sladkorjem in aminske skupino, aktivira že na sobnih pogojih med pripravo binarne zmesi.

Manitol, maltitol in saharoza so nereducirajoči sladkorji, ki kot taki ne reagirajo v Maillardovi reakciji. Kljub temu, literaturni podatki kažejo, da so lahko reducirajoče snovi prisotne kot nečistote v omenjenih pomožnih snoveh zaradi postopka pridobivanja (maltitol, manitol), lahko pa nastajajo s hidrolizo pod vplivom povišane temperature in/ali vlage (maltitol, saharoza). Na osnovi omenjenih dejstev si lahko razložimo, zakaj je hitrost in obseg Maillardove reakcije nekoliko večja v zmes z manitolom in praškastim maltitolom v primerjavi s saharozo ter zakaj je na odprtih pogojih nekoliko večji porast kondenzacijskega produkta KP2 pri zmesi s saharozo v primerjavi z manitolom in praškastim maltitolom. Kljub temu je iz rezultatov in priloženih kromatogramov razvidno, da so binarne zmesi s saharozo, manitolom in praškastim maltitolom na odprtem pogoj 40°C/75%RH kot tudi na zaprtem pogoj pri visoki temperaturi 80°C zelo stabilne. Po treh mesecih izpostavljenosti stresnim pogojem je bila vsebnost posameznih znanih nečistot oziroma skupnih nečistot največ do 0.06% oziroma do 0.1%.

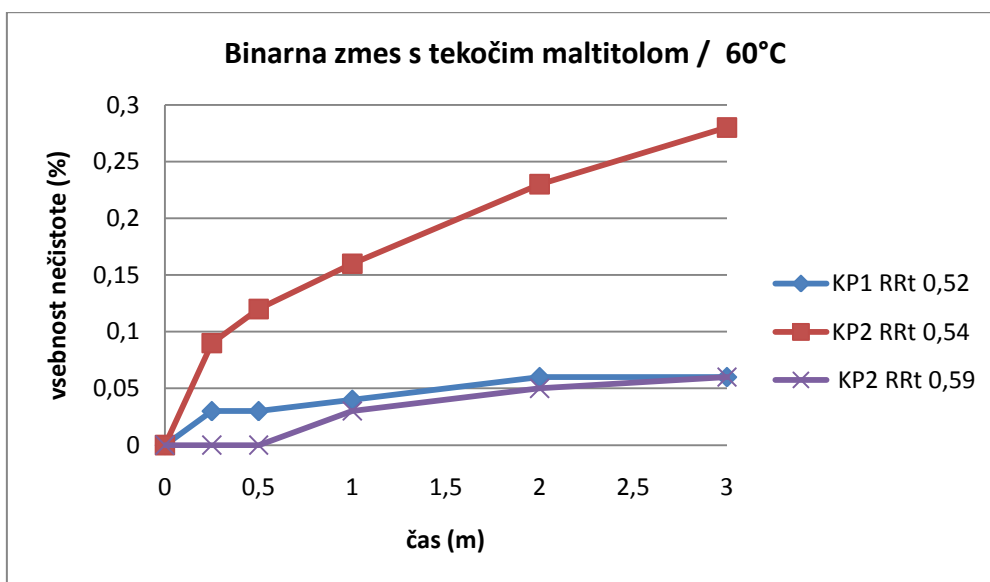
Izjema je tekoči maltitol, ki na zaprtem pogoj sicer pri nižji temperaturi testiranja, 60°C, kaže večji porast zlasti v smeri kondenzacijskih produktov KP1 in KP2, medtem ko so razlike s saharozo, manitolom in praškastim maltitolom na odprtem pogoj zelo majhne.

Pomembno je poudariti, da je za razliko od ostalih pomožnih snovi, ki so v trdnem stanju, tekoči maltitol gosta brezbarvna tekočina, ki vsebuje tudi več vode (od 15.0 % do 32.0% ).

Na splošno velja, da je mobilnost molekul v tekočini bistveno večja kot v trdni snovi, zato so reakcije v tekočem stanju hitrejšje.

Poleg tega je zaradi večje količine vode lahko pospešena hidroliza tekočega maltitola, kar se še bolj izraža pri povišani temperaturi. Slednje potrjujejo tudi rezultati povečanega porasta nečistote KP2, ki je kondenzacijski produkt modelne spojine z reducirajočim monosaharidom (najverjetneje glukozo) pri povišani temperaturi 60°C (tabela 7 in slika 21).

Na podlagi napisanih izhodišč lahko sklepamo, zakaj sta hitrost in obseg Maillardove reakcije v zmesi s tekočim maltitolom v primerjavi s saharozo, manitolom in praškastim maltitolom večja pri zaprtih pogojih, kjer so višje temperature testiranja.



Slika 21: Grafično prikazan trend nekaterih nečistot, KP1 z RRt 0.52 in KP2 z RRt 0.54, RRt 0.59 in N-formil produkta, v binarni zmesi s tekočim maltitolom po treh mesecih na zaprtem pogoj 60°C (RRt – relativni retencijski čas).

Kljub vsemu, če primerjamo rezultate stresnega testiranja zmesi s tekočim maltitolom in zmesi z laktozo, pa je vidno, da je hitrost in obseg Maillardove reakcije pri tekočem maltitolu pod enakimi eksperimentalnimi pogoji veliko bolj upočasnjena in omejena v glavnem le na tvorbo kondenzacijskih produktov.

V tabeli 8 so za primerjavo podani še rezultati stresnega testiranja binarne zmesi s tekočim maltitolom pri temperaturi 80°C. Iz rezultatov v tabeli 8 in na podlagi slike 22 je razvidno, da porast markerjev, ki so intermediati Maillardove reakcije sledijo trendu, ki ga kažejo rezultati

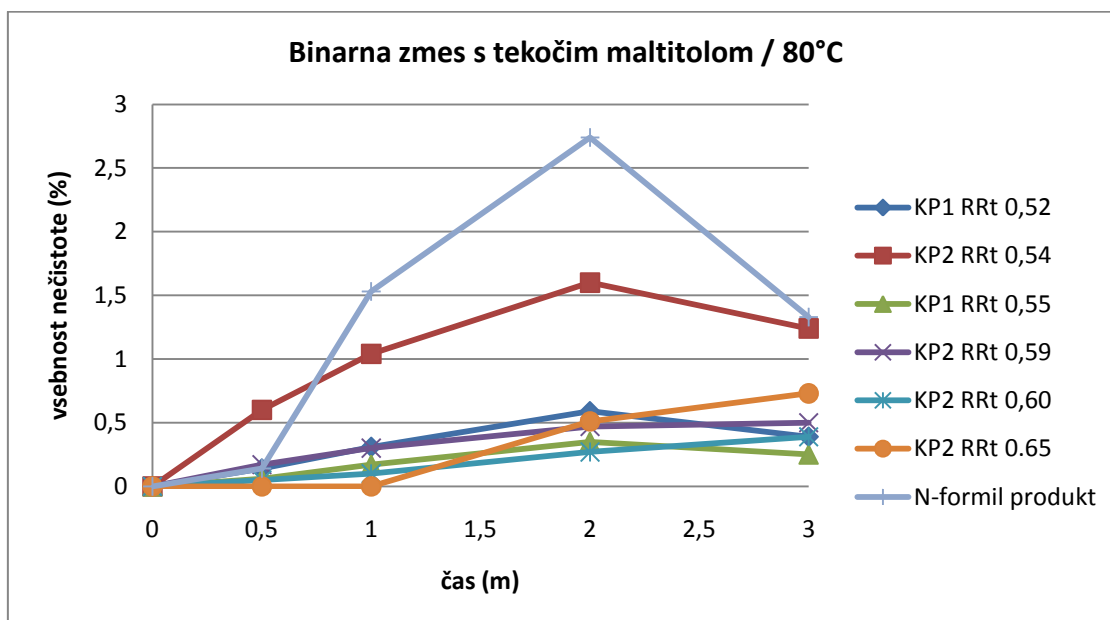
stresnega testiranja binarne zmesi z laktozo na pogoju 60°C. V primerjavi z laktozo je pri tekočem maltitolu viden nekoliko manjši padec skupnih nečistot in porast nečistote KP2 pri RRt 0.58, RRt 0.60, RRt 0.64 v času od dveh do treh mesecev. Te ugotovitve potrjujejo predhodna predvidevanja, da sočasno s procesom Maillardove reakcije poteka še proces hidrolize tekočega maltitola.

