

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DAVID SMODIŠ

**MAGISTRSKA NALOGA**

MAGISTRSKI ŠTUDIJ INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DAVID SMODIŠ

**VPLIV VLAŽE NA KEMIJSKO STABILNOST OMEPRAZOLA V KAPSULAH Z  
ZAKASNELIM SPROŠČANJEM**

**EFFECT OF WATER ON THE CHEMICAL STABILITY OF OMEPRAZOLE  
DELAYED-RELEASE CAPSULES**

MAGISTRSKI ŠTUDIJ INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljal v farmacevtski družbi Lek d.d. Ljubljana, Razvojni center Slovenija, področje Analitski razvoj, pod mentorstvom izr. prof. dr. Zdenka Časarja.

*Za strokovno pomoč, usmerjanje, potrpežljivost in številne nasvete pri izdelavi magistrske naloge se iskreno zahvaljujem mentorju izr. prof. dr. Zdenku Časarju.*

*Za nasvete in pomoč se zahvaljujem tudi dr. Simoni Bohanec, dr. Klemnu Naveršniku, Mateju Černilcu in vsem ostalim sodelavcem, ki so pripomogli k nastanku magistrske naloge. Zahvaljujem se tudi farmacevtski družbi Lek d.d., ki mi je omogočila opravljanje praktičnega dela magistrske naloge.*

*Posebna zahvala gre družini in puncu Nini za vso podporo in vzpodbudo tekom študija.*

## **IZJAVA**

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelal samostojno pod mentorstvom izr. prof. dr. Zdenka Časarja.

## KAZALO VSEBINE

|                                                                                                    |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| KAZALO VSEBINE .....                                                                               | II        |
| KAZALO PREGLEDNIC .....                                                                            | IV        |
| KAZALO SLIK .....                                                                                  | V         |
| POVZETEK .....                                                                                     | VI        |
| ABSTRACT .....                                                                                     | VII       |
| SEZNAM OKRAJŠAV .....                                                                              | VIII      |
| <b>1 UVOD .....</b>                                                                                | <b>1</b>  |
| <b>1.1 Inhibitorji protonske črpalke.....</b>                                                      | <b>1</b>  |
| 1.1.1 Mehanizem delovanja inhibitorjev protonske črpalke .....                                     | 2         |
| 1.1.2 Problem stabilnosti omeprazola .....                                                         | 3         |
| <b>1.2 Stabilnost ZU in FO .....</b>                                                               | <b>4</b>  |
| 1.2.1 Testiranje stabilnosti FO .....                                                              | 5         |
| 1.2.2 Vrste testiranja stabilnosti .....                                                           | 6         |
| 1.2.3 Kemijska stabilnost ZU.....                                                                  | 8         |
| <b>1.3 Določanje vsebnosti vode s Karl Fischer titracijo in izgubo pri sušenju .....</b>           | <b>9</b>  |
| <b>1.4 Vodna aktivnost .....</b>                                                                   | <b>10</b> |
| 1.4.1 Merjenje vodne aktivnosti z določanjem temperature rosišča z metodo hlajenja<br>zrcala ..... | 11        |
| <b>1.5 Napovedovanje stabilnosti.....</b>                                                          | <b>12</b> |
| 1.5.1 Vpliv temperature in vlage na razkroj ZU .....                                               | 12        |
| 1.5.2 Napovedovanje porazdelitve vlage znotraj ovojnine .....                                      | 14        |
| 1.5.3 Sorpcijske izoterme za vlago .....                                                           | 14        |
| <b>2 NAMEN DELA .....</b>                                                                          | <b>16</b> |
| <b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>                                                                 | <b>17</b> |
| <b>3.1 Uporabljene kemikalije, standardi in reagenti .....</b>                                     | <b>17</b> |
| <b>3.2 Aparature in oprema.....</b>                                                                | <b>18</b> |
| <b>3.3 Uporabljeni vzorci .....</b>                                                                | <b>19</b> |
| 3.3.1 Pogoji testiranja vzorcev .....                                                              | 20        |
| <b>3.4 Postopki in metode.....</b>                                                                 | <b>20</b> |
| 3.4.1 Določanje vodne aktivnosti.....                                                              | 20        |
| 3.4.1.1 Preverjanje ustreznosti aparature pred merjenjem .....                                     | 20        |
| 3.4.1.2 Določanje vodne aktivnosti vzorcem .....                                                   | 20        |
| 3.4.1.3 Validacija metode za merjenje vodne aktivnosti.....                                        | 20        |
| 3.4.1.3.1 Natančnost metode znotraj dneva .....                                                    | 21        |
| 3.4.1.3.2 Natančnost metode med dnevi (vključuje tudi rigidnost).....                              | 21        |
| 3.4.1.3.3 Točnost metode .....                                                                     | 21        |
| 3.4.1.3.4 Robustnost metode .....                                                                  | 21        |

|            |                                                                                                             |           |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.4.2      | Določanje vsebnosti vode s Karl Fischer titracijo .....                                                     | 21        |
| 3.4.2.1    | Kalibracija aparature pred meritvami .....                                                                  | 21        |
| 3.4.2.2    | Določanje vsebnosti vode v vzorcu.....                                                                      | 22        |
| 3.4.2.3    | Validacija KF metode .....                                                                                  | 22        |
| 3.4.2.3.1  | Natančnost metode znotraj dneva .....                                                                       | 23        |
| 3.4.2.3.2  | Natančnost metode med dnevi (vključuje tudi rigidnost).....                                                 | 23        |
| 3.4.2.3.3  | Linearnost metode.....                                                                                      | 23        |
| 3.4.2.3.4  | Točnost metode .....                                                                                        | 24        |
| 3.4.2.3.5  | Robustnost metode .....                                                                                     | 24        |
| 3.4.3      | Metoda UHPLC za določanje razkrojnih produktov .....                                                        | 24        |
| 3.4.4      | Napovedovanje stabilnosti s pomočjo modeliranja podatkov pospešene<br>stabilnosti in stresnih testov.....   | 27        |
| 3.4.4.1    | Sorpcijske izoterme za vlago.....                                                                           | 27        |
| 3.4.4.2    | Izračun za napovedovanje dolgoročne stabilnosti.....                                                        | 27        |
| <b>4</b>   | <b>REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>                                                                          | <b>29</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Razvoj metode za KF titracijo .....</b>                                                                  | <b>29</b> |
| <b>4.2</b> | <b>Validacija KF metode za določanje vsebnosti vode.....</b>                                                | <b>31</b> |
| 4.2.1      | Natančnost metode znotraj dneva (ponovljivost) .....                                                        | 31        |
| 4.2.2      | Natančnost metode med dnevi (vključuje tudi rigidnost) .....                                                | 31        |
| 4.2.3      | Linearnost metode .....                                                                                     | 33        |
| 4.2.4      | Točnost metode.....                                                                                         | 34        |
| 4.2.5      | Robustnost metode .....                                                                                     | 36        |
| <b>4.3</b> | <b>Validacija metode za določanje vodne aktivnosti .....</b>                                                | <b>38</b> |
| 4.3.1      | Natančnost metode znotraj dneva .....                                                                       | 38        |
| 4.3.2      | Natančnost metode med dnevi .....                                                                           | 39        |
| 4.3.3      | Točnost metode.....                                                                                         | 39        |
| 4.3.4      | Robustnost metode .....                                                                                     | 39        |
| <b>4.4</b> | <b>Vpliv vlage na kemijsko stabilnost omeprazola v kapsulah z zakasnelim<br/>sproščanjem.....</b>           | <b>40</b> |
| 4.4.1      | Vpliv števila kapsul v ovojninu na vsebnost vode in vodno aktivnost .....                                   | 41        |
| 4.4.2      | Vpliv začetne vsebnosti vode v peletah na kemijsko stabilnost omeprazola.....                               | 43        |
| 4.4.3      | Vpliv higroskopnosti ZU na kemijsko stabilnost FO .....                                                     | 47        |
| <b>4.5</b> | <b>Pospešeno testiranje stabilnosti .....</b>                                                               | <b>49</b> |
| <b>4.6</b> | <b>Napovedovanje stabilnosti s pomočjo modeliranja podatkov pospešenega<br/>testiranja stabilnosti.....</b> | <b>51</b> |
| 4.6.1      | Sorpcijske izoterme za vlago .....                                                                          | 51        |
| 4.6.2      | Napovedovanje dolgoročne stabilnosti s pomočjo izračuna .....                                               | 54        |
| 4.6.2.1    | Izračun sorpcijske izoterme .....                                                                           | 54        |
| 4.6.2.2    | Napovedovanje dolgoročne stabilnosti .....                                                                  | 55        |
| <b>5</b>   | <b>SKLEP .....</b>                                                                                          | <b>59</b> |
| <b>6</b>   | <b>LITERATURA.....</b>                                                                                      | <b>61</b> |
| <b>7</b>   | <b>PRILOGE .....</b>                                                                                        | <b>65</b> |

## KAZALO PREGLEDNIC

|                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Preglednica I: Pomen testiranja stabilnosti v različnih fazah razvoja FO .....                                                          | 5  |
| Preglednica II: Priporočeni pogoji testiranja dolgoročne stabilnosti za posamezno klimatsko območje in primer države. ....              | 6  |
| Preglednica III: Pogoji testiranja stabilnosti kot jih priporoča ICH.....                                                               | 7  |
| Preglednica IV: Najpogostejše funkcionalne skupine, ki so podvržene kemijskim pretvorbam in produkti, ki pri tem nastanejo .....        | 8  |
| Preglednica V: Podatki o pakiranju vzorcev .....                                                                                        | 19 |
| Preglednica VI: Gradient metode UHPLC za določanje razkrojnih produktov .....                                                           | 26 |
| Preglednica VII: Rezultati začetne meritve vsebnosti vode v peletah z razvito metodo. ....                                              | 30 |
| Preglednica VIII: Rezultati meritev preverjanja natančnosti metode znotraj dneva .....                                                  | 31 |
| Preglednica IX: Rezultati meritev preverjanja natančnosti metode med dnevi .....                                                        | 32 |
| Preglednica X: Rezultati meritev za preverjanje linearnosti metode KF.....                                                              | 33 |
| Preglednica XI: Rezultati preverjanja točnosti metode za določanje vode KF .....                                                        | 35 |
| Preglednica XII: Izračunani rezultati za vrednotenje točnosti metode .....                                                              | 36 |
| Preglednica XIII: Rezultati preverjanja robustnosti KF metode .....                                                                     | 37 |
| Preglednica XIV: Preverjanje natančnosti metode $a_w$ znotraj dneva in med dnevi.....                                                   | 38 |
| Preglednica XV: Rezultati preverjanja točnosti metode za merjenje $a_w$ .....                                                           | 39 |
| Preglednica XVI: Rezultati preverjanja robustnosti metode za merjenje $a_w$ .....                                                       | 40 |
| Preglednica XVII: Rezultati določanja vsebnosti vode z metodo KF. ....                                                                  | 42 |
| Preglednica XVIII: Rezultati določanja $a_w$ pri pogoju 40 °C/75 % RH. ....                                                             | 42 |
| Preglednica XIX: Primerjava dodatnega sušenja kapsul z ZU proizvajalca 1 pred pakiranjem s kapsulami, ki niso bile dodatno sušene. .... | 44 |
| Preglednica XX: Prikaz rezultatov določanja sorpcijskih izoterm proizvajalec ZU 1 in 2 z metodo DVS. ....                               | 47 |
| Preglednica XXI: Prikaz določanja razkrojnih produktov v času pospešenega testiranja stabilnosti. ....                                  | 50 |
| Preglednica XXII: Rezultati meritev v času shranjevanja pri pogojih pospešene stabilnosti za vzorce z ZU proizvajalca 2. ....           | 51 |
| Preglednica XXIII: Prikaz teoretičnih in izmerjenih RH vrednosti nasičenih solnih raztopin v komorah. ....                              | 52 |
| Preglednica XXIV: Rezultati meritev vzorcev izpostavljenih znanim RH .....                                                              | 52 |
| Preglednica XXV: Praktična in teoretična sorpcijska izoterma .....                                                                      | 55 |
| Preglednica XXVI: Prikaz podatkov za izračun parametrov v prilagojeni Arrheniusovi enačbi s členom za vlago .....                       | 56 |

## KAZALO SLIK

|                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Slika 1:</b> Slikovni prikaz signalnih poti, ki privedejo do aktivacije protonske črpalke, in možnosti inhibicije sekrecije želodčne kisline ..... | 2  |
| <b>Slika 2:</b> Prikaz pretvorbe omeprazola v kislih pogojih .....                                                                                    | 3  |
| <b>Slika 3:</b> Običajna adsorpcijska in desorpcijska izoterma za snov, ki izkazuje histerezo. ...                                                    | 15 |
| <b>Slika 4:</b> Kromatograma določanja RP 40 mg odmerka v pakiranju po 30 kapsul in 1000 kapsul v plastenki. ....                                     | 26 |
| <b>Slika 5:</b> Prikaz regresijskih premic za določanje linearnosti metode. ....                                                                      | 34 |
| <b>Slika 6:</b> Prikaz spreminjanja $a_w$ v odvisnosti od časa pri pogojih testiranja pospešene stabilnosti .....                                     | 43 |
| <b>Slika 7:</b> Prikaz prirasta RP s časom za različna pakiranja 10 mg odmerka med shranjevanjem pri 40 °C/ 75 % RH. ....                             | 45 |
| <b>Slika 8:</b> Prikaz spreminjanja vsebnosti vode določeno s KF titracijo za različna pakiranja 10 mg odmerka kapsul pri 40 °C/ 75% RH .....         | 46 |
| <b>Slika 9:</b> Prikaz spreminjanja vsebnosti vode določeno s KF titracijo za različna pakiranja 10 mg odmerka kapsul pri 40 °C/ 75% RH .....         | 46 |
| <b>Slika 10:</b> Sorpcijski izotermi za ZU proizvajalcev 1 in 2 .....                                                                                 | 48 |
| <b>Slika 11:</b> Prikaz naraščanja RP med testiranjem pospešene stabilnosti za 10 mg odmerke omeprazol kapsul z ZU različnih proizvajalcev .....      | 48 |
| <b>Slika 12:</b> Združena sorpcijska izoterma vseh odmerkov opisuje spreminjanje vsebnosti vode določene s KF titracijo v odvisnosti od $a_w$ .....   | 53 |
| <b>Slika 13:</b> Sorpcijske izoterme za posamezen odmerek. ....                                                                                       | 53 |
| <b>Slika 14:</b> Napovedan prirast RP za obdobje testiranja pospešene in dolgoročne stabilnosti za 10 mg odmerke omeprazol kapsul. ....               | 57 |
| <b>Slika 15:</b> Napovedan prirast vlage v ovojnini pri pogojih pospešene in dolgoročne stabilnosti za 10 mg odmerke omeprazol kapsul.....            | 57 |
| <b>Slika 16:</b> Primerjava teoretične napovedi stabilnosti pri 40 °C/75 % RH in rezultati pridobljenimi s testiranjem dolgoročne stabilnosti. ....   | 58 |

## POVZETEK

Prisotnost vlage v trdnih farmacevtskih oblikah vpliva na številne kemijske, fizikalne in mikrobiološke lastnosti, kar lahko vpliva na učinkovitost, varnost in kakovost farmacevtske oblike. Omeprazol je fizikalno in kemijsko nestabilen ter tako občutljiv na številne dejavnike, kot so vlaga, povišana temperatura, kislo okolje, UV svetloba, soli in kovinski ioni. V magistrski nalogi smo preverjali vpliv vlage in temperature na kemijsko stabilnost omeprazola v kapsulah z zakasnelim sproščanjem. Preverili smo možnost napovedovanja stabilnosti s pomočjo podatkov, pridobljenih pri povišani temperaturi in/ali relativni vlažnosti. Preučili smo, kako vsebnost vode in čas izpostavljenosti stresnim pogojem vplivata na porast razkrojnih produktov. Kot glavne parametre stabilnosti smo določali vsebnost vode, vodno aktivnost ter vsoto razkrojnih produktov. Vsebnost vode smo določali s Karl Fischer titracijo, za katero smo najprej razvili ustrezno metodo in jo nato validirali. Določili smo praktične sorpcijske izoterme za vlago, ki opisujejo razmerje med vodno aktivnostjo in ravnotežno količino sorbirane vode. V ta namen smo tudi razvili in validirali metodo za določanje vodne aktivnosti. Iz znane sestave pelet in pridobljenih sorpcijskih izoterm za zdravilno učinkovino in pomožne snovi smo izračunali teoretično sorpcijsko izotermo in jo primerjali z izmerjeno. Opazili smo manjša odstopanja, ki so posledica kompleksnosti farmacevtske oblike. Ugotovili smo, da povečanje količine vlage v farmacevtski obliki vpliva na porast razkrojnih produktov. Iz primerjave različno posušenih kapsul pred pakiranjem v ovojnino smo ugotovili, da je farmacevtska oblika stabilnejša v primeru, ko je začetna vsebnost vode nižja. Pokazali smo, da higroskopnost zdravilne učinkovine vpliva na njeno kemijsko stabilnost v peletah z zakasnelim sproščanjem, pakiranih v trde želatinaste kapsule. Napovedovanje stabilnosti smo izvedli s pomočjo izračuna, ki temelji na prilagojeni Arrheniusovi enačbi s členom za vlago, prepustnosti ovojnine za vlago in sorpcijsko-desorpcijskega prenosa vlage med komponentami v ovojnini.

**Ključne besede:** omeprazol, kemijska stabilnost, napovedovanje stabilnosti, validacija

## ABSTRACT

The presence of moisture in solid dosage forms affects numerous chemical, physical and microbiological properties. This can affect their effectiveness, safety, and quality. Omeprazole is a proton pump inhibitor, which effectively inhibits secretion of stomach acid and has a long-lasting effect. Omeprazole molecule is physically and chemically unstable, therefore it is sensitive to numerous factors such as moisture, elevated temperature, acidic environment, UV light, salts and metal ions. In the Master's thesis, the effect of moisture and temperature on the chemical stability of omeprazole delayed-release capsules was evaluated. The possibility to predict stability with the help of information, obtained at elevated temperature and/or relative humidity was tested. In addition, the effect of water content and the time of exposure to the test conditions (temperature and relative humidity) on the increase of degradation products was studied. Water content, water activity and the sum of degradation products were determined as main stability parameters. Water content was determined with the Karl Fischer titration, for which a suitable method was first developed and then validated. Furthermore, the practical moisture sorption isotherm, which describes the relationship between water activity and equilibrated amount of absorbed water, was determined. For this purpose, a method for the determination of water activity was developed and validated. From known compositions of pellets and obtained sorption isotherms for active pharmaceutical ingredient and excipients, a theoretical sorption isotherm was calculated and compared with the practical sorption isotherm. Minor deviations between two isotherms were result of dosage forms complexity. Elevated levels of moisture in dosage form affected the increase of degradation products. Comparison of differently dried capsules before packaging revealed that dosage forms with a low starting water content were more stable. In the research was shown that the hygroscopicity of the active pharmaceutical ingredient affects its chemical stability in delayed-release pellets, packed in hard gelatin capsules. The prediction of stability was performed with a calculation, based on humidity-corrected Arrhenius equation, moisture vapor transmission rate (MVTR) and sorption-desorption moisture transfer (SDMT) between components in packaging.

**Key words:** Omeprazole, chemical stability, prediction of stability, validation

## SEZNAM OKRAJŠAV

|       |                                                                                                         |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ASAP  | Program za ovrednotenje pospešene stabilnosti ( <i>angl. accelerated stability assessment program</i> ) |
| ATP   | Adenozin trifosfat ( <i>angl. Adenosine triphosphate</i> )                                              |
| $a_w$ | Vodna aktivnost                                                                                         |
| DPV   | Dodatno prečiščena voda kromatografske kakovosti                                                        |
| DVS   | Dinamična sorpcija vlage ( <i>angl. dynamic vapour sorption</i> )                                       |
| ERH   | Ravnotežna relativna vlažnost ( <i>angl. equilibrium relative humidity</i> )                            |
| $f$   | Fugativnost                                                                                             |
| FO    | Farmacevtska oblika                                                                                     |
| GERB  | Gastroezofagealna refluksna bolezen                                                                     |
| HDPE  | Polietilen visoke gostote ( <i>angl. high-density polyethylene</i> )                                    |
| HGC   | Trde želatinaste kapsule ( <i>angl. hard gelatin capsules</i> )                                         |
| HPLC  | Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti ( <i>angl. high-performance liquid chromatography</i> )    |
| HPMC  | Hidroksipropilmetil celuloza ( <i>angl. hydroxy propyl methyl cellulose</i> )                           |
| ICH   | Mednarodna konferenca za harmonizacijo ( <i>angl. International Conference on Harmonisation</i> )       |
| IPČ   | Inhibitor protonske črpalke                                                                             |
| IPS   | Izguba pri sušenju                                                                                      |
| KF    | Karl Fischer                                                                                            |
| kps   | kapsula                                                                                                 |
| MVTR  | Prepustnost ovojnine za vlago ( <i>angl. moisture vapor transmission rate</i> )                         |
| OSR   | Osnovna standardna raztopina                                                                            |
| $p$   | Parni tlak                                                                                              |
| PS    | Pomožna snov                                                                                            |

|                |                                                                                                                  |
|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| QL             | Limita kvantifikacije ( <i>angl. quantitation limit</i> )                                                        |
| R <sup>2</sup> | Determinacijski koeficient                                                                                       |
| RH             | Relativna vlažnost ( <i>angl. relative humidity</i> )                                                            |
| RP             | Razkrojni produkt                                                                                                |
| RSD            | Relativni standardni odmik ( <i>angl. relative standard deviation</i> )                                          |
| SDMT           | Sorpcijsko-desorpcijski prenos vlage ( <i>angl. sorption-desorption moisture transfer</i> )                      |
| T              | Temperatura                                                                                                      |
| TGA            | Termogravimetrična analiza                                                                                       |
| UHPLC          | Tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti ( <i>angl. ultra high performance liquid chromatography</i> ) |
| ZU             | Zdravilna učinkovina                                                                                             |

## 1 UVOD

### 1.1 Inhibitorji protonske črpalke

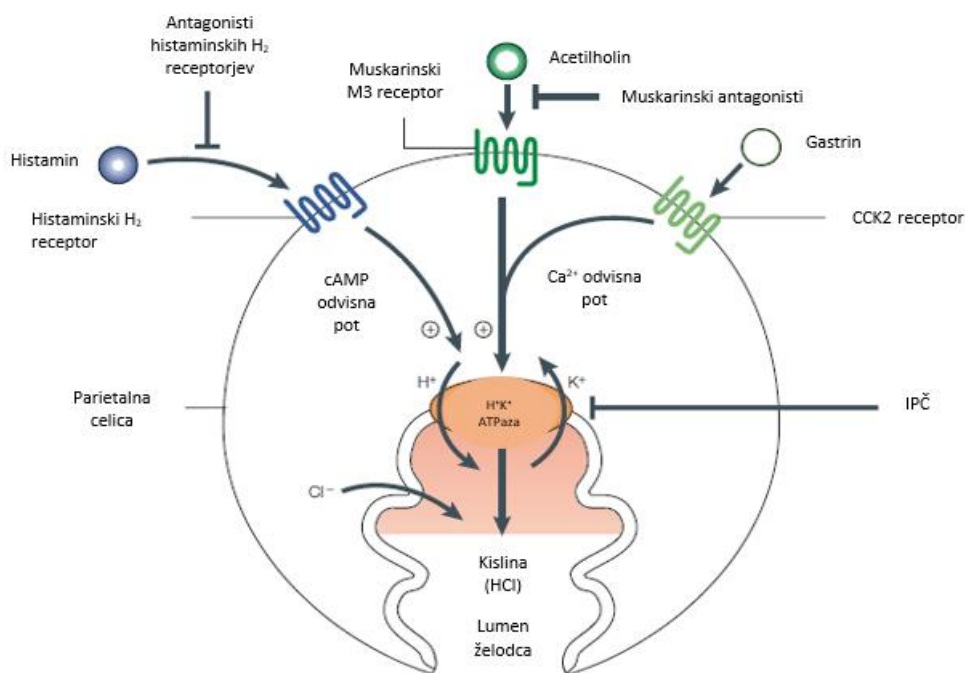
Želodčna kislina ima pomembne funkcije v gastrointestinalnem traktu. Udeležena je pri presnovi proteinov, pri absorpciji kalcija in železa, ter zagotavlja zaščito pred bakterijskimi okužbami. Kljub temu, da ima želodčna kislina številne pomembne funkcije, lahko njeno preveliko izločanje oslabi mukozno obrambo, kar vodi do patoloških stanj, kot sta gastroezofagealna refluksna bolezen (GERB) in peptični ulkus oz. peptična razjeda. Do poznih 70. let 20. stoletja je bilo zdravljenje pogojeno na uporabo antacidov, ki nevtralizirajo odvečno želodčno kislino ter inhibirajo proteolitični encim pepsin, kar povzroči začasno izboljšanje. Alternativa antacidom je bila gastrektomija, operativni poseg z možnimi resnimi posledicami. Novejša zdravljenja so osredotočena na farmakološko kontrolo kompleksnega mehanizma sekrecije želodčne kisline. Kot prvi se je v poznih 70. letih 20. stoletja na trgu pojavil cimetidin, antagonist histaminskih  $H_2$  receptorjev.  $H_2$  antagonisti preprečijo vezavo histamina na  $H_2$  receptorje v acidogenih (parietalnih) celicah in tako zavrejo sekrecijo želodčne kisline. Slabost te skupine zdravilnih učinkovin je relativno kratek čas delovanja. Nadaljnje raziskave na področju inhibicije sekrecije želodčne kisline so vodile do odkritja inhibitorjev protonske črpalke (IPČ). Aktivacija protonske črpalke v sekretornih parietalnih celicah želodca predstavlja zadnjo stopnjo v mehanizmu sekrecije želodčne kisline. Kot prvi IPČ se je leta 1988 na tržišču v EU pojavil omeprazol pod imenom Losec, dve leti pozneje pa še na tržišču v ZDA pod imenom Prilosec. Omeprazolu so sledili drugi strukturni analogi piridilmetilsulfinil benzimidazola, ki se razlikujejo v substituciji na piridinskem ali benzimidazolnem obroču. Te zdravilne učinkovine so zelo učinkoviti inhibitorji sekrecije želodčne kisline in imajo dolgotrajen učinek (1, 2).