Tabela 8: Rezultati HPLC meritev glavnih Maillardovih nečistot v binarni zmesi s tekočim maltitolom na zaprtem pogoju 80°C.

| čas          | R-NH <sub>2</sub> + tekoči maltitol |             |             |             |             |             |             |                             |                                                   |               |
|--------------|-------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------------------------|---------------------------------------------------|---------------|
|              | KP1 (%)                             |             | KP2 (%)     | KP1 (%)     | KP2 (%)     |             |             | N-formil<br>RRt 0.88<br>(%) | največja<br>neznana<br>posamezna<br>nečistota (%) | Skupno<br>(%) |
|              | RRt<br>0.50                         | RRt<br>0.52 | RRt<br>0.54 | RRt<br>0.55 | RRt<br>0.58 | RRt<br>0.60 | RRt<br>0.64 |                             |                                                   |               |
| 0            | pmd                                 | <0.01       | <0.03       | pmd         | pmd         | <0.01       | <0.01       | pmd                         | pmd                                               | <0.03         |
| 80°C- zaprto |                                     |             |             |             |             |             |             |                             |                                                   |               |
| 14d          | <0.03                               | 0.14        | 0.60        | 0.06        | 0.17        | 0.05        | <0.03       | 0.14                        | 0.07                                              | 1.35          |
| 1m           | <0.03                               | 0.31        | 1.04        | 0.17        | 0.30        | 0.10        | 0.21        | 1.53                        | 0.80                                              | 4.81          |
| 2m           | 0.08                                | 0.59        | 1.60        | 0.35        | 0.47        | 0.27        | 0.51        | 2.74                        | 1.47                                              | 13.46         |
| 3m           | 0.08                                | 0.39        | 1.24        | 0.25        | 0.5         | 0.39        | 0.73        | 1.33                        | 1.76                                              | 13.25         |

Pri izračunu vsote skupnih nečistot upoštevani le rezultati, katerih vrednosti so enake ali večje od meje poročanja 0.05%.

Legenda: pmd - pod mejo detekcije; RRt - relativni retencijski čas; R - preostali del modelne spojine, d - dnevi; m – meseci.



Slika 22: Grafično prikazan trend znanih nečistot, KP1 z RRt 0.52, RRt 0.55, KP2 z RRt 0.54, RRt 0.59, RRt 0.60, RRt 0.65 in N-formil produkta, v binarni zmesi s tekočim maltitolom po treh mesecih na zaprtem pogoju 80°C (RRt – relativni retencijski čas).



Glede na literaturne podatke nekateri znanstveniki navajajo, da naj bi glicerol sodeloval v procesih Maillardove reakcije, vendar pri tem povsem natančen mehanizem ni znan. Domnevajo, da naj bi bili v sam proces vključeni njegovi oksidacijski produkti (npr. akrolein, gliceraldehid, 2-oksopropanal,...). Opazili so tudi, da je pri segrevanju glicerola z aminokislinami prihajalo do značilnih rjavih obarvanj (67). Zato je bil naš namen vključitve glicerola v študijo ugotoviti, ali so morebitne barvne spremembe stresno obremenjenih zmesi modelne spojine z glicerolom povezane s tvorbo značilnih markerjev Maillardove reakcije.

Tabela 9: Rezultati HPLC meritev nečistot v binarni zmesi z glicerolom na odprtem pogoju 40°C/75%RH in zaprtem pogoju 60°C in 80°C.

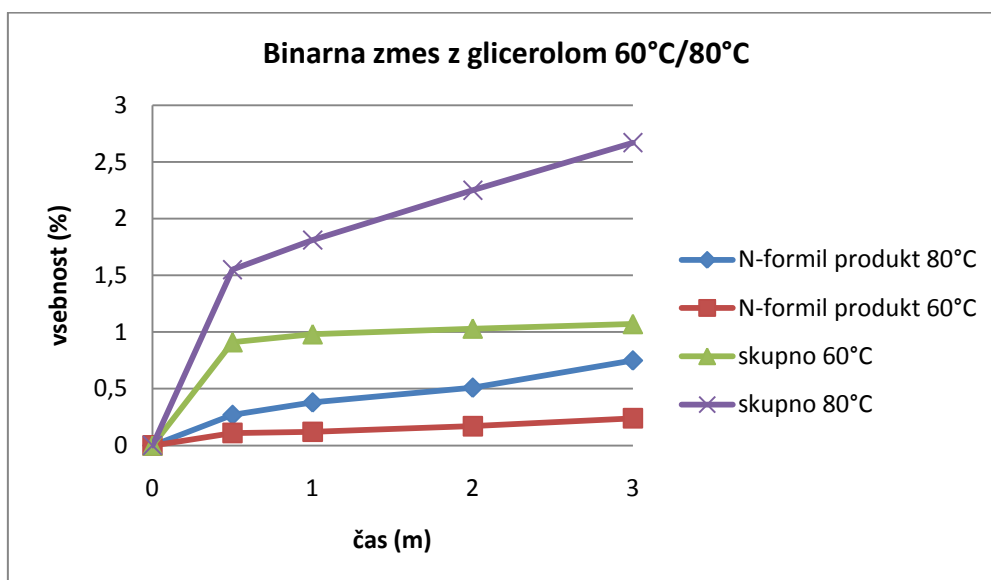
| čas              | R-NH <sub>2</sub> + glicerol        |                                                |               |
|------------------|-------------------------------------|------------------------------------------------|---------------|
|                  | N-formil produkt<br>(%)<br>RRt 0.88 | največja neznana<br>posamezna<br>nečistota (%) | Skupno<br>(%) |
| 0                | < 0.01                              | pmd                                            | <0.03         |
| 40°C/75%- odprto |                                     |                                                |               |
| 14d              | < 0.01                              | 0.03                                           | 0.03          |
| 1m               | < 0.01                              | 0.12                                           | 0.12          |
| 2m               | < 0.01                              | 0.22                                           | 0.22          |
| 3m               | < 0.01                              | 0.43                                           | 0.43          |
| 60°C- zaprto     |                                     |                                                |               |
| 14d              | 0.11                                | 0.38                                           | 0.91          |
| 1m               | 0.12                                | 0.37                                           | 0.98          |
| 2m               | 0.17                                | 0.19                                           | 1.03          |
| 3m               | 0.24                                | 0.13                                           | 1.07          |
| 80°C- zaprto     |                                     |                                                |               |
| 14d              | 0.27                                | 0.24                                           | 1.55          |
| 1m               | 0.38                                | 0.22                                           | 1.81          |
| 2m               | 0.51                                | 0.21                                           | 2.25          |
| 3m               | 0.75                                | 0.25                                           | 2.67          |

Pri izračunu vsote skupnih nečistot upoštevani le rezultati, katerih vrednosti so enake ali večje od meje poročanja 0.03%.

Legenda: pmd - pod mejo detekcije; RRt - relativni retencijski čas; R - preostali del modelne spojine, d - dnevi; m – meseci.