Po pojavu omeprazola so sledile raziskave v smeri razvoja IPČ z izboljšanimi lastnostmi. Raziskave so potekale na številnih kemijskih analogih omeprazola ter optično čistih derivatih in so vodile do odkritja esomeprazola. Omeprazol je racemat, ki vsebuje kiralni center na žveplovem atomu in sestoji iz dveh optičnih izomerov – enantiomerov. Esomeprazol, S-izomer omeprazola, ima višjo biološko razpoložljivost, kar se odraža v višjih plazemskih koncentracijah v primerjavi z R-izomerom. Kljub temu sta na nivoju parietalnih celic oba izomera enako učinkovita, saj se pretvorita v enako inhibitorno aktivno obliko (1).

Pomembnejše terapevtske indikacije omeprazola so zdravljenje in preprečevanje ponovitve razjed na dvanajstniku in želodcu, refluksnega ezofagitisa, GERB in Zollinger-Ellisonovega sindroma (3). Večina peptičnih razjed nastane zaradi okužbe z bakterijo *Helicobacter pylori*, kjer je želodčna kislina še vedno ključni sprožilec. Za zdravljenje tega bolezenskega stanja uporabljamo trojno terapijo z dvema antibiotikoma in IPČ (1).

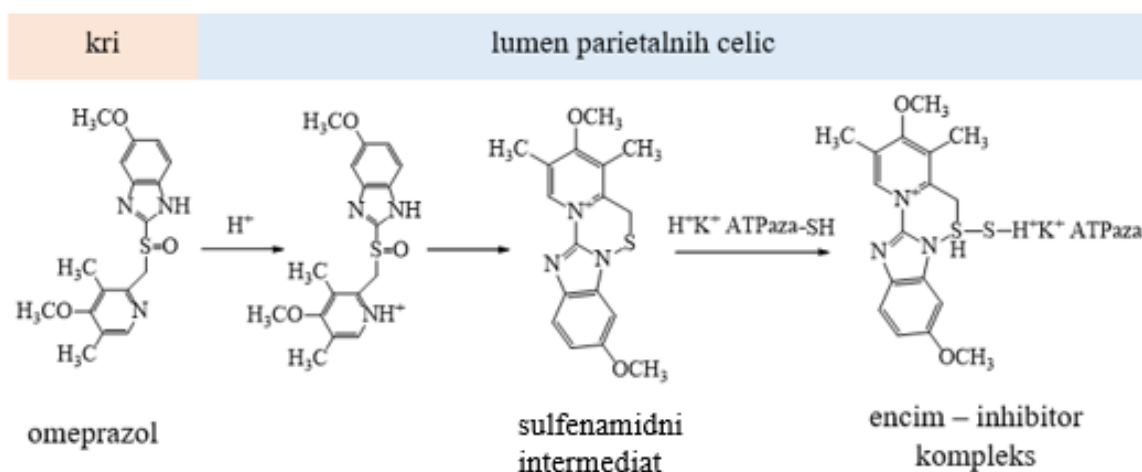
### 1.1.1 Mehanizem delovanja inhibitorjev protonske črpalke

Prisotnost hrane v želodcu ali črevesju, ter okus, vonj in pogled na hrano stimulirajo izločanje želodčne kisline, ki poteka v parietalnih celicah želodca. Ti stimulansi privedejo do aktivacije histaminskih, acetilholinskih ali gastrinskih receptorjev, ki se nahajajo v bazolateralni membrani parietalnih celic ter aktivirajo poti signalne transdukcije, ki privedejo do aktivacije protonske črpalke – encima  $H^+K^+$ -ATPaze (vodik/kalij adenzin trifosfat), zadnje stopnje v mehanizmu izločanja želodčne kisline. Inhibicija protonske črpalke tako zavre bazalno in stimulirano izločanje kisline neodvisno od dražljaja, ki je izločanje sprožil (slika 1) (1, 3).



**Slika 1:** Slikovni prikaz signalnih poti, ki privedejo do aktivacije protonske črpalke, in možnosti inhibicije sekrecije želodčne kisline (prirejeno po (1)).

IPČ so šibke baze, ki po absorpciji v tankem črevesju preko krvnega obtoka preidejo v parietalne celice želodca. Pri fiziološkem pH relativno enostavno prehajajo biološke membrane, potujejo v citoplazmo in nato v znotrajcelične kanalčke znotraj parietalnih celic, kjer je okolje zelo kislo. Kislo okolje povzroči koncentriranje molekul IPČ v tem delu parietalnih celic in omogoči kislinsko-katalizirano aktivacijo molekule. Omeprazol in ostale učinkovine iz skupine IPČ so tako predzdravila, ki se po aktivaciji pretvorijo v tetraciklično aktivno obliko (sulfenamidni derivat). Sulfenamidni intermediat se preko disulfidnih mostičkov kovalentno poveže s cisteinskimi ostanki v  $\alpha$ -podenoti  $H^+K^+$ -ATPaze, kar vodi do nastanka inhibitornega kompleksa (slika 2). Kljub kratkemu razpolovnemu času v plazmi, je njihov farmakološki učinek dolgotrajen, kar je posledica ireverzibilne vezave na encim, in dejstva, da je za povrnitev popolnega izločanja kisline potrebna sinteza novega encima (1-4). S farmakokinetičnega vidika je omejitveni faktor inhibicije hitrost tvorbe sulfenamidnega intermediata, ki je odvisna od pH in je hitrejša v prisotnosti večjih količin kisline (4).



**Slika 2:** Prikaz pretvorbe omeprazola v kislih pogojih. Omeprazol se v kislih pogojih v lumnu parietalnih celic pretvori do sulfenamidnega intermediata, ki se ireverzibilno veže na protonsko črpalko in jo tako inhibira (prirejeno po (1)).

### 1.1.2 Problem stabilnosti omeprazola

Omeprazol je kemijsko sestavljen iz benzimidazolnega in piridinskega obroča, povezanih z alkilno verigo, ki vsebuje sulfoksidno skupino (slika 2). Zaradi prisotnosti piridinskega obroča je omeprazol šibka baza, medtem ko je N–H proton v benzimidazolnem obroču kisli del molekule. Omeprazol izkazuje slabo topnost v vodnih medijih in fizikalno ali kemijsko nestabilnost, kar predstavlja izziv pri zagotovitvi ustrezne farmacevtske oblike (FO). Na

zmanjšanje stabilnosti vplivajo vlaga, povišana temperatura, kislo okolje, UV svetloba, soli in kovinski ioni. Zaradi občutljivosti omeprazola na kislo okolje, ki lahko povzroči njegov razpad, je večina peroralnih farmacevtskih oblik kislinsko odpornih. Kislost protona v benzimidazolnem obroču omogoča tvorbo bolj stabilne alkalne soli, stabilnost formulacije pa lahko povečamo tudi z dodatkom alkalnih pomožnih snovi (PS). V primeru omeprazola lahko s pripravo ZU v obliki soli vplivamo na stabilnost, topnost in biološko uporabnost (5, 6).

## 1.2 Stabilnost ZU in FO

Kemijski in fizikalni razkroj ZU lahko spremeni njihov farmakološki učinek, kar se odraža v zmanjšani učinkovitosti ter tudi v povečani toksičnosti. Uporaba farmacevtskih izdelkov za zdravljenje temelji na njihovi kakovosti, učinkovitosti in varnosti. Kakovost FO je v veliki meri pogojena s stabilnostjo ZU v FO, saj so le stabilne FO učinkovite in varne do konca roka uporabnosti (7). Tako je pojem stabilnost v farmaciji največkrat povezan z dovoljenim časom shranjevanja, v katerem kritični parametri kakovosti (kot na primer razkrojni produkti) ostanejo znotraj specifikacijsko določenih mej in tako FO ne predstavlja tveganja za zdravje bolnika (8).

Stabilnost je pomembna lastnost farmacevtskih izdelkov in je direktno povezana z njihovo kakovostjo, varnostjo in učinkovitostjo (9). Namen testiranja stabilnosti je ugotoviti, kako se kakovost, učinkovitost in varnost ZU ter farmacevtskih izdelkov spreminja s časom pod vplivom različnih dejavnikov okolja, kot so temperatura, vlaga ter svetloba. ZU so dovzetne za procese kemijske degradacije. Pri kemijski degradaciji ZU nastajajo razkrojni produkti. Regulativni organi zahtevajo karakterizacijo in spremljanje morebitnih razkrojnih produktov med rokom uporabnosti, za zagotovitev varnosti in učinkovitosti farmacevtskih izdelkov. Rok uporabnosti farmacevtskega izdelka pri priporočenih pogojih shranjevanja določimo na osnovi časa, ki je potreben, da razkrojni produkt (oz. vsota razkrojnih produktov) doseže vrednost, ki je dovolj visoka, da lahko vpliva na varnost. Rok uporabnosti pri priporočenih pogojih shranjevanja je lahko določen tudi s časom, v katerem vsebnost ZU ne pade pod kritično mejo (10). To nam omogoča določitev roka uporabnosti in načina shranjevanja (11). Rok uporabnosti je časovno obdobje, v katerem zdravilo še ustreza specifikacijskim zahtevam pod pogojem, da se shranjuje po predpisanih navodilih in v predlagani ovojnin (12).

### 1.2.1 Testiranje stabilnosti FO

Testi stabilnosti so različni preizkusi, ki so načrtovani tako, da omogočajo ustrezno vrednotenje stabilnosti farmacevtskih izdelkov z namenom določitve roka uporabnosti in pogojev shranjevanja. S pomočjo stabilnostnega testiranja v zgodnji fazi razvoja izberemo ustrezno stabilno sestavo FO, ustrezno ovojnino ter napovemo rok uporabnosti in pogoje shranjevanja. Testi stabilnosti omogočajo tudi boljše razumevanje razkrojnih mehanizmov ZU in vrednotenje ustreznosti stabilnostno indikativnih analitskih metod za proučevanje farmacevtskega izdelka (9). Testiranje stabilnosti je pomembno v različnih fazah razvoja farmacevtskega izdelka, kot je prikazano v preglednici I. Skozi življenjski cikel izdelka ločimo šest faz stabilnostnega testiranja (9, 12).

Preglednica I: Pomen testiranja stabilnosti v različnih fazah razvoja FO (povzeto po (9, 12)).

| Faza razvoja                                                                       | Pomen testiranja stabilnosti                                                                                                               |
|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Stresni in pospešeni testi ZU                                                   | Proučevanje vpliva temperature, vlage, oksidacije, svetlobe. Identifikacija razkrojnih produktov.                                          |
| 2. Stresni in pospešeni testi eksperimentalnih formulacij                          | Kompatibilnostne študije pomožnih snovi z ZU, stabilnost v formulaciji, optimizacija končne FO.                                            |
| 3. Stresni in pospešeni testi izbranih formulacij                                  | Razjasnitev dejanskih razpadnih poti, validacije analiznih postopkov, izbira ovojnine, določitev roka uporabnosti in pogojev shranjevanja. |
| 4. Pospešeni in dolgoročni testi vzorcev registracijskih serij FO                  | Potrjevanje rezultatov pospešenih in stresnih testov stabilnosti.                                                                          |
| 5. Nadaljevanje testiranja vzorcev FO po registraciji ( <i>ongoing stability</i> ) | Potrjevanje oz. podaljšanje roka uporabe ter pogojev shranjevanja.                                                                         |
| 6. Stabilnost proizvodnih serij vzorcev FO ( <i>follow-up stability</i> )          | Spremljanje stabilnosti med tekočo proizvodnjo, potrjevanje stabilnostnih podatkov.                                                        |

Stabilnostne študije morajo vsebovati testiranje vseh tistih parametrov, za katere predvidevamo, da se lahko s časom shranjevanja spreminjajo. V testiranje stabilnosti vključimo dejavnike, ki bi lahko vplivali na kakovost, varnost in/ali učinkovitost izdelka.