S HPLC analizo stresno obremenjene binarne zmesi z glicerolom smo uspeli identificirati le N-formil produkt. Ostalih nečistot, ki bi bili morebitni kondenzacijski produkti modelne spojine z reducirajočimi sladkorji v skladu s pričakovanji nismo detektirali.

Iz pridobljenih rezultatov v tabeli 9 in na podlagi slike 23 vidimo, da je porast N-formil produkta in tudi skupnih nečistot pospešen pri višji temperaturi.



Slika 23: Grafično prikazan trend N-formil produkta in skupnih nečistot v binarni zmesi z glicerolom po treh mesecih na zaprtem pogoju 60°C in 80°C.

#### 6.1.2. Rezultati vsebnosti 5-HMF v stresno obremenjenih binarnih zmesih in posameznih pomožnih snoveh

Upoštevajoč že objavljene navedbe drugih znanstvenikov (16) in dosedanje rezultate stresnega testiranja binarnih zmesi je razvidno, da je N-formil produkt lahko eden od intermediatov pretvorbenih reakcij kondenzacijskih produktov.

Kakorkoli že, mehanizem nastanka N-formil produkta podrobno ni povsem znan. Predpostavlja se, da poteče formiliranje dušika aminske skupine tekom Maillardove reakcije in/ali karamelizacije.

Glede na objavljene ugotovitve drugih raziskovalcev je za formiliranje amina in s tem nastanek N-formil produktov odgovorna mravljična kislina, ki nastaja pri razpadu 5-HMF.

5-HMF je znan indikator in intermediat karamelizacije heksoz, nastaja pa lahko tudi v nadaljnjih stopnjah Maillardove reakcije, in sicer pri procesih razgradnje in pretvorbe ARP. V ta namen smo spremljali vsebnosti 5-HMF v stresno izpostavljenih binarnih zmesih in posameznih pomožnih snoveh. Vsebnost 5-HMF v binarnih zmesih smo spremljali hkrati z analizo nečistot Maillardove reakcije z gradientno HPLC metodo, medtem ko smo za analizo vsebnosti 5-HMF v pomožnih snoveh uporabili izokratsko HPLC metodo. V obeh primerih se je HPLC metoda izkazala kot izredno občutljiva, saj smo lahko detektirali 5-HMF tudi pod 0.5 ppm. Rezultati vsebnosti 5-HMF so predstavljeni v tabelah 10 in 11.

Tabela 10: Vsebnost 5-HMF v stresno izpostavljenih pomožnih snoveh.

| čas                 | laktoza     | saharoza | manitol  | maltitol<br>praškast | maltitol tekoči | glicerol |
|---------------------|-------------|----------|----------|----------------------|-----------------|----------|
|                     | 5-HMF (ppm) |          |          |                      |                 |          |
|                     | RRt 0.25    | RRt 0.25 | RRt 0.25 | RRt 0.25             | RRt 0.25        | RRt 0.25 |
| 0                   | pmd         | pmd      | pmd      | pmd                  | pmd             | pmd      |
| 40°C/75%RH – odprto |             |          |          |                      |                 |          |
| 14d                 | pmd         | pmd      | pmd      | pmd                  | pmd             | pmd      |
| 1m                  | pmd         | pmd      | pmd      | pmd                  | pmd             | pmd      |
| 2m                  | pmd         | pmd      | pmd      | pmd                  | pmd             | pmd      |
| 3m                  | pmd         | pmd      | pmd      | pmd                  | pmd             | pmd      |
| 60°C- zaprto        |             |          |          |                      |                 |          |
| 14d                 | 1.1         | /        | /        | /                    | 0.9             | pmd      |
| 1m                  | 1.3         | /        | /        | /                    | 1.6             | pmd      |
| 2m                  | 1.3         | /        | /        | /                    | 2.6             | pmd      |
| 3m                  | 1.4         | /        | /        | /                    | 3.5             | pmd      |
| 80°C- zaprto        |             |          |          |                      |                 |          |
| 14d                 | 2.5         | 0.9      | pmd      | pmd                  | 5.2             | pmd      |
| 1m                  | 3.2         | 1.3      | <0.5     | <0.5                 | 13.6            | pmd      |
| 2m                  | 4.2         | 1.5      | <0.5     | <0.5                 | 18.4            | pmd      |
| 3m                  | 5.5         | 1.8      | <0.5     | <0.5                 | 27.5            | pmd      |

Legenda: pmd - pod mejo detekcije; RRt - relativni retencijski čas; d - dnevi; m – meseci; /... ni testirano.

Iz rezultatov v tabeli 10 vidimo, da pri nobeni od pomožnih snovi na odprtem pogoju 40°C/75% RH nismo detektirali 5-HMF.

Skladno s pričakovanji je iz rezultatov razvidno, da glicerol pod pogoji stresnega testiranja ne karamelizira.

Če pogledamo zaprte pogoje vidimo, da je pri manitolu in praškastem maltitolu porast 5-HMF po 3m pri povišani temperaturi 80°C komaj opazen, medtem ko je v bistveno večji meri viden porast 5-HMF pri saharozi, laktozi in tekočem maltitolu.

5-HMF nastaja pri dehidraciji heksoz. V primeru disaharidov proces karamelizacije poteče šele po predhodni hidrolizi glikozidne vezi. V skladu s tem in upoštevajoč pridobljene rezultate lahko rečemo, da na razlike v stopnji karamelizacije preiskovanih pomožnih snovi poleg vrste sladkorja, povišane temperature vpliva tudi količina proste vode v posamezni pomožni snovi.

Tabela 11: Vsebnost 5-HMF v stresno izpostavljenih binarnih zmesih

| čas                 | R-NH <sub>2</sub> +<br>laktoza | R-NH <sub>2</sub> +<br>saharoza | R-NH <sub>2</sub> +<br>manitol | R-NH <sub>2</sub> +<br>maltitol<br>praškast | R-NH <sub>2</sub> +<br>maltitol tekoči | R-NH <sub>2</sub> +<br>glicerol |
|---------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------|
|                     | 5-HMF (ppm)                    |                                 |                                |                                             |                                        | N1(ppm)                         |
|                     | RRt 0.25                       | RRt 0.25                        | RRt 0.25                       | RRt 0.25                                    | RRt 0.25                               | RRt 0.25                        |
| 0                   | pmd                            | pmd                             | pmd                            | pmd                                         | pmd                                    | pmd                             |
| 40°C/75%RH – odprto |                                |                                 |                                |                                             |                                        |                                 |
| 14d                 | pmd                            | pmd                             | pmd                            | pmd                                         | pmd                                    | 0.96                            |
| 1m                  | pmd                            | pmd                             | pmd                            | pmd                                         | pmd                                    | 4.2                             |
| 2m                  | pmd                            | pmd                             | pmd                            | pmd                                         | pmd                                    | 12.7                            |
| 3m                  | pmd                            | pmd                             | pmd                            | pmd                                         | pmd                                    | 25                              |
| 60°C- zaprto        |                                |                                 |                                |                                             |                                        |                                 |
| 14d                 | <0.2                           | /                               | /                              | /                                           | 0.8                                    | <0.2                            |
| 1m                  | <0.5                           | /                               | /                              | /                                           | 1.3                                    | <0.5                            |
| 2m                  | 1.0                            | /                               | /                              | /                                           | 3.0                                    | 0.5                             |
| 3m                  | 0.7                            | /                               | /                              | /                                           | 5.1                                    | 0.9                             |
| 80°C- zaprto        |                                |                                 |                                |                                             |                                        |                                 |
| 14d                 | /                              | 0.9                             | <0.2                           | <0.2                                        | 7.6                                    | 1.9                             |
| 1m                  | /                              | 1.2                             | 0.7                            | <0.5                                        | 32.0                                   | 4.1                             |
| 2m                  | /                              | 1.4                             | 1.2                            | 0.5                                         | 64.2                                   | 7.9                             |
| 3m                  | /                              | 1.7                             | 1.3                            | 0.8                                         | 229.0                                  | 12.5                            |