Priporočljivo je testiranje fizikalnih, kemijskih, bioloških in mikrobioloških lastnosti z uporabo validiranih stabilnostno indikativnih analiznih postopkov (13).

### 1.2.2 Vrste testiranja stabilnosti

Smernica Mednarodne konference za harmonizacijo (ICH, *angl. International Conference on Harmonization*) Q1A(R2): Testiranje stabilnosti novih učinkovin in končnih farmacevtskih izdelkov (11) natančno določa pogoje pospešenega, vmesnega in dolgoročnega testiranja (preglednica III). Pogoji so določeni glede na predlagane pogoje shranjevanja in tržno klimatsko območje. Pri načrtovanju stabilnostnih študij je potrebno upoštevati tudi dodatna priporočila posameznih držav. Dolgoročno testiranje stabilnosti izvajamo pri priporočenih pogojih shranjevanja in omogoča potrditev roka uporabnosti izdelka. Priporočeni pogoji shranjevanja so odvisni od klimatskega območja, v katerem se nahaja država, za katero študijo izvajamo. Razdelitev temelji na različnih povprečnih temperaturah in relativni vlažnosti (RH), prisotnih v teh klimatskih območjih. S pomočjo teh podatkov (preglednica II) določimo pogoje za dolgoročno in pospešeno testiranje stabilnosti (11). V primeru, da študijo izvajamo za klimatsko območje I ali II, je dolgoročni pogoj 25 °C/60 % RH, za območji III in IV pa je dolgoročni pogoj 30 °C/75 % RH.

Študije dolgoročne stabilnosti zagotavljajo, da izdelek ustreza specifikaciji in tako zadošča zahtevam za varnost in učinkovitost do konca roka uporabnosti (14).

Preglednica II: Priporočeni pogoji testiranja dolgoročne stabilnosti s primeri držav za posamezno klimatsko območje (prirejeno po (10, 11, 15)).

| Klimatsko območje | Opis klimatskega območja   | Pogoji dolgoročnega testiranja stabilnosti | Primer držav (15)                     |
|-------------------|----------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------|
| I                 | Zmerno                     | 21 °C/45 % RH                              | Velika Britanija, ZDA, Severna Evropa |
| II                | Subtropsko in mediteransko | 25 °C/60 % RH                              | Japonska in Južna Evropa              |
| III               | Vroče in suho              | 30 °C/35 % RH                              | Indija                                |
| IVa               | Vroče in vlažno            | 30 °C/65 % RH                              | Egipt                                 |
| IVb               | Vroče in zelo vlažno       | 30 °C/75 % RH                              | Brazilijska                           |

Študije vmesnega testiranja stabilnosti izvajamo pri pogoju 30 °C/65 % RH ali 30 °C/75 % RH, kar pomeni rahlo povišanje temperature in vlage glede na pogoj dolgoročne stabilnosti. Izvajamo jih le za klimatsko območje I in II, ko pride med testiranjem pospešene stabilnosti do bistvenih sprememb v parametrih stabilnosti pri proučevanem izdelku (11).

Pri testiranju pospešene in stresne stabilnosti je izdelek izpostavljen višji temperaturi in/ali vlagi, kot pri testih dolgoročne ali vmesne stabilnosti. Pri povišani temperaturi in vlagi potekajo reakcije razkroja ZU bistveno hitreje. Podatke pridobljene s stresnimi testi (temperatura nad 40 °C in/ali povišana RH) in pri testiranju pospešene stabilnosti (40 °C/75 % RH) uporabimo za napovedovanje roka uporabnosti (16, 17) in za primerjavo relativne stabilnosti prototipnih formulacij (18).

Poleg stresnih testov pri povišani temperaturi in/ali vlagi, farmacevtski izdelek izpostavimo tudi mehanskemu stresu in pogojem, ki omogočajo kislinsko oz. bazično hidrolizo, fotolizo ter oksidacijo (19). Z njimi preverimo ustreznost analitske metode za testiranje stabilnosti, pridobimo informacije o razkrojnih produktih ZU in mehanizmih razgradnje oziroma nastanka razkrojnih produktov. Stresni testi prav tako omogočajo boljše razumevanje kemijskega obnašanja ZU, kar pripomore k razvoju ustrezne FO in izboru ustrezne ovojnine.

Preglednica III: Pogoji testiranja stabilnosti kot jih priporoča ICH (povzeto po (11)).

| Vrsta testiranja stabilnosti | Pogoji shranjevanja                                  | Termini testiranja                 |
|------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Dolgoročno                   | 25 ± 2 °C/60 ± 5 % RH<br>(klimatski območji I in II) | 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36 mesecev |
| Vmesno                       | 30 ± 2 °C/65 ± 5 % RH                                | 0, 6, 9, 12 mesecev                |
| Pospešeno                    | 40 ± 2 °C/75 ± 5 % RH                                | 0, 3, 6 mesecev                    |

### 1.2.3 Kemijska stabilnost ZU

Stabilnost največkrat razdelimo na fizikalno, kemijsko in mikrobiološko. Kemijsko nestabilnost lahko opišemo kot razpad ZU zaradi kemijske reakcije, ki vodi do zmanjšanja učinkovitosti zdravila. Ocena stabilnosti je zelo pomembna, ker ZU lahko kemijsko razpada, pri tem pa nastajajo razkrojni produkti. Za zagotovitev varnosti je pomembno, da ovrednotimo morebitne razkrojne produkte, ki so lahko tudi toksični (10, 12, 20). Najpogostejše poti razpada ZU so reakcije hidrolize, oksidacije, kondenzacije in adicije, izomerizacije in prerazporeditve, eliminacije ter fotokemijske razpadne reakcije. V preglednici IV so predstavljene nekatere funkcionalne skupine, ki so najpogostejše podvržene kemijskim spremembam in produkti, ki pri tem nastanejo.

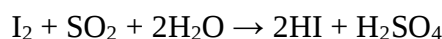
Preglednica IV: Najpogostejše funkcionalne skupine, ki so podvržene kemijskim pretvorbam in produkti, ki pri tem nastanejo (povzeto po (20)).

| Funkcionalna skupina            | Reakcija   | Produkt                                       |
|---------------------------------|------------|-----------------------------------------------|
| aldehidi                        | oksidacija | karboksilna kislina                           |
| alkoholi (primarni, sekundarni) | oksidacija | aldehidi, ketoni                              |
| alkeni                          | oksidacija | epoksid                                       |
| amini                           | oksidacija | imin (primarni, sekundarni), amid (terciarni) |
| reakcije na N in S              | oksidacija | N-oksid, sulfoksid, sulfon                    |
| amidi                           | hidroliza  | amin in karboksilna kislina                   |
| estri                           | hidroliza  | alkohol in karboksilna kislina                |
| karbamati                       | hidroliza  | alkohol in amin                               |
| $\beta$ -laktamski obroč        | hidroliza  | amin in karboksilna kislina                   |

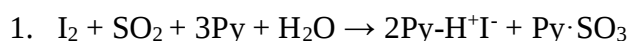
### 1.3 Določanje vsebnosti vode s Karl Fischer titracijo in izgubo pri sušenju

Karl Fischer (KF) titracija in izguba pri sušenju (IPS) sta najpogostejše uporabljene tehniki določanja vsebnosti vode v vseh stopnjah razvoja FO. Z metodo izgube pri sušenju pod ustreznimi pogoji sušimo vzorec in nato gravimetrično, iz razlike mas pred in po sušenju, določimo količino vlage in hlapnih snovi v vzorcu. Prav določitev vseh hlapnih snovi v vzorcu povzroča neselektivnost metode za določanje vode v vzorcu. Zato te metode pri našem delu nismo uporabljali.

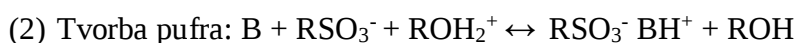
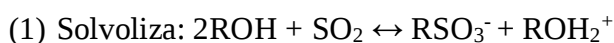
KF titracija je hitra, natančna in kvantitativna tehnika določanja vsebnosti vode v vzorcu, ki temelji na kvantitativni reakciji vode z raztopino žveplovega dioksida in joda v ustreznem brezvodnem mediju in v prisotnosti baze z zadostno pufrno kapaciteto (21). Določanje vsebnosti vode s KF titracijo temelji na reakciji:



Karl Fischer je ugotovil, da lahko reakcijo uporabimo za določanje vode v brezvodnih medijih, npr. v metanolu, ob presežku žveplovega dioksida. Z nevtralizacijo kislin (HI in  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) dosežemo premik ravnotežja reakcije v smeri produktov, za kar je Karl Fischer kot bazo uporabil piridin. Nadaljnje raziskave so pokazale, da piridin ni direktno vključen v reakcijo in deluje le kot baza. Ker je piridin toksičen in ima neprijeten vonj, sta pogostejše uporabljene alternativni imidazol in 2-metilimidazol. Z upoštevanjem metanola kot topila in piridina kot baze, lahko za KF titracijo zapišemo naslednjo dvostopenjsko reakcijo:



Iz zgoraj zapisanih enačb je razvidno, da metanol ne nastopa le kot topilo, ampak je vključen neposredno v reakcijski mehanizem. V alkoholnih topilih poteče reakcija med jodom in vodo v stehiometrijskem razmerju 1:1, medtem ko je v nealkoholnih topilih to razmerje 1:2 (21). Trenutno je za opis KF titracije v alkoholnem mediju sprejeta naslednja reakcijska shema:



Žveplov dioksid v ustreznem mediju reagira z alkoholom in tvori alkil sulfit. Reakcija poteče v pufrskem mediju ob prisotnosti ustrezne baze (B), ki zagotavlja optimalen pH medija (pH = ca. 5-8). Pri pH vrednostih, ki so nižje od 3, reakcije potečejo zelo počasi. V primerih, ko je pH medija višji od 8, v signifikantnem obsegu potekajo nestehiometrijske stranske reakcije. Redoks reakcija poteče v prisotnosti vode in ob dodatku joda v titracijsko celico (22).

Za določitev vsebnosti vode s KF titracijo ločimo dve metodi, volumetrično in kolumetrično. Metodi se razlikujeta v načinu dodatka joda v titracijsko celico. V primeru volumetrične metode je jod vključen v reagentu in ga s pomočjo birete dodajamo v titracijsko celico. Iz poznane količine joda v dodanem volumnu reagenta lahko izračunamo vsebnost vode. Pri kolumetrični titraciji se iz jodida, ki je prisoten v titracijski celici, elektrokemično tvori jod. Količino vode izračunamo iz števila molov elektronov, potrebnih za nastanek joda iz jodida (22). Volumetrična KF titracija je primerna metoda za vzorce, kjer je voda prisotna kot glavna komponenta (100 ppm – 100 %), medtem ko je kolumetrična metoda primerna za vzorce, kjer je voda prisotna v sledovih (1 ppm – 5 %) (21).

#### 1.4 Vodna aktivnost

Vlaga lahko bistveno vpliva na ZU in trdne FO tudi v primeru, ko ni neposredno vključena v potek kemijskega razkroja ZU. Vloga vlage pri povzročanju fizikalnih sprememb, kakor tudi vloga vlage kot reaktivne zvrsti, je povezana s termodinamsko aktivnostjo vode oz. vodno aktivnostjo ( $a_w$ ) FO oz. okolice, v kateri se vzorec nahaja (8). Aktivnost je termodinamski koncept in je definirana kot razmerje med fugativnostjo snovi ( $f$ ) v poljubnem stanju in fugativnostjo v standardnem stanju ( $f^0$ ), pri dani T (enačba 1). Fugativnost je merilo za težnjo po uhajanju snovi in predstavlja tlak, ki je prirejen neidealnemu obnašanju plina. V primeru, da se para obnaša kot idealni plin, lahko fugativnost zamenjamo s parnim tlakom ( $p$ ) (23, 24).

$$a_w = \frac{f}{f^0} = \frac{p}{p^0} \qquad ERH(\%) = a_w \times 100$$

*Enačba 1:* Enačbi prikazujeta izračun  $a_w$  in pretvorbo  $a_w$  v relativno ravnotežno vlažnost (ERH)

Vodna aktivnost in ravnotežna relativna vlažnost (ERH) sta merilo za prosto vodo v FO, to je voda, ki se lahko iz vzorca desorbira in vstopa v fizikalno-kemijske procese. Vodno aktivnost lahko ob predpostavki, da se vodna para obnaša kot idealni plin, definiramo kot razmerje med parnim tlakom vode v produktu ( $p$ ) in nasičenim tlakom vodne pare ( $p^0$ ) pri konstantni temperaturi (enačba 1). V ravnotežju je vodna aktivnost snovi enaka relativni vlažnosti v okolici, je brez merske enote in zavzema vrednosti med 0.0 (suha snov) ter 1.0 (čista voda). Nižja kot je vrednost  $a_w$ , manj vode je na voljo za mikrobiološko rast, za kemijske interakcije ter povečano mobilnost drugih molekul. Podajamo jo lahko tudi kot ERH v odstotkih, saj je enaka RH zraka, ki je v ravnotežju nad vzorcem (enačba 1). Hitrost adsorpcije vlage na površino trdnih snovi je odvisna od RH okolice in lastnosti snovi. Vodna aktivnost vpliva na kemijsko stabilnost, mikrobiološko stabilnost, pretočne lastnosti, kompaktibilnost, trdnost in na hitrost raztapljanja trdnih FO (25, 26, 27).

#### 1.4.1 Merjenje vodne aktivnosti z določanjem temperature rosišča z metodo hlajenja zrcala

Vodno aktivnost določimo z meritvijo RH zraka nad vzorcem, ko se vzpostavi ravnotežje. Instrumenti jo lahko merijo neposredno z določanjem temperature rosišča ali pa posredno s senzorji, ki zaznajo spremembe v fizikalnih ali električnih lastnostih (28). Rosišče je temperatura, pri kateri je zrak nasičen z vodno paro, kar pomeni, da se vodna para kondenzira z enako hitrostjo kot tekoča voda izhlapeva (29). S tehniko določanja temperature rosišča z metodo hlajenja zrcala merimo RH prostora nad vzorcem, ko sta  $a_w$  vzorca in RH zraka v komori merilca v ravnotežju. Merjenje poteka z zaznavanjem kondenzacije na hlajenem zrcalu, katerega temperatura je natančno kontrolirana. V ravnotežju je RH v prostoru nad vzorcem enaka vodni aktivnosti vzorca. Natančna točka, pri kateri se pojavi prva kondenzacija, se zazna s fotoelektrično celico. Pri tem je svetlobni žarek usmerjen v zrcalo in se odbije v foto detektorsko celico. Ko se pojavi prva kondenzacija, foto detektor zazna razliko v odboju od zrcala. Temperatura, pri kateri poteče kondenzacija na zrcalu, je temperatura rosišča. Ko se pojavi prva kondenzacija, aparatura s pomočjo infrardečega senzorja izmeri še temperaturo vzorca. Iz temperature vzorca in temperature rosišča sta s pomočjo standardnih vrednosti določeni vrednosti  $p$  in  $p^0$  (27, 30). Iz enačbe 1 potem dobimo vrednost  $a_w$  (24). Rezultat meritve na aparaturi sta vodna aktivnost in izpis temperature.

## 1.5 Napovedovanje stabilnosti

Rok uporabnosti je določen glede na čas, v katerem zdravilo ostane znotraj specifikacijsko določenih mej za vsebnost in razkrojne produkte, pri priporočenih pogojih shranjevanja. Običajno ga določimo in potrdimo s stabilnostnimi študijami, ki pa so časovno in stroškovno zelo potratne. Posebej v razvoju nove FO si lahko veliko pomagamo z različnimi računalniškimi modeli, ki nam pomagajo ovrednotiti kemijsko stabilnost izdelka. Tako lahko primerjamo kemijsko stabilnost različnih prototipnih FO, postavimo ustrezne specifikacijske meje in izberemo ustrezno ovojnino. Stabilnostne študije izvajamo skladno z ICH smernicami, da potrdimo rok uporabnosti, kar je potrebno podpreti z rezultati dolgoročnega testiranja stabilnosti (31). Kljub temu pa ICH smernica Q1E (32) pod določenimi pogoji dovoljuje omejeno ekstrapolacijo pridobljenih podatkov v času registracije zdravila. V primeru, ko se skozi čas testiranja dolgoročne in pospešene stabilnosti izdelek ne spreminja bistveno v testiranih parametrih, je dovoljen največ 12 mesecev daljši predlagan rok uporabnosti, kot je podprto z rezultati dolgoročne stabilnosti. ICH smernica Q1A (R2) (11) navaja uporabo alternativnih pristopov za testiranje stabilnosti, v primeru znanstveno upravičenih razlogov. Eden od alternativnih pristopov je napovedovanje stabilnosti s pomočjo programa za ovrednotenje pospešene stabilnosti (ASAP) (17, 31). Tak pristop temelji na napovedovanju dolgoročne stabilnosti s pomočjo prilagojene Arrheniusove enačbe s členom za vlago in podatkov, pridobljenih iz pospešenih kratkoročnih testiranj stabilnosti pri ostrejših pogojih. Kljub številnim prednostim napovedovanja stabilnosti, regulativni organi za pridobitev dovoljenja za promet z zdravili v večini primerov še vedno zahtevajo podatke, pridobljene z dolgoročnimi testi stabilnosti.

### 1.5.1 Vpliv temperature in vlage na razkroj ZU

Namen napovedovanja stabilnosti je razkroj vzorca po enakem mehanizmu, kot poteka razkroj pri pogojih dolgoročnega shranjevanja, ampak v veliko krajšem času. V primeru, ko je razkroj učinkovine odvisen predvsem od temperature in vlage, lahko z informacijami, pridobljenimi pri pospešenih in stresnih testih stabilnosti napovemo razkroj ZU pri pogojih dolgoročne stabilnosti. Temperatura občutno vpliva na hitrost kemijskih reakcij in ima tako velik vpliv na stabilnost. Temperaturno odvisnost hitrosti kemijske reakcije ( $k$ ) lahko opišemo z Arrheniusovo enačbo (enačba 2) (20, 31).

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT}$$

*Enačba 2:* Arrheniusova enačba;  $k$  predstavlja hitrost degradacije (odstotek tvorjenega razkrojnega produkta na dan), faktor  $A$  je število vseh trkov na časovno enoto (*angl. Arrhenius collision frequency*),  $E_a$  predstavlja aktivacijsko energijo kemijske reakcije,  $R$  plinsko kontanto,  $T$  temperaturo v Kelvinih.

Drugi faktor, ki občutno vpliva na hitrost razkroja ZU, je vlaga. Voda lahko vstopa v interakcije s trdnimi snovmi skozi mehanizma adsorpcije in absorpcije. Ko se molekule vode vežejo na površino trdne snovi, govorimo o adsorpciji. Do absorpcije pa pride, ko molekule vode prodrejo v notranjost strukture trdnih snovi (25). Voda je v trdnih vzorcih lahko prisotna v različnih oblikah. Lahko je prisotna kot tekočina na površini trdne snovi, adsorbirana na površino trdne snovi ali kot para v zračnih prostorih na snovi oz. v okolici. Lahko je tudi v obliki vezane vode v strukturi snovi in je tako direktno povezana s trdno snovjo (npr. kot hidrat ali ujeta v amorfni strukturi) ter kot taka ni neposredno na voljo za kemijske interakcije (25, 31). Količina vode, ki se veže na trdne snovi, je odvisna od afinitete med površino snovi in molekulami vode, temperature, RH in, v primeru adsorpcije, od velikosti izpostavljene površine. Z izrazom sorpcija opišemo procese adsorpcije, absorpcije, desorpcije in resorpcije. Pri procesih sorpcije ločimo fizisorpcijo, kjer prevladujejo šibke van der Waalove sile, in kemisorpcijo, kjer se molekule adsorbirajo s kemijsko vezjo, kar vodi do močnejših (ireverzibilnih) interakcij (25). Sorpcija poteče, ko je porušeno ravnotežje med parnim tlakom vode v snovi in parnim tlakom vode v okolici. Takrat se voda z vodikovimi vezmi poveže s polarnimi funkcionalnimi skupinami sorbenta, sorpcija potem poteče po principu difuzije do tvorbe monosloja na površini, ob nadaljnji sorpciji se s kondenzacijo ustvari multimolekularna plast vode na trdni snovi (33). Voda vpliva na kemijski razkroj tako, da poveča mobilnost molekul ter pospeši kemijske reakcije v trdni snovi. Voda je lahko tudi neposredno udeležena pri kemijski reakciji kot reaktant, katalizator ali produkt (31). Skupen vpliv temperature in vlage lahko opišemo s prilagojeno Arrheniusovo enačbo s členom za vlago (enačba 3), ki opisuje stabilnost vzorca kot funkcijo temperature in relativne vlažnosti. Iz enačbe sledi, da se kemijska nestabilnost povečuje eksponentno s povečevanjem relativne vlažnosti (17, 20, 31, 34).

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} + B \cdot (RH)$$

*Enačba 3:* Prilagojena Arrheniusova enačba s členom za vlago ( $B$ ).

Kemijsko degradacijo ZU najpogosteje spremljamo s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC). Rezultat meritev je % mase razkrojnega produkta (% RP) glede na celotno maso ZU. Razpad ZU lahko poteka linearno, s kinetiko 0. reda, ali nelinearno. Hitrost reakcije  $k$  lahko izračunamo iz izmerjenih % RP in znanega časa shranjevanja. Ko imamo na razpolago več časovnih točk,  $k$  izračunamo s pomočjo linearne regresije. V primeru ko se % RP povečuje linearno s časom, lahko  $k$  izračunamo po *enačbi 4*:

$$k = \frac{\% RP}{\text{čas } (t)}$$

*Enačba 4*: Izračun hitrosti kemijske reakcije  $k$  za kinetiko 0. reda.

V trdnih snoveh kemijski razkroj pogosteje poteče z nelinearno kinetiko, ki je težja za opis. Razvitih je nekaj kinetičnih modelov, ki opisujejo razkroj ZU z nelinearno kinetiko (20, 31).

### 1.5.2 Napovedovanje porazdelitve vlage znotraj ovojnine

Za napovedovanje dolgoročne stabilnosti pri priporočenih pogojih shranjevanja je potreben opis ERH znotraj ovojnine, kot funkcije časa pri pogojih dolgoročne stabilnosti. Funkcijo ERH v odvisnosti od časa lahko opišemo s pomočjo poznavanja prepustnosti ovojnine za vlago in sorpcijskih/desorpcijskih izoterm za vlago vzorca. Pri tem je potrebno upoštevati tudi začetno vsebnost vode v FO, vpliv sušilnega sredstva ter volumen prostega prostora nad vzorcem. Prepustnost ovojnine za vlago opišemo s stopnjo permeabilnosti vodne pare skozi ovojnino (v mg H<sub>2</sub>O/dan) pri danih pogojih,  $T$  in  $RH$ . Vlaga v ovojninu se bo porazdelila med komponente glede na to, koliko vlage lahko dana snov v ravnotežju sprejme pri dani  $RH$ , kar opišemo z ustrezno sorpcijsko izotermo za vlago. Funkcijo  $RH$  v odvisnosti od časa lahko za notranjost ovojnine izračunamo s kombinacijo  $RH$  snovi v ovojninu, s pomočjo ustreznih sorpcijskih izoterm za vlago, in z upoštevanjem stopnje permeabilnosti vodne pare skozi vsebnik (17, 31, 34).

### 1.5.3 Sorpcijske izoterme za vlago

Sorpcijske izoterme za vlago opisujejo razmerje med vodno aktivnostjo in ravnotežno količino sorbirane vode pri konstantni temperaturi in tlaku (25, 35, 36). Obstaja veliko empiričnih enačb za opis sorpcijskega obnašanja vodne pare. Za ustreznost rezultatov je kljub temu za posamezno snov potrebna eksperimentalna določitev sorpcijskih lastnosti vode pri različnih  $RH$ . Pridobljeni podatki o obliki izoterme, specifični površini vzorca,

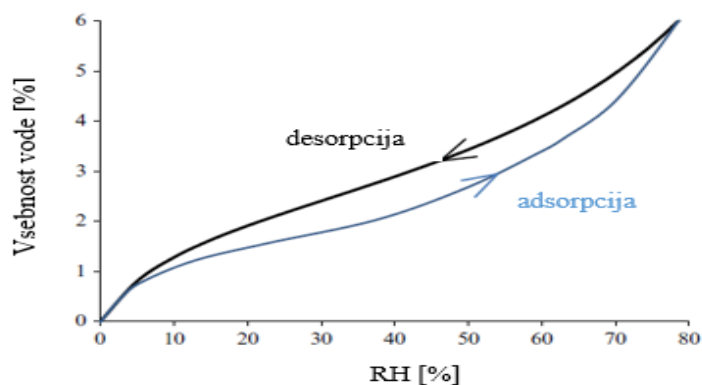
reverzibilnosti adsorpcije vlage, prisotnosti in oblike histerezne zanke omogočajo informacije o interakcijah med trdno snovjo in vodo (25). Tako je določitev sorpcijske izoterme za vlago pogost pristop za določitev medsebojnih interakcij med vodo in trdnino. Za matematični opis vsebnosti vlage pri določeni vodni aktivnosti najpogosteje uporabljamo Guggenheim-Andersen-de Boer (GAB) model (enačba 5) (25, 37, 38).

$$m = \frac{m_m \cdot C_G \cdot K \cdot a_w}{(1 - K \cdot a_w) \cdot (1 + (C_G - 1) \cdot K \cdot a_w)}$$

*Enačba 5:* GAB model;  $m$  predstavlja vsebnost vode,  $m_m$  je vsebnost vode enega adsorbiranega sloja,  $a_w$  je vodna aktivnost (0-0,5) in  $C_B$ ,  $C_G$  in  $K$  so konstante, povezane z entalpijo adsorpcije.