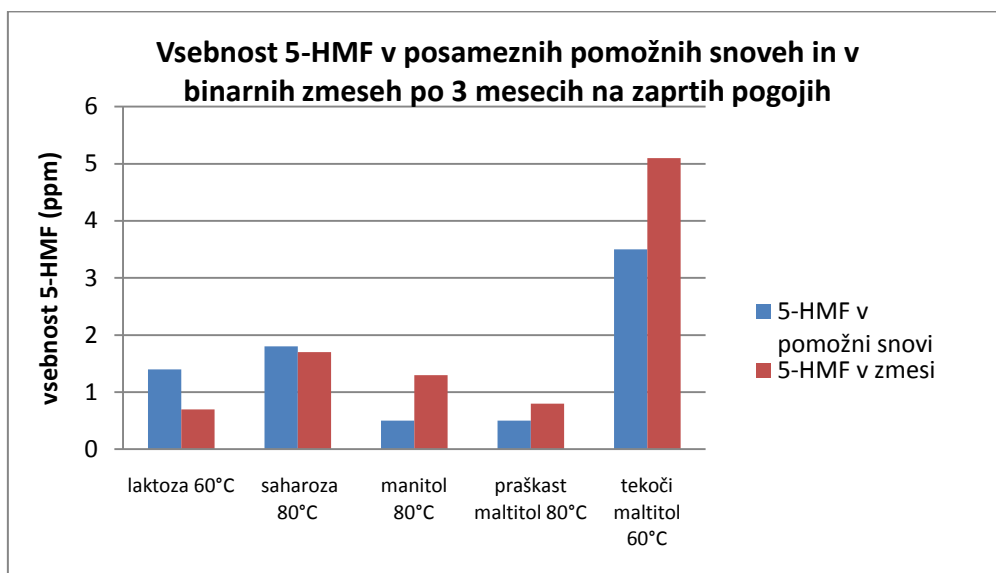
Legenda: pmd - pod mejo detekcije; RRt - relativni retencijski čas; R - preostali del modelne spojine, d - dnevi; m – meseci; /... ni testirano.

Na odprtih pogojih 40°C/75%RH pri nobeni od binarnih zmesi nismo detektirali 5-HMF, kar je razumljivo, saj je bil tudi porast N-formil produkta na teh pogojih pri večini binarnih zmesi pod 0.01% ali kvečjemu do 0.03% pri zmesi z laktozo.

Če primerjamo rezultate vsebnosti 5-HMF na zaprtih pogojih v binarnih zmesih v tabeli 11 z rezultati vsebnosti 5-HMF na zaprtih pogojih v posameznih pomožnih snoveh v tabeli 10 (slika 24) vidimo, da pri saharozi ni bistvenih razlik v vsebnosti 5-HMF. Ti rezultati so skladni z rezultati vsebnosti N-formil produkta v binarni zmesi s saharozo, saj je bil porast te nečistote po 3 mesecih pri 80°C komaj opazen (tabela 4).

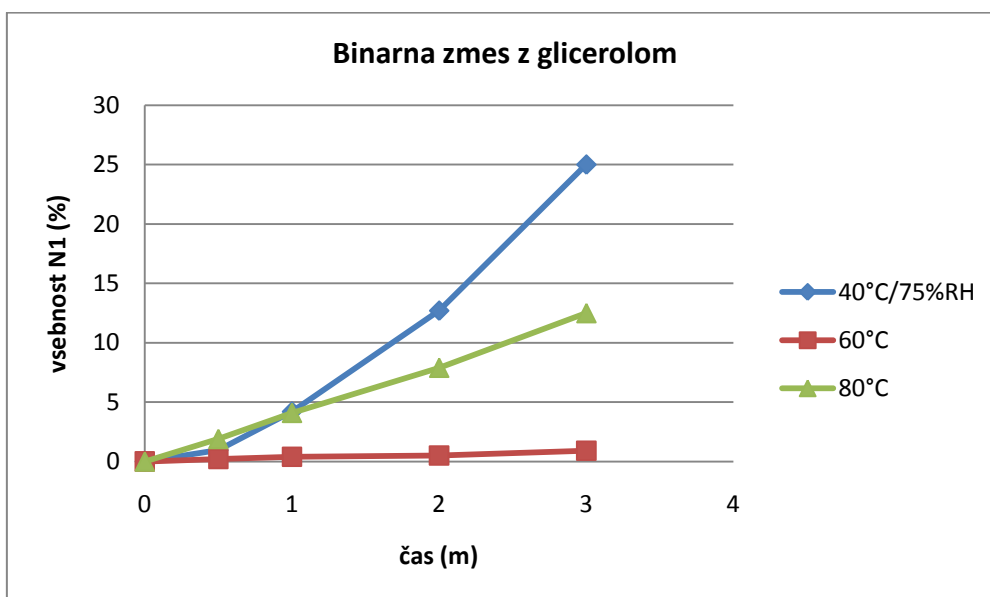
Če pogledamo laktozo in ustrezno binarno zmes pri temperaturi 60°C pa vidimo, da smo pri binarni zmesi določili nižjo vsebnost 5-HMF, medtem ko so vrednosti N-formil produkta relativno visoke (tabela 3). Razvidno je tudi, da trend 5-HMF v binarni zmesi sledi trendu N-formil produkta in tudi ostalim kondenzacijskim produktom. Do 2m vsebnosti naraščajo, nato pa začnejo padati.

Slika 24 in rezultati v tabeli 10 in 11 pri manitolu, praškastem in tekočem maltitolu lepo ponazarjajo, da se 5-HMF dodatno tvori tudi v procesu Maillardove reakcije. Rezultati predstavljeni na sliki 24 kažejo, da se pri tekočem maltitolu na zaprtem pogoju 60°C v primerjavi z ostalimi vzorci na zaprtih pogojih pri 60°C oziroma 80°C tvori največ 5-HMF tako v sami snovi kot tudi v zmesi, čeprav je vsebnost N-formil produkta pri zmesi s tekočim maltitolom po 3m na 60°C le 0.03%. Ta količina je primerljiva z vrednostmi N-formil produkta pri zmesi z manitolom in praškastim maltitolom po 3 mesecih na pogoju 80°C, kjer pa so manjše količine 5-HMF. Vzrok za relativno visoko vsebnost 5-HMF vidimo v pospešeni hidrolizi tekočega maltitola, kar dodatno potrjuje tudi večja količina kondenzacijskega produkta KP2. Enako lahko sklepamo tudi pri zmesi s tekočim maltitolom na pogoju 80°C, kjer je viden signifikanten porast nečistote KP2, 5-HMF in N-formil produkta (tabela 11, tabela 8, slika 22).



Slika 24: Stolpčni diagram vsebnosti 5-HMF v posameznih pomožnih snoveh in ustreznih binarnih zmesih - ločeno za laktozo, saharozo, manitol, praškast in tekoči maltitol na zaprtih pogojih pri 60°C oz. 80°C.

Pri binarni zmesi z glicerolom smo detektirali nečistoto (N1), ki ima na HPLC kromatogramu sicer vrh pri istem RRt kot 5-HMF, ima pa različen UV spekter. Te neznane spojine z LC-MS analizo nismo uspeli identificirati. Iz rezultatov v tabeli 11 in na podlagi slike 25 pa je vidno, da spojina N1 na pogojih linearno narašča in da ima izredno pospešen porast na odprtem pogoju 40°C/75% RH.



Slika 25: Grafično prikazan trend neznane spojine N1 v binarni zmesi z glicerolom po treh mesecih na stresnih pogojih 40°C/75% RH, 60°C in 80°C.

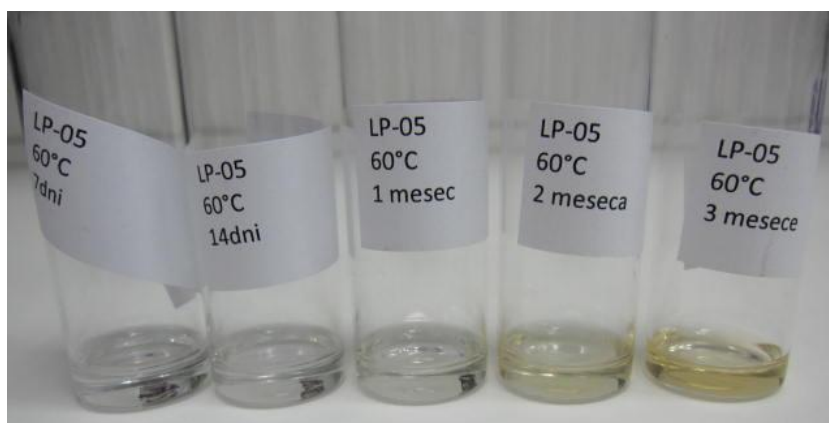
V skladu z literaturnimi navedbami nekaterih znanstvenikov in glede na vse pridobljene HPLC rezultate stresnega testiranja zmesi z glicerolom lahko rečemo, da rezultati kažejo na inkompatibilnost glicerola s primarnimi amini, vendar pri tem natančnega vzroka oziroma mehanizma interakcije ne poznamo. Zato predvidevamo, da vsebuje glicerol tudi druge nečistote, ki rezultirajo v nastanku N-formil produkta.

### 6.1.3. Videz vzorcev

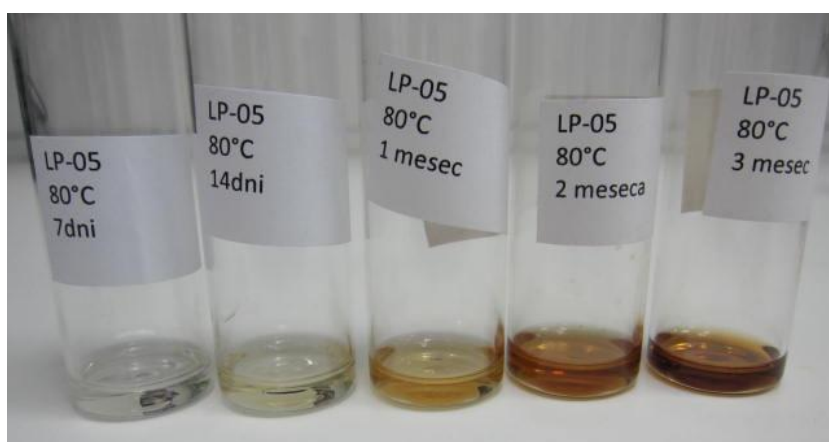
Hkrati s HPLC analizo značilnih markerjev Maillardove reakcije in 5-HMF smo spremljali vizualno tudi eventuelne barvne spremembe stresno obremenjenih vzorcev.

## POMOŽNE SNOVI

Pri vseh stresno obremenjenih pomožnih snoveh smo le pri tekočem maltitolu opazili barvne spremembe (sliki 26 in 27). Iz priloženih slik je razvidno, da se po 2 mesecih na pogoju 60°C in že po 14 dnevih na pogoju 80°C rahlo obarva v rumeno barvo, ki do 3 mesecev na pogoju 80°C preide v rdeče rjavo obarvanje.



Slika 26: Videz tekočega maltitola po 1 in 2 tedenski ter po 1, 2 in 3 mesečni izpostavljenosti 60°C.



Slika 27: Videz tekočega maltitola po 1 in 2 tedenski ter po 1, 2 in 3 mesečni izpostavljenosti 80°C.

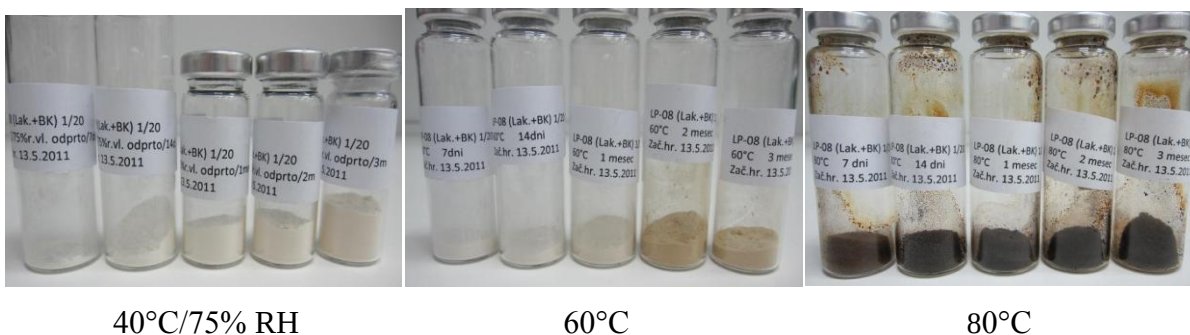
Upoštevajoč dobljene rezultate vsebnosti 5-HMF v testiranih pomožnih snoveh ocenjujemo, da se je pod danimi eksperimentalnimi pogoji na predformulacijskem nivoju sprememba videza pokazala kot zelo dober pokazatelj karamelizacije. Vizualno spremembo videza tekočega maltitola smo detektirali že pri zelo nizki vsebnosti 5-HMF ( 5ppm ).

#### BINARNE ZMESI:

Na slikah 28-33 je prikazan videz binarnih zmesi izpostavljenih odprtemu pogoju 40°C/75% RH in zaprtemu pogoju 60°C oziroma 80°C.



Slika 28: Videz binarne zmesi s saharozo po 3 mesečni izpostavljenosti 40°C/75% RH, 60°C in 80°C. Po 3 mesecih na pogoju 80°C se zmes s saharozo obarva rahlo rjavo, nekoliko manjše rjavo obarvanje pa je tudi vidno na pogoju 40°C/75% RH in 60°C.



Slika 29: Videz binarne zmesi z laktozo po 1 in 2 tedenski ter po 1, 2 in 3 mesečni izpostavljenosti 40°C/75% RH, 60°C in 80°C. Na vseh treh pogojih je vidna sprememba barve. Na pogoju 40°C/75% RH je opazno le rahlo obarvanje v rjavo, intenzivnejše rjavo se je obarvala zmes na pogoju 60°C, medtem ko je na pogoju 80°C vidno temno rjavo do črno obarvanje.

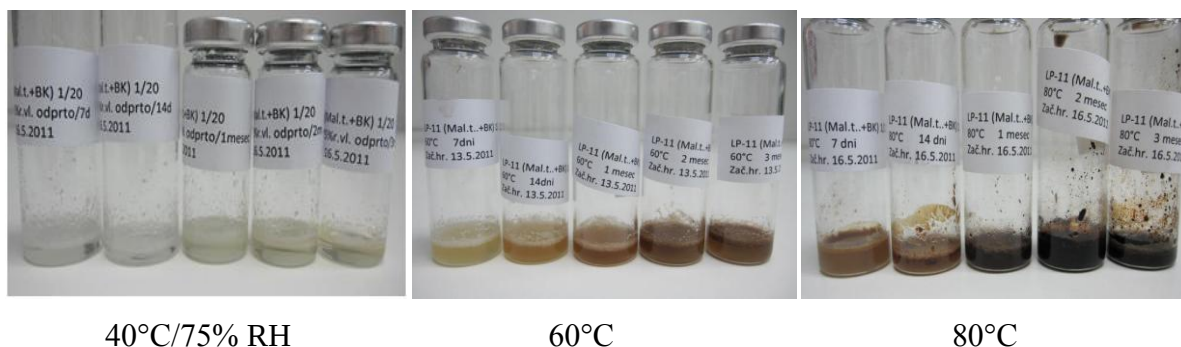


Slika 30: Videz binarne zmesi z manitolom po 3 mesečni izpostavljenosti 40°C/75% RH, 60°C in 80°C. Na pogoju 60°C in 80°C se obarva rahlo roza rjavo.