Za napovedovanje sorpcijskega obnašanja komponent znotraj ovojnine je pomembno poznavanje vpliva spreminjanja vsebnosti vode na ERH znotraj ovojnine. To lahko opišemo s skupno sorpcijsko izotermo komponent v vzorcu (ZU in PS). Pri tem je treba upoštevati tudi doprinos prostora nad vzorcem, v katerega se porazdeljuje para, ki prehaja skozi ovojnino, in sušilno sredstvo. Skupno sorpcijsko izotermo lahko izračunamo ob predpostavki, da snovi, ki so v stiku med sabo, medsebojno ne vplivajo na sorpcijske lastnosti posamezne komponente.

Sorpcijske izoterme za vlago lahko izdelamo z navlaženjem suhega vzorca (adsorpcijska izoterma) ali s sušenjem navlaženega vzorca (desorpcijska izoterma). Razlika med adsorpcijsko in desorpcijsko izotermo se imenuje histereza (31). Količina adsorbirane vlage bo pri dani RH višja v primeru, da je snov že bila izpostavljena visoki RH. Do razlike pride zaradi prerazporeditev molekul v strukturi snovi, ker se le-te prilagodijo adsorbirani vlagi (30).



**Slika 3:** Običajna adsorpcijska in desorpcijska izoterma za snov, ki izkazuje histerezo (prirejeno po (31)).

## 2 NAMEN DELA

Namen naloge je določiti vpliv vlage na kemijsko stabilnost omeprazola v kapsulah z zakasnelim sproščanjem in preveriti možnost napovedovanja kemijske stabilnosti, za obdobje roka uporabnosti, s podatki pridobljenimi v krajšem časovnem intervalu. Vpliv vlage na kemijsko stabilnost pelet omeprazola z zakasnelim sproščanjem, pakiranih v trde želatinaste kapsule, bomo določali s spremljanjem porasta količine razkrojnih produktov, vodne aktivnosti in vsebnosti vode s Karl Fischer titracijo pri pogojih pospešenega testiranja stabilnosti. V ta namen bomo razvili in validirali metodi za določanje vodne aktivnosti in vsebnosti vode s Karl Fischer titracijo.

Eksperimentalni del naloge bo razdeljen v tri dele. Prvi del bo vključeval razvoj in izvedbo validacije metod za določanje vodne aktivnosti in vsebnosti vode s Karl Fischer titracijo. V drugem delu bomo preverili stabilnost omeprazola v kapsulah s peletami z zakasnelim sproščanjem. V ta namen bomo pogojem pospešene stabilnosti (40 °C/75 % RH) izpostavili tri različne odmerke kapsul, polnjenih s peletami z zdravilno učinkovino omeprazol, v dveh različnih pakirnih konfiguracijah. Preverili bomo, kako prisotnost vlage vpliva na kemijsko stabilnost omeprazola. Primerjali bomo vpliv različno higroskopskih zdravilnih učinkovin na kemijsko stabilnost farmacevtske oblike. V tretjem delu bomo preverili možnost napovedovanja stabilnosti FO. V ta namen bomo uporabili v Leku izdelan model, ki temelji na prilagojeni Arrheniusovi enačbi s členom za vlago, prepustnosti ovojnine za vlago (MVTR, *angl. moisture vapor transmission rate*) in sorpcijsko-desorpcijskem prenosu vlage (SDMT, *angl. sorption-desorption moisture transfer*) med komponentami v obojnini. Izdelali bomo praktične sorpcijske izoterme, ki prikazujejo vsebnost vode v odvisnosti od vodne aktivnosti. Določili bomo tudi teoretično sorpcijsko izotermo s pomočjo združevanja literaturno pridobljenih sorpcijskih izoterm, za posamezne pomožne snovi in zdravilno učinkovino. S pridobljenimi podatki iz pospešenega testiranja stabilnosti, stresnih testov, sorpcijskih izoterm in prepustnosti ovojnine za vlago bomo nato s pomočjo modela napovedali kemijsko stabilnost pri pogojih dolgoročne stabilnosti za rok uporabnosti (2 leti). Dobljene rezultate napovedovanja bomo primerjali z razpoložljivimi rezultati dolgoročnega testiranja stabilnosti.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 Uporabljene kemikalije, standardi in reagenti

##### TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA ULTRA VISOKE LOČLJIVOSTI (UHPLC):

- Natrijev dihidrogen fosfat monohidrat,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ,  $M = 137,99 \text{ g/mol}$ , 99,7 % (Merck, Nemčija)
- Dinatrijev hidrogenfosfat,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $M = 141,96 \text{ g/mol}$ ,  $\geq 99,0 \%$  (Merck, Nemčija)
- Acetonitril,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , ACN,  $M = 41,05 \text{ g/mol}$ ,  $> 99,5 \%$ , HPLC grade (J. T. Baker, Nizozemska)
- Natrijev hidroksid,  $\text{NaOH}$ ,  $M = 40,00 \text{ g/mol}$ , Titrisol<sup>®</sup>, za pripravo 1 M raztopine (Merck, Nemčija)
- Omeprazol,  $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$  ( $M_r = 345,42$ ), delovni standard, vsebnost: 99.7 % (Lek, Slovenija)
- Omeprazol *N*-oksid ( $M_r = 361,42$ ), identifikacijski standard (LGC, Velika Britanija)
- Omeprazol A ( $M_r = 345,42$ ), identifikacijski standard (Lek, Slovenija)
- Omeprazol benzimidazol ( $M_r = 180,23$ ), identifikacijski standard (Esteve Quimica, Španija)

##### KARL FISCHER

- HYDRANAL<sup>®</sup> Formamide dry,  $\text{CH}_3\text{NO}$ ,  $M = 45,04 \text{ g/mol}$ , Fluka<sup>®</sup> (Sigma – Aldrich, Nemčija)
- Metanol,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ,  $\text{MeOH}$ ,  $M = 32,04 \text{ g/mol}$ , HPLC grade (J. T. Baker, Nizozemska)
- HYDRANAL<sup>®</sup> Composite 5, Fluka<sup>®</sup> (Sigma – Aldrich, Nemčija). Water equivalent titer 4,5 – 5,5 mg/mL,  $d: 1,15 \text{ g/mL}$ . Reagent za volumetrične, enokomponentne KF titracije (ne vsebuje metanola)
- Vodni standard HYDRANAL<sup>®</sup> 10,0 mg/g, Fluka<sup>®</sup> (Sigma – Aldrich, Nemčija)

##### VODNA AKTIVNOST

- Litijev klorid,  $\text{LiCl}$ , 0,250  $a_w$  ( $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ), 13.41 molal v  $\text{H}_2\text{O}$ , ACQUA LAB by DECAGON, ZDA
- Natrijev klorid,  $\text{NaCl}$ , 0,760  $a_w$  ( $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ), 6.00 molal v  $\text{H}_2\text{O}$ , ACQUA LAB by DECAGON, ZDA

### 3.2 Aparature in oprema

- Klimatske komore, ki vzdržujejo nadzorovane pogoje  $40 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$  /  $75 \pm 5 \text{ \% RH}$ , VOETSCH VP 1300 Pharma, Nemčija
- Klimatiziran prostor z nadzorovanimi pogoji  $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$  /  $60 \pm 5 \text{ \% RH}$
- Nasičene solne raztopine LiCl, MgCl<sub>2</sub>, NaBr, NaCl za zagotavljanje ustrezne RH v komorah za navlaženje vzorcev. Pripravljeno po (39).

#### TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA ULTRA VISOKE LOČLJIVOSTI:

- Tekočinski kromatograf ultra visoke ločljivosti Waters Acquity UHPLC H-CLASS sistem s TUV detektorjem s komponentami (ZDA):
  - o Acquity Ultra performance LC™ TUV detektor,
  - o Acquity Ultra performance LC™ Sample manager,
  - o Acquity Ultra performance LC™ Binary solvent manager,
- Programska oprema: Waters Empower 3
- Kolona: Acquity BEH Shield RP18 1.7μm, 100 × 2.1 mm
- Laboratorijska steklovina in laboratorijski pribor
- Precizna analitska tehtnica, Mettler Toledo MX 5, Mettler Toledo GmbH., Švica
- Analitska tehtnica Mettler Toledo Balance Excellence PLUS XP205DR, Mettler Toledo GmbH, Švica
- pH meter SevenMulti, Mettler Toledo GmbH., Švica
- Ultrazvočna kopel: Branson 8510, Emerson Industrial Automation, ZDA
- Pipeta: Brand HandyStep electronic, 0.001 – 50 mL, BrandTech® Scientific, Inc., ZDA
- Aparatura za pripravo bidestilirane vode: Milli-Q® Advantage A10 Water Purification System, Merck Millipore, ZDA
- Za filtracijo raztopin smo uporabili membranske filtre Millipore Millex HV 0,2 μm in brizge 10 mL (Ecoject)
- Steklene (amber) vial, Agilent Technologies, ZDA

#### KARL FISCHER TITRACIJA

- KF: Volumetric Karl Fischer titrator V30, Mettler Toledo, Mettler Toledo GmbH, Švica
- Programska oprema za določanje vode: LabX 2016

- Pribor: injekcijska brizga z iglo Hamilton 50  $\mu$ L (22 ga), ZDA; terilnica s pestilom; žlička; stekleni tehtalni čolniček
- Analitska tehtnica: Mettler Toledo Balance Excellence PLUS XP205DR, Mettler Toledo GmbH, Švica

#### APARATURA ZA MERJENJE VODNE AKTIVNOSTI:

- Merilec  $a_w$  Aqualab 4TE, Decagon Devices Inc., ZDA
- Pribor: posodica za vzorec

### 3.3 Uporabljeni vzorci

V magistrski nalogi smo uporabili vzorce z ZU omeprazol, dveh različnih proizvajalcev. Omeprazol je zelo občutljiv na vlago ter druge dejavnike okolja. ZU je vgrajena v pelete, ki omogočajo zakasnelo sproščanje, in so polnjenje v trde želatinaste kapsule (HGC). Testiranje smo izvajali na kapsulah z različnimi odmerki ZU, in sicer 10 mg, 20 mg in 40 mg. Kapsule so bile pakirane po 30 in 1000 kapsul v polietilenske (HDPE) platenke s sušilnim sredstvom. Volumni platenk in masa sušilnega sredstva so predstavljeni v preglednici V.

Vsaka kapsula vsebuje količino pelet, ki ustreza 10 mg, 20 mg ali 40 mg omeprazola. Pelete so sestavljene iz pomožnih snovi: sladkorna jedra, hipromeloza, natrijev lavril sulfat, magnezijev oksid, povidon K25, smukec, trietil citrat in 30 % disperzija kopolimera metakrilne kisline in etil akrilata 1:1. Ovojnica kapsul vsebuje želatino, titanov dioksid, rdeč in rumen železov oksid (40). Količine ZU in PS so premo sorazmerne z odmerkom.

Preglednica V: Podatki o pakiranju vzorcev.

| Odmerek [mg] | Število kapsul v enoti ovojnine | Masa sušilnega sredstva [g] | Volumen platenke [mL] |
|--------------|---------------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| 10           | 30                              | 1                           | 60                    |
|              | 1000                            | 10                          | 500                   |
| 20           | 30                              | 1                           | 60                    |
|              | 1000                            | 10                          | 500                   |
| 40           | 30                              | 2                           | 60                    |
|              | 1000                            | 20                          | 950                   |

### **3.3.1 Pogoji testiranja vzorcev**

Vse vzorce smo testirali pod pogoji pospešenega testiranja stabilnosti (preglednica III) v skladu z ICH smernicami (11) ter Lekovimi internimi stabilnostnimi protokoli in specifikacijami. Vzorce smo ustrezno označili in jih v predpisani ovojnini postavili na pogoje v klimatske komore pri  $40 \pm 2$  °C in  $75 \pm 5$  % RH. Analize smo izvedli v časovnih intervalih pri 0, (1), (2), 3, 6, (9) in (12) mesecih. Vsi vzorci so bili analizirani v časovnem roku enega meseca od vzorčenja. Vzorci so v tem času bili shranjeni pri kontroliranih sobnih pogojih. Pri vsakem terminu vzorčenja smo izvedli določanje sorodnih snovi (UHPLC), določanje vsebnosti vode (KF) ter  $a_w$ . Stresno testiranje vzorcev je bilo izvedeno v fazi razvoja prototipa.