Slika 31: Videz binarne zmesi z praškastim maltitolom po 3 mesečni izpostavljenosti 40°C/75% RH, 60°C in 80°C. Na pogoju 60°C in 80°C se obarva rahlo rumeno rjavo.



40°C/75% RH

60°C

80°C

Slika 32: Videz binarne zmesi s tekočim maltitolom po 1 in 2 tedenski ter po 1, 2 in 3 mesečni izpostavljenosti 40°C/75% RH, 60°C in 80°C. Na vseh treh pogojih je vidna sprememba barve. Na pogoju 40°C/75% RH je opazno le rahlo obarvanje v rumeno rjavo, na pogoju 60°C pa se s časom spreminja obarvanost iz rumeno rjave v rdeče rjavo, ki na koncu preide v temno rjavo oz. celo v črno na pogoju 80°C. Obarvanost potrjuje rezultate HPLC meritev in kaže na sočasnosti obeh reakcij - karamelizacije in Maillardove reakcije.



40°C/75% RH

60°C

80°C

Slika 33: Videz binarne zmesi z glicerolom po 1 in 2 tedenski ter po 1, 2 in 3 mesečni izpostavljenosti 40°C/75% RH, 60°C in 80°C. Obarvanje, ki je vidno pri zmesi z glicerolom gre v smeri rumene oziroma na bolj stresnih pogojih (80°C) do rumeno rdeče.

Ugotovili smo, da so barvne spremembe pri binarnih zmesih v primerjavi s posameznimi pomožnimi snovmi intenzivnejše, saj so rezultat dveh procesov, karamelizacije in Maillardove reakcije. Izjema je le binarna zmes z glicerolom, kjer kljub obarvanju v rumeno s HPLC meritvami nismo potrdili procesa Maillardove reakcije z reducirajočimi sladkorji.

Kakorkoli že, sklepamo, da se je sprememba videza pri binarnih zmesih z laktozo, saharozo, manitolom in maltitolom v roza, rumeno, rjavo obarvanje pokazala kot relativno dober pokazatelj Maillardove reakcije in/ali karamelizacije. Vizualne spremembe smo detektirali že pri vsebnosti skupnih Maillardovih nečistot pod 0.1%.

## 7. ZAKLJUČEK

V okviru eksperimentalnega dela smo pokazali, da nam lahko kondenzacijski produkti med reducirajočim sladkorjem in aminom in N-formil produkt služijo kot pokazatelji Maillardove reakcije tako v primeru tipičnih reducirajočih sladkorjev (laktoza) kot tudi v prisotnosti določenih sicer nereducirajočih sladkorjev oz. pomožnih snovi (manitol, maltitol, saharoza), ki lahko vsebujejo kot nečistote reducirajoče sladkorje. Pri stresnem preizkušanju stabilnosti binarnih zmesi primarnega amina z laktozo, saharozo, manitolom in maltitolom (tekoči in praškasti) smo s HPLC analizo uspešno detektirali nečistote KP1 in KP2, ki sta kondenzacijska produkta primarnega amina z reducirajočim disaharidom (npr. laktozo) oziroma monosaharidom (npr. glukoza, galaktoza) in N-formil produkt (slika 14). Skladno z literaturnimi navedbami smo ugotovili, da se KP1 in KP2 zaradi izomerizacije in tudi mutarotacije kromatografsko vidita kot več vrhov pri različnih relativnih retencijskih časih.

Iz dobljenih rezultatov HPLC meritev binarnih zmesi na odprtem ( $40^{\circ}\text{C}/75\% \text{ RH}$ ) in zaprtem pogoju ( $60^{\circ}\text{C}$  oz.  $80^{\circ}\text{C}$ ) je razvidno, da je hitrost in obseg Maillardove reakcije modelne spojine z izbranimi pomožnimi snovmi bistveno bolj povečana s povišano T kot pa s prisotnostjo višje okoliške vlage. Dani rezultati tudi potrjujejo, da se začetek Maillardove reakcije, ki vključuje kondenzacijo med reducirajočim sladkorjem in aaminsko skupino, aktivira že na sobnih pogojih tekom priprave binarne zmesi.

Preko zasledovanja markerjev Maillardove reakcije smo pokazali, da obstajajo razlike v stabilnosti posameznih binarnih zmesi modelne spojine z izbranimi pomožnimi snovmi. V skladu s pričakovanji smo ugotovili, da je zmes z laktozo v primerjavi z ostalimi zmesmi najmanj stabilna oziroma je bil porast markerjev Maillardove reakcije tako na odprtem ( $40^{\circ}\text{C}/75\% \text{ RH}$ ) kot tudi na zaprtem pogoju ( $60^{\circ}\text{C}$ ) največji. Pod drugi strani pa rezultati HPLC meritev binarnih zmesi modelne spojine s saharozo, manitolom in praškastim maltitolom na odprtem pogoju  $40^{\circ}\text{C}/75\% \text{ RH}$  kot tudi na zaprtem pogoju pri relativno visoki temperaturi  $80^{\circ}\text{C}$  kažejo, da so te zmesi zelo stabilne. Po treh mesecih izpostavljenosti stresnim pogojem je bila vsebnost posameznih znanih nečistot, ki so nam služili kot markerji Maillardove reakcije, oziroma skupnih nečistot največ do 0.06% oziroma do 0.1%. Izjema je tekoči maltitol, ki v primerjavi s saharozo, manitolom in praškastim maltitolom po treh mesecih na zaprtem pogoju sicer pri nižji temperaturi testiranja,  $60^{\circ}\text{C}$ , kaže večji porast zlasti v smeri kondenzacijskih produktov (vsebnost KP2 z  $\text{RRt } 0.54$  0.28%, vsebnost N-formil

produkta pa le 0.03%), medtem ko na odprtem pogoju ni bistvenih razlik. V primerjavi z zmesjo z laktozo pa je razvidno, da je Maillardova reakcija pri tekočem maltitolu pod enakimi eksperimentalnimi pogoji (60°C) veliko bolj upočasnjena in omejena v glavnem na tvorbo kondenzacijskih produktov. Pri tem smo ugotovili, da sočasno s procesom Maillardove reakcije poteka še proces hidrolize tekočega maltitola, ki je pospešen pri višji temperaturi. Tako smo dokazali, da na hitrost in obseg Maillardove reakcije modelne spojine, ki je primarni amin, v prisotnosti izbranih pomožnih snovi poleg vrste pomožne snovi, pomembno vplivajo zlasti povišana temperatura, čas izpostavljenosti in količina proste vode v zmesi.

Skladno z literaturnimi navedbami smo ugotovili, da so ti markerji le intermediati, ki se akumulirajo do določenih vrednosti, z napredovanjem reakcije pa se pretvarjajo v druge intermediate, kar v zadnji fazi vodi do končnih, v vodi netopnih produktov melanoidov.