## **3.4 Postopki in metode**

### **3.4.1 Določanje vodne aktivnosti**

#### ***3.4.1.1 Preverjanje ustreznosti aparature pred merjenjem***

Preden smo začeli z analizo vzorcev smo dnevno preverili, ali aparatura poda ustrezne rezultate. To smo storili s pomočjo nasičenih raztopin 13,41 molalne raztopine LiCl z deklarirano vrednostjo  $a_w = 0,248$  in 6,00 molalne raztopine NaCl z deklarirano vrednostjo  $a_w = 0,760$  pri  $T = 22,5$  °C. Raztopino smo po odprtju vial prelili v plastično posodico za merjenje, jo vstavili v aparaturu in začeli meritev. Pri tem se je izmerjena vrednost od deklarirane lahko razlikovala za največ 0,005.

#### ***3.4.1.2 Določanje vodne aktivnosti vzorcem***

Meritve  $a_w$  smo izvedli na aparaturi za merjenje  $a_w$  Aqualab 4TE. Vodna aktivnost je nedestruktivna metoda in ne zahteva nobene priprave vzorca, če ni drugače prepisano. Vzorec (pelete) smo, kar se da hitro, da se ne bi navlažil, prenesli v ustrezno plastično posodico, jo vstavili v aparaturu in začeli z merjenjem. Analize smo izvajali pri sobni RH ( $RH \approx 60\%$ ). Pri tem smo vzeli toliko vzorca, da smo prekrili celotno dno plastične posodice, kakor predpisujejo navodila proizvajalca aparature. Merjenje smo izvedli pri temperaturi 22,5 °C. Po končani meritvi se je na aparaturi izpisala vrednost  $a_w$  in  $T$ .

#### ***3.4.1.3 Validacija metode za merjenje vodne aktivnosti***

Validacijo metode za merjenje  $a_w$  smo izvedli na peletah 40 mg odmerka vzorca kapsul. Merjenje vzorca smo izvedli po postopku opisanem v poglavju 3.4.1.2 *Določanje  $a_w$  vzorcev*.

Z namenom, da bi preverili pravilnost rezultatov, ki jih dobimo z meritvami, smo preverili natančnost, rigidnost, točnost in robustnost metode, kot je prikazano v *prilogi 2*.

#### 3.4.1.3.1 Natančnost metode znotraj dneva

Pripravili smo 6 paralelk vzorca in jih analizirali v enem dnevu pri  $T = 22.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Iz dobljenih rezultatov smo s pomočjo validiranega Excelovega izračuna, izračunali RSD vrednosti ( $n = 6$ ) ter interval zaupanja za izmerjene vrednosti  $a_w$  pri 95 % stopnji zaupanja ( $n = 6$ ,  $t_{\text{tab}} = 2,571$ ).

#### 3.4.1.3.2 Natančnost metode med dnevi (vključuje tudi rigidnost)

Analizo na šestih paralelkah vzorca smo izvedli na drug dan, kot natančnost metode znotraj enega dneva, in na drugi aparaturi za merjenje  $a_w$ . Iz dobljenih rezultatov smo s pomočjo validiranega Excelovega izračuna, izračunali RSD dobljenih vrednosti ( $n = 6$ ), RSD dobljenih vrednosti izmerjenih za natančnost znotraj enega dneva in med dnevi ( $n = 12$ ), 95 % interval zaupanja in absolutno spremembo povprečne vrednosti  $a_w$  med dnevoma.

#### 3.4.1.3.3 Točnost metode

Pripravili smo 3 paralelke vzorca, ki smo ga predhodno izpostavili 60 % RH v klimatski komori pri  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  za 7 dni. Vzorce smo nato analizirali in iz dobljenih rezultatov s pomočjo validiranega Excelovega izračuna, izračunali RSD dobljenih vrednosti ( $n = 3$ ), 95 % interval zaupanja, absolutno razliko med pravo in izmerjeno vrednostjo in posamezni ter celokupni (povprečje treh meritev) izkoristek glede na teoretično vrednost  $a_w = 0,6$  ter predpostavlja, da se vzorec v tem času v komori pri 60 % RH v celoti navlaži na to vrednost.

#### 3.4.1.3.4 Robustnost metode

Robustnost metode smo preverili tako, da smo spreminjali  $T$  merjenja. Pripravili in analizirali smo po 3 paralelke vzorca ter jih pomerili pri temperaturi  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $22,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  in  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Iz dobljenih rezultatov smo s pomočjo validiranega Excelovega izračuna izračunali RSD vrednosti pri posamezni  $T$ , 95 % interval zaupanja ter absolutno razliko izmerjenih vrednosti glede na rezultate meritev znotraj dneva.

### 3.4.2 Določanje vsebnosti vode s Karl Fischer titracijo

#### 3.4.2.1 **Kalibracija aparature pred meritvami**

Preden smo izvedli meritve na vzorcu, smo izvedli kalibracijo s prečiščeno vodo. Kalibracijo smo izvedli tako, da smo v titracijsko celico dodali toliko topila – brezvodnega metanola, da smo prekrili elektrodo. Standardizacijo smo izvedli s Hydranal Composite 5 reagentom, s

katerim smo tudi izvajali analize. Na začetku tedna smo z metodo standardnega dodatka v 5 ponovitvah izvedli tedensko preverjanje faktorja KF titranta s standardizacijo. Znotraj tega tedna smo potem dnevno izvedli preverjanje z eno ponovitvijo. Ko smo v programu zagnali ustrezno metodo, je instrument samodejno izvedel predtitracijo topila v celici, tako da v topilu ni bilo vode. Nato smo določili premik (*angl. drift*), ki nam pokaže, ali celica tesni dovolj dobro oz. kako hitro vlaga vstopa v celico. Izmerjen premik ni smel presegati vrednosti 20 µg/min. Nato smo pomerili vzorce prečiščene vode tako, da smo s pomočjo injekcijske brizge v celico dodali natančno okrog 0,020 g prečiščene vode z brizgo Hamilton v 5 paralelkah v primeru tedenskega preverjanja faktorja oz. v 1 paralelki v primeru dnevnega preverjanja faktorja. Titrator je samodejno izračunal relativni standardni odklik (RSD) vseh petih vrednosti. Kalibracija je bila ustrezna, če je bil  $RSD \leq 2,0 \%$ . V primeru dnevnega preverjanja faktorja pa razlika med povprečno vrednostjo 5 meritev pri tedenskem preverjanju in meritvi pri dnevnem preverjanju ni smela presegati 2,0 %.

#### 3.4.2.2 Določanje vsebnosti vode v vzorcu

V titracijsko celico smo dodali približno 50 – 60 mL topila, mešanice brezvodnega metanola in formamida v volumskem razmerju 1 : 1. Pazili smo, da je bila elektroda prekrita s topilom. Meritev smo izvedli z reagentom Hydranal Composite 5 ter nastavili ekstrakcijski čas na 300 s. Po zagonu metode je instrument samodejno izvedel predtitracijo, da v topilu ni bilo prisotne vode. Vzorec smo pripravili tako, da smo v terilnico izpraznili pelete iz kapsul in jih homogenizirali v fin prah. Za homogenizacijo smo porabili 10 – 20 kapsul, odvisno od odmerka. Natančno smo natehtali približno 350 mg vzorca in ga med mešanjem na magnetnem mešalu hitro stresli v celico s topilom. Po končani titraciji je program LabX samodejno izračunal vsebnost vode v vzorcu po enačbi 6.

$$\text{vsebnost vode v vzorcu [\%]} = \frac{\left(VEQ \cdot CONC - \left[\frac{t \cdot \text{drift}}{1000}\right]\right) \cdot C}{m}$$

*Enačba 6:* Izračun, po katerem program LabX izračuna vsebnost vode v vzorcu (m/m [%]).  
 m = zatehta vzorca [g]; VEQ = poraba titranta [mL]; CONC = koncentracija titranta, ki jo določimo s tedensko standardizacijo [mg/mL]; t = čas titracije [min]; drift (premik) [µg/min]; C = konstanta (0,1 [/]).

#### 3.4.2.3 Validacija KF metode

Razvito metodo smo validirali, da smo potrdili ustreznost KF metode namenu uporabe. Preverili smo, da naša metoda ustreza zahtevam za natančnost, točnost, linearnost, rigidnost

in robustnost ter tako zagotovili ustreznost rezultatov, pridobljenih z analizo. Validacijo smo izvedli na najvišjem odmerku omeprazol kapsul. Validacija je zajemala parametre za testiranje natančnosti metode znotraj dneva, natančnosti metode med dnevi, linearnosti, točnosti in robustnosti metode, ki so prikazani v *prilogi 1*. Pri tem smo upoštevali kriterije za vsebnost vode po internih predpisih (*priloga 1*). Pri vrednotenju smo upoštevali informativno specifikacijsko mejo za vsebnost vode, ki znaša  $\leq 4,0$  %. Vsebnost vode v vzorcu smo določali po postopku opisanem v poglavju 3.4.2.2 *Določanje vsebnosti vode v vzorcu*.

#### 3.4.2.3.1 Natančnost metode znotraj dneva

Pripravili smo homogen vzorec 40 mg odmerka omeprazol kapsul v šestih paralelkah po postopku opisanem v poglavju 3.4.2.2 *Določanje vsebnosti vode v vzorcu*. Iz dobljenih rezultatov smo s pomočjo validiranega Excelovega izračuna izračunali RSD vrednosti ( $n = 6$ ) ter interval zaupanja za vsebnosti vode pri 95 % stopnji zaupanja ( $n = 6$ ,  $t_{\text{tab}} = 2,571$ ). Dobljene rezultate smo nato vrednotili glede na kriterije predstavljene v *prilogi 1*.

#### 3.4.2.3.2 Natančnost metode med dnevi (vključuje tudi rigidnost)

Pripravili smo homogen vzorec 40 mg odmerka omeprazol kapsul v šestih paralelkah po postopku opisanem v poglavju 3.4.2.2 *Določanje vsebnosti vode v vzorcu*. Analizo smo izvedli na drug dan, kot natančnost metode znotraj enega dneva, in na drugi KF aparaturi. Izračunali smo RSD dobljenih vrednosti ( $n = 6$ ), RSD dobljenih vrednosti izmerjenih za natančnost znotraj enega dneva in med dnevi ( $n = 12$ ) in relativno spremembo povprečne vsebnosti vode med dnevoma. Dobljene rezultate smo nato vrednotili glede na kriterije predstavljene v *prilogi 1*. Za namene preverjanja točnosti in linearnosti metode smo iz rezultatov za natančnost metode med dnevoma izračunali tudi povprečno vsebnost vode v vzorcu, povprečno maso vzorca in povprečno porabo titranta.

#### 3.4.2.3.3 Linearnost metode

Za preverjanje linearnosti metode smo izvedli analize z vodnim standardom. Pri preverjanju linearnosti metode smo analize izvedli z vodnim standardom s koncentracijo 10,02 mg/g. Priprava se je zato razlikovala od postopka opisanega v poglavju 3.4.2.2 *Določanje vsebnosti vode v vzorcu*, saj pri tej določitvi nismo pripravili vzorca oz. smo namesto vzorca uporabili vodni standard. Določitev smo izvedli tako, da smo s pomočjo injekcijske brizge v titracijsko celico s topilom dodali ustrezne količine vodnega standarda. Za določanje linearnosti oz. umeritvene premice smo analize izvedli na masah dodanega vodnega standarda pri spodnji

limiti kvantifikacije (QL) 30 %, 80 %, 100 %, 120 % in 150 % glede na specifikacijsko mejo. Izbrani dodatki so bili v območju od 1,2 – 6,0 % vsebnosti vode. Vse meritve smo izvedli v treh paralelkah.

#### 3.4.2.3.4 Točnost metode

Za preverjanje točnosti metode smo meritve izvedli na vzorcu ob dodatku ustrezne količine vodnega standarda. Vzorec smo pripravili po postopku opisanem v poglavju 3.4.2.2 *Določanje vsebnosti vode v vzorcu*. Po dodatku vzorca v titracijsko celico smo dodali še ustrezno zatehto vodnega standarda in izvedli meritev. Dodali smo toliko vodnega standarda, da je količina ustrezala vrednosti QL (30 %), 100 % in 120 % specifikacijske meje. Analize smo izvedli v treh paralelkah. QL smo določili s poskušanjem in smo dvigovali količino dodanega vodnega standarda dokler izračunan izkoristek ni bil znotraj mej  $100 \pm 10$  %.