Pri binarni zmesi z glicerolom smo s HPLC analizo uspeli identificirati le N-formil produkt. Ostalih nečistot, ki bi bili morebitni kondenzacijski produkti modelne spojine z reducirajočimi sladkorji in bi kazale na procese Maillardove reakcije v skladu s pričakovanji nismo detektirali. Prav tako nismo zaznali 5-HMF, tako v zmesi kot tudi v sami pomožni snovi. Rezultati stresnega testiranja sicer kažejo na inkompatibilnost glicerola s primarnimi amin, vendar pri tem natančnega mehanizma ne poznamo. Zato sklepamo, da vsebuje glicerol tudi druge nečistote, ki rezultirajo v nastanku N-formil produkta.

Dokazali smo, da je tvorba N-formil produktov v preiskovanih zmesih razen pri zmesi z glicerolom povezana s tvorbo 5-HMF. Ugotovili smo, da 5-HMF nastaja tekom stresnega testiranja tako pri karamelizaciji posameznih pomožnih snovi kot tudi v nadaljnjih stopnjah Maillardove reakcije pri razpadu kondenzacijskih produktov. Slednjo ugotovitev pa potrjujejo tudi rezultati stresnega testiranja binarnih zmesi z laktozo, saharozo, manitolom in maltitolom, ki lepo kažejo, da je N-formil produkt lahko eden od intermediatov pretvorbenih reakcij kondenzacijskih produktov. Ugotovili smo, da na razlike v vsebnosti 5-HMF poleg vrste pomožne snovi, povišane temperature in časa izpostavljenosti vpliva tudi količina proste vode v posamezni pomožni snovi.

Hkrati s HPLC analizo značilnih markerjev Maillardove reakcije in 5-HMF smo spremljali vizualno tudi morebitne barvne spremembe stresno obremenjenih vzorcev. Upoštevajoč dobljene rezultate HPLC analize vsebnosti 5-HMF v testiranih pomožnih snoveh ocenjujemo, da se je pod danimi eksperimentalnimi pogoji na predformulacijskem nivoju sprememba videza v rumeno, rdeče rjavo obarvanje pokazala kot zelo dober pokazatelj karamelizacije.

Vizualno spremembo videza tekočega maltitola smo zaznali že pri zelo nizki vsebnosti 5-HMF (5ppm).

Po drugi strani pa smo ugotovili, da so barvne spremembe pri binarnih zmesih v primerjavi s posameznimi pomožnimi snovmi intenzivnejše, saj so rezultat dveh procesov, karamelizacije in Maillardove reakcije. Izjema je le binarna zmes z glicerolom, kjer kljub obarvanju v rumeno s HPLC meritvami nismo potrdili procesa Maillardove reakcije z reducirajočimi sladkorji. Sklepamo, da se je sprememba videza pri binarnih zmesih z laktozo, saharozo, manitolom in maltitolom v roza, rumeno, rjavo obarvanje pokazala kot relativno dober pokazatelj Maillardove reakcije in/ali karamelizacije. Vizualne spremembe smo detektirali že pri vsebnosti skupnih Maillardovih nečistot pod 0.1%.

Zaključujemo, da smo z izsledki in ugotovitvami narejene študije prispevali k boljšemu poznavanju in razumevanju stabilnostne problematike testiranih pomožnih snovi v prisotnosti spojin z aminsko skupino zlasti na nivoju predformulacijske faze kot tudi v sami formulaciji.

## 8. LITERATURA

1. Crowley P., Martini L.G. Drug-excipient interactions. Pharmaceutical Technology 2001.
2. Fathima N. et al. Drug-excipient interaction and its importance in dosage form development. Journal of Applied Pharmaceutical Science 2011; 06: 66-71.
3. Pifferi G, Santoro P, Pedrani M. Quality and functionality of excipients. Farmaco 1999; 54: 1-14.
4. Bharate S.S., Bharate B.S., Bajaj N.A. Interactions and incompatibilities of pharmaceutical excipients with active pharmaceutical ingredients: a comprehensive review. J. Excipients and Food Chem 2010; 3: 3-26.
5. Carstensen JT., Rhodes C.T. Drug Stability - Principles and Practices. 3<sup>rd</sup> ed. New York 2000: Marcel Dekker.
6. Ahuja, Scypinski: Handbook of modern pharmaceutical analysis, Preformulation, Academic Press, 2001: 173-233.
7. Vrbinc M., Kmetec V. Fizikalna stabilnost in kompatibilnost trdnih snovi v predformulacijskih študijah trdnih farmacevtskih oblik. Farm Vest 2002; 53: 367-376.
8. Katdare A, Chaubal MV. Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery systems. Informa Healthcare USA, Inc. 2006, 93-107.
9. ICH guideline Q3B (R2) "Impurities in new drug products" Step 4 version, June 2006.
10. Watterman KC, Adami RC. Accelerated aging: Prediction of chemical stability of pharmaceuticals.
11. Crowley PJ. Excipients as stabilizers. Pharm Sci Technol Today 1999; 2: 237-243.
12. Labuza TP, Baisier WM. The Kinetics of Nonenzymatic Browning. In Physical Chemistry of Foods; Schwartzberg HG, Hartel RW, Eds. Marcel Dekker: New York, 1992: 595-649.
13. Yaylayan VA in Huyghues-Despointes A. Chemistry of Amadorri Rearrangement Products: Analysis, Synthesis, Kinetics, Reactions and Spectroscopic Properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 1994; 34: 321-369.
14. Horiuchi S., Ikeda K. et al. Photo-Enhanced Modification of Human Skin Elastin in Actinic Elastosis by Carboxymethyllysine, One of the Glycoxidation Products of the Maillard Reaction. J. Inve. dermatology 1997; 108: 792-802.

15. Hodge JE, Rist CE. The Amadorri Rearrangement under New Conditions and its Significance for Non-enzymatic Browning Reactions. *J Am Chem Soc* 1953; 75: 316-322.
16. Wirth AA, Baertsschi SW et al. Maillard Reaction of Lactose and Fluoxetine Hydrochloride, a Secondary Amine. *J Pharm Sci* 1998; 87: 31-39.
17. Lovdahl MJ, Hurley TR, Tobias B, Priebe SR. Synthesis and characterization of Pregabalin lactose conjugate degradation products. *J Pharm Biomed Anal* 2002; 28: 917-924.
18. [http://webcache.googleusercontent.com/search?hl=sl&gbv=2&gs\\_l=hp.13..0i33.1021110211012894111101010101421142114-11110.11sin.&q=cache:QCyUNaQHZbEJ:http://www.food-info.net/uk/colour/maillard.htm+Food-info.net+maillard+reaction&ct=clnk](http://webcache.googleusercontent.com/search?hl=sl&gbv=2&gs_l=hp.13..0i33.1021110211012894111101010101421142114-11110.11sin.&q=cache:QCyUNaQHZbEJ:http://www.food-info.net/uk/colour/maillard.htm+Food-info.net+maillard+reaction&ct=clnk) dostopano 17.11.2011
19. Monajjemzadeh F., Hassanzadeh D., Valizadeh H. et al. Compatibility studies of acyclovir and lactose in physical mixtures and commercial tablets. *Eur J Pharm Biopharm* 2009; 73: 404-413.
20. Moore JM, Casale JF. The Discoloration of Illicit Drug Samples. *Micro J* 2008; 6: 1-12.
21. Duvall RN, Koshy KT, Dashiell RE. Comparative Evaluation of Dextrose and Spray-Dried Lactose in Direct Compression Systems. *J Pharm Sci* 1965; 54: 1196- 2000.
22. Serajuddin ATM, Thakur AB, Ghoshal RN et al. Selection of Solid Dosage Form Composition through Drug – Excipient Compatibility Testing. *J Pharm Sci* 1999; 88: 696-704.
23. Tišler M. Organska kemija. Državna založba Slovenije, Ljubljana 1991.
24. Madhushree YG et al. Glycosylation of Aromatic Amines I: Characterization of Reaction Products and Kinetic Scheme. *Pharm Sci Tech* 2009; 10: 317-328.
25. [http://en.wikipedia.org/wiki/Reducing\\_sugar](http://en.wikipedia.org/wiki/Reducing_sugar) dostopano 1.12.2011
26. <http://en.wikipedia.org/wiki/sucrose> dostopano 1.12.2011
27. <http://en.wikipedia.org/wiki/fructose> dostopano 1.12.2011
28. Bunn HF, Higgins PJ. Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. *Science* 1981; 213: 222-224.
29. Lievonen SM, Laaksonen TJ, Roos YH. Nonenzymatic Browning in Food Models in the Vicinity of the Glass Transition: Effects of Fructose, Glucose and Xylose as Reducing Sugar. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 7034-7041.

30. Monajjemzadeh F., Hassanzadeh D., Valizadeh H. et al. Assesment of Feasibility of Maillard Reaction between Baclofen and Lactose by Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometry, Application to Pre Formulation Studies. *Pharm Sci Tech* 2009; 10: 649-659.
31. Flemming A, Picker-Freyer KM. Compaction of lactose drug mixtures: Quantification of the extent of incompatibility by FT-Raman spectroscopy. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 68: 802-810.
32. Wu Y., Levons J., Narang S.A. et al. Reactive Impurities in Excipients: Profiling, Identification and Mitigation of Drug-Excipient Incompatibility. *Pharm Sci Tech* 2011; 12: 1248-1263.
33. George RC, Barbuch RJ et al. Investigation into the yellowing on aging of Sabril tablet cores. *Drug Dev Ind Pharm* 1994; 20: 3023-3032.
34. Wu Y., Dali M. et al. Understanding drug-excipient compatibility: Oxidation of compound A in a solid dosage form. *Pharm Dev Tech* 2009; 14: 556-564.
35. Gannett P, Hailu S. In vitro reaction of formaldehyde with fenfluramine: conversion to N-methyl fenfluramine. *J Anal Toxicol* 2001; 25: 88-92.
36. Janicki AC in Almond RH, Jr. Reaction of Haloperidol with 5-(Hydroxymethyl)-2-furfuralaldehyde, an Impurity in Anhydrous Lactose. *J Pharm Sci* 1974; 63: 41-43.
37. Brownley AC, Jr in Lachman L. Browning of Spray-Processed Lactose. *J Pharm Sci* 1964; 53: 452-454.
38. Buxton PC, Jahnke R, Keady S. Degradation of glucose in the Presence of Electrolytes during Heat Sterilization. *Eur J Pharm Biopharm* 1994; 40: 172-175.
39. <http://en.wikipedia.org/wiki/caramelization> dostopano 1.12.2011
40. Yoshioka S., Stella J.V. Chemical Stability of Drug Substances In: *Stability of Drugs and Dosage Forms*. New York: Kluver Academic/ Plenum Publishers; 3-33.
41. Kuster BFM. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF). A Review Focussing on its Manufacture. *Starch/Staerke* 1990; 42: 314-321.
42. Pavli V. Možnost uporabe HPLC metode pri vrednotenju sirupov. *Združenje slovenskih lekarn* 1987; 58-67.
43. Ulbricht RJ, Northup SJ, Thomas JA. A Review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in Parenteral Solutions. *Fundamental and Applied Toxicology* 1984; 4: 843-853.
44. Buera P, Chirife J, Resnik SL Lozano RD. Nonenzymatic Browning of Liquid systems of High Water Activity: Kinetics of Color Changes due to Caramellization of Various Single Sugars. *J Food Sci* 1987; 52: 1059-1062.



45. Buera P, Chirife J, Resnik SL, Wetzler G. Nonenzymatic Browning of Liquid Model Systems of High Water Activity: Kinetics of Color Changes due to Maillard's Reaction Between Different Single Sugars and Glycine and Comparison with Caramelization Browning. *J Food Sci* 1987; 52: 1063-1067.
46. Quintas MAC, Brandao TRS, Silva CLM. Modelling colour changes during the caramelisation reaction  
<http://repositorio.ucp.pt/bitstream/10400.14/2836/3/Modelling%20colour%20changes%20during%20the%20caramelisation%20reaction.PDF>
47. Hryniewicz CL, Koberda M, Konkowsky MS. Quantitation of 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) and related substances in dextrose injections containing drugs and bisulfite. *J Pharm Biomed Anal* 1996; 14: 429-434.
48. USP, 2012.
49. Xu H, Templeton AC, Reed RA. Quantitation of 5-HMF and Dextrose in Commercial aqueous dextrose solutions. *J Pharm Biomed Anal* 2003; 32: 451-459.
50. Basumallick L., Hurum D, Rohrer J. Sensitive Determination of Hydroxymethyl Furfural in Honey, Syrup, and Fructose. Dionex Corporation, 2011.
51. Verma RK, Garg A. Selection of excipients for extended release formulations of glipizide through drug-excipient compatibility testing. *J Pharm Biomed Anal* 2005; 38: 633-644. 2005
52. Hartauer KJ, Guillory JK. A comparison of diffuse reflectance FT-IR spectroscopy and DSC in the characterization of a drug-excipient interaction. *J Devel Ind Pharm* 1991; 17: 617-630.
53. Desai SR, Shaikh MM, Dharwadkar SR. Preformulation compatibility studies of etamsylate and fluconazole drugs with lactose by DSC. *J Therm Anal Calor* 2003; 71: 651-658.
54. Sarisuta N, Srikummoon K. The Influence of Drug-Excipient and Drug-Polymer Interactions on Butt Adhesive Strength of Ranitidine Hydrochloride Film-Coated Tablets. *J Devel Ind Pharm* 2006; 32: 463-471.
55. Mutalik S et al, Preparation, In vitro, Preclinical and Clinical Evaluations of Once Daily Sustained Release Tablets of Aceclofenac. *Arch Pharm Res* 2007; 30: 222-234.
56. Botha SA, Loetter AP. Compatibility study between oxprenolol hydrochloride, temazepam and tablet excipients using differential scanning calorimetry. *J Dev Ind Pharm* 1990; 16: 331-345.

- 
57. Cavatur R., Vemuri MN, Chrzan Z. Use of isothermal microcalorimetry in pharmaceutical preformulation studies Part III. Evaluation of excipient compatibility of a new chemical entity. *J Therm Anal Calor* 2004; 78: 63-72.
  58. Abdoh A, Al-Omari MM, Badwan AA, Jaber AMY. Amlodipine Besylate-Excipients Interaction in Solid Dosage Form. *Pharm Devel Tech* 2004; 9: 15-24.
  59. Ahlneck C, Zografi G. The molecular basis of moisture effects on the physical and chemical stability of drugs in the solid state. *Inter J Pharm* 1990; 62: 87-95.
  60. ICH smernica Q1A (R2) "Stability testing of new drug substances and products" Step 4 version, Feb. 2003.
  61. Skoog DA, West DM, Holler FJ. *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 8<sup>th</sup> ed., Brooks Cole, 2004, ZDA.
  62. Ph.Eur. 7<sup>th</sup> Edition.
  63. Martindale: The Complete drug reference; 34<sup>th</sup> Edition; 2005.
  64. Rowe CR, Sheskey JP, Quinn EM: *Pharmaceutical Excipients*, Pharmaceutical press and american pharmacists association, 2009.
  65. The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals; 14<sup>th</sup> Edition
  66. Lee HS, Nagy S. Relative reactivities of sugars in the formation of 5-hydroxymethylfurfural in sugar-catalyst model systems. *Journal of Food Processing and Preservation* 1990; 14: 171-178.
  67. Cerny C, Dubini-Guntz R. Role of the solvent Glycerol in the Maillard Reaction of D-Fructose and L-Alanine. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 574-577.