#### 3.4.2.3.5 Robustnost metode

Za preverjanje robustnosti metode smo vzorce pripravili po postopku, opisanem v poglavju 3.4.2.2 *Določanje vsebnosti vode v vzorcu* in variirali ( $\pm 50$  %) zatehto vzorca. Za posamezno zatehto vzorca smo analizo izvedli v treh paralelkah. Rezultate smo nato primerjali z vrednostmi izmerjenimi pri določanju natančnosti metode znotraj dneva (100 % zatehta). Iz dobljenih rezultatov smo izračunali RSD ( $n = 3, 6, 9$ ), interval zaupanja pri 95 % stopnji zaupanja in relativno spremembo povprečne vsebnosti glede na natančnost metode znotraj dneva.

### 3.4.3 Metoda UHPLC za določanje razkrojnih produktov

Za določanje razkrojnih produktov (RP) smo uporabili kromatografsko metodo UHPLC (tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti), ki je bila predhodno razvita v Leku. Posamezne spojine smo kromatografsko ločevali z gradientno elucijsko metodo na reverzni stacionarni fazi, pri čemer je pretok znašal 0,6 mL/min. Mobilni fazi A in B sta bili sestavljeni iz fosfatnega pufra s pH vrednostjo 7,2 in ACN v različnih razmerjih. Za separacijo smo uporabili kolono Waters Acquity BEH Shield RP18 ( $100 \times 2,1$  mm) z velikostjo delcev stacionarne faze 1,7  $\mu$ m. Kolona je bila termostatirana na 40 °C. Za injiciranje smo uporabili 5,0  $\mu$ L posameznega vzorca, ki je bil po pripravi in pred injiciranjem največ 52 minut shranjen v avtomatskem vzorčevalniku pri temperaturi 5 °C. Raztopine smo pripravljali zaščitene pred svetlobo. Eluirane spojine smo detektirali s TUV detektorjem (Waters ACQUITY Tunable UV detector) v UV in vidnem delu svetlobnega

spektra pri valovni dolžini 305 nm. Identifikacijo eluiranih spojin smo naredili s pomočjo primerjave retencijskih časov ( $t_R$ ) spojin v vzorcu in v identifikacijski raztopini. Pred analiziranjem vzorca smo preverili ustreznost kromatografskega sistema z injiciranjem topila, raztopine za preverjanje občutljivosti metode, raztopine standarda in resolucijske raztopine.

Za analizo smo na spodaj opisan način pripravili raztopine za preverjanje ustreznosti sistema, mobilni fazi A in B, topilo ter vzorec.

- Mobilni fazi A in B ter topilo:

Mobilna faza A in mobilna faza B sta bili sestavljeni iz fosfatnega pufru s pH vrednostjo 7,8 in ACN v naslednjih razmerjih:

- Mobilna faza A: pufer, pH = 7,8 : ACN = 90 : 10 (V/V)
- Mobilna faza B: pufer, pH = 7,8 : ACN = 25 : 75 (V/V)

Fosfatni pufer smo pripravili tako, da smo v 1000 mL dodatno prečiščene vode (DPV) natehtali ter raztopili 0,725 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  in 4,472 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . 250 mL dobljene raztopine smo nato redčili na 1000 mL z DPV in umerili z 1 M NaOH na pH vrednost  $7,8 \pm 0,05$ . Za topilo smo uporabili mešanico fosfatnega pufru s pH = 7,8 in ACN v volumskem razmerju 85 : 15.

- Osnovna standardna raztopina omeprazola (OSR):

V merilno bučko smo natehtali ustrezno količino delovnega standarda omeprazola, ga raztopili v topilu in dopolnili s topilom do oznake.

- Standardna raztopina omeprazola (ST 0,3 %):

Določen volumen OSR omeprazola smo redčili s topilom. Dobljeno raztopino smo naprej redčili s topilom. Pred injiciranjem na UHPLC smo dobljeno standardno raztopino še filtrirali. Koncentracija omeprazola v standardni raztopini je znašala 0,15 µg/mL.

- Raztopine nečistoč omeprazol N-oksida, omeprazola A in omeprazol benzimidazola

Identifikacijske standarde nečistoč smo zatehtali v merilne bučke. Dodali smo nekaj topila in raztopino izpostavili ultrazvoku za 5 minut. Nato smo merilne bučke dopolnili do oznake s topilom. Resolucijsko raztopino smo pripravili tako, da smo v merilno bučko odpipetirali ustrezen volumen posamezne raztopine nečistot in dopolnili s topilom do oznake

(koncentracija omeprazol *N*-oksid in omeprazol benzimidazola je znašala približno 0,4 µg/mL in omeprazola A približno 0,3 µg/mL).

- Standardna raztopina omeprazola 0,03 % (za preverjanje občutljivosti metode):  
Določen volumen 0,3 % standardne raztopine omeprazola smo redčili s topilom. Koncentracija omeprazola v raztopini je znašala 0,015 µg/mL.

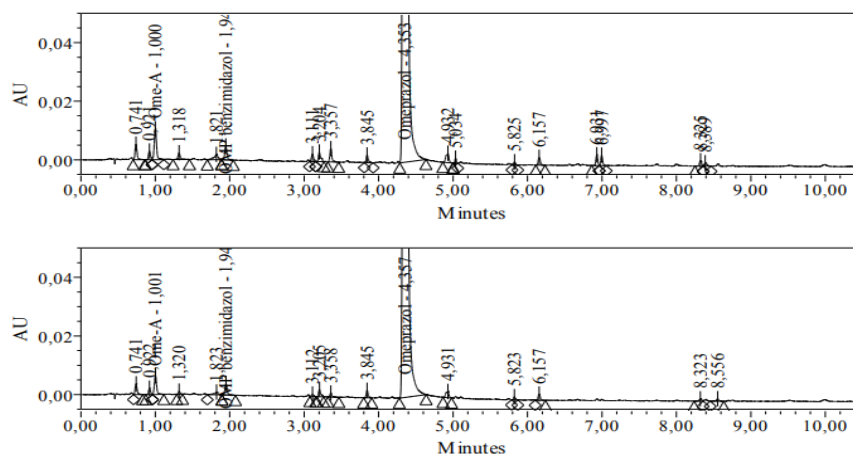
- Vzorec

Določili smo povprečno maso 20 kapsul. V merilno bučko smo natehtali maso pelet, ki je ustrezala 25 mg omeprazola in dopolnili s topilom do oznake. Raztopino vzorca smo za 5 minut izpostavili ultrazvoku, nato mešali z magnetnim mešalom 10 min ter nato ponovno izpostavili ultrazvoku za 10 minut. Raztopine vzorcev smo filtrirali v viala in jih naložili v avtomatski vzorčevalnik sistema UHPLC. Koncentracija omeprazola v pripravljene raztopini vzorca je znašala približno 0,5 mg/mL.

Gradient metode prikazuje preglednica VI, kromatograma posnetih vzorcev, posnetih z opisano metodo sta prikazana na sliki 4.

Preglednica VI: Gradient metode UHPLC za določanje razkrojnih produktov.

| Čas (min) | % MF A | % MF B |
|-----------|--------|--------|
| 0         | 95     | 5      |
| 0,5       | 95     | 5      |
| 8,5       | 30     | 70     |
| 9,0       | 10     | 90     |
| 10,0      | 10     | 90     |
| 10,5      | 95     | 5      |



**Slika 4:** Primer kromatogramov določanja RP 40 mg odmerka v pakiranju po 30 kapsul (spodaj) in 1000 kapsul (zgoraj) v plastenki. Vzorca sta bila shranjena 6 mesecev pri pogojih pospešenega testiranja stabilnosti.

### 3.4.4 Napovedovanje stabilnosti s pomočjo modeliranja podatkov pospešene stabilnosti in stresnih testov

#### **3.4.4.1 Sorpcijske izoterme za vlago**

Sorpcijske izoterme za vlago opisujejo razmerje med  $a_w$  snovi in ravnotežno sorbirano vodo. Za ugotovitev sorpcijskega obnašanja naših vzorcev smo vzorce kapsul vseh preiskovanih odmerkov odstranili iz primarne ovojnine in jih vstavili v komore s kontrolirano vlažnostjo pri sobni temperaturi (pribl. 22,5 °C). Želena vlažnost smo vzpostavili s pomočjo nasičenih raztopin soli LiCl, MgCl<sub>2</sub>, NaBr in NaCl (39). Skupaj z vzorci smo v komorah merili tudi temperaturo in RH. Izmerjene RH v komorah so znašale 16,3%, 36,4%, 58,4% in 72,7%. Vzorce smo v komorah pustili 25 dni ter jim nato izmerili  $a_w$  ter celokupno vsebnost vode s KF metodo po postopkih opisanih v poglavjih 3.4.1.2 in 3.4.2.2. Iz dobljenih rezultatov smo za preiskovane vzorce izdelali sorpcijske izoterme (linearen del) za vlago in jih predstavili na grafu kot vrednost celokupne vsebnosti vode v vzorcu KF (y os) v odvisnosti od  $a_w$  (x os). Za namene napovedovanja stabilnosti smo izdelali tudi skupno sorpcijsko izotermo za posamezen odmerek, kjer smo upoštevali tudi začetne rezultate in rezultate, pridobljene iz pospešenega testiranja stabilnosti. Sorpcijske izoterme za posamezne PS in ZU smo pridobili iz Lekove interne zbirke, ki so bile določene z metodo dinamične sorpcije vlage (*angl. dynamic vapor sorption*, DVS), ali iz literature.

#### **3.4.4.2 Izračun za napovedovanje dolgoročne stabilnosti**

V okviru magistrske naloge smo s pomočjo izračuna napovedali in ovrednotili kemijsko stabilnost izbranega izdelka. Excelov izračun je bil predhodno razvit v Leku na podlagi teorije iz literature in predstavlja simulacijo kinetike sorpcije vlage, ki temelji na prilagojeni Arrheniusovi enačbi s členom za vlago, permeabilnosti vlage skozi ovojnino in opisu porazdelitve vlage med komponentami v FO s pomočjo sorpcijskih izoterm za vlago. Simulacija porazdelitve vlage med komponentami v FO, znotraj semi-permeabilnega vsebnika, in vlago, ki preide v vsebnik skozi ovojnino, temelji na principu sorpcijsko-desorpcijskega prenosa vlage (41). Dodatno Excelov izračun omogoča napovedovanje kemijske degradacije za rok uporabnosti. Napovedovanje kemijske degradacije temelji na prilagojeni Arrheniusovi enačbi s členom za vlago (enačba 3) (42). Ob poznavanju permeabilnosti vlage skozi ovojnino in sorpcijskega obnašanja komponent lahko s pomočjo prilagojene Arrheniusove enačbe s členom za vlago (enačba 3) napovemo stabilnost FO kot funkcije temperature in RH. Za napovedovanje kemijske stabilnosti smo v Excelov izračun

vnesli podatke pridobljene s testiranjem pospešene stabilnosti ter stresnimi testi, in sicer čas (dni), temperaturo (K), RH (%) in % RP. Za napovedovanje kemijske stabilnosti znotraj za vlago prepustne ovojnine potrebujemo podatke o sorpcijskih izotermah za vse komponente oz. združeno sorpcijsko izotermo FO, začetno maso in vlago za komponente ter podatke o prepustnosti ovojnine za vlago. S temi podatki lahko s programom izračunamo naraščanje RP (%) skozi čas pri pogojih dolgoročne stabilnosti za rok uporabnosti.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 Razvoj metode za KF titracijo

Za določitev vsebnosti vode v peletah z ZU omeprazol smo najprej razvili in validirali KF metodo, da bi potrdili ustreznost razvite metode za namen uporabe. Pri razvoju metode smo upoštevali naslednje parametre:

- Titrant:

Na razpolago smo imeli enokomponentna reagenta Hydranal Composite 2, ki je primeren za vsebnosti vode manjše od 1000 ppm, in Hydranal Composite 5, ki je primeren za vsebnosti vode od 1000 ppm do 100 %. Titranti pri enokomponentnih reagentih vsebujejo jod, SO<sub>2</sub>, imidazol in metanol, pri titraciji pa se kot topilo uporabi ustrezen alkohol – metanol. Imeli smo določeno specifikacijsko mejo za vsebnost vode pri IPS, ki znaša  $\leq 4,0$  %, zato smo se odločili za izvedbo analiz s Hydranal Composite 5 titrantom.

- Topilo:

Najprej smo poskusili izvesti titracijo v brezvodnem metanolu kot topilu. Ugotovili smo, da se pelete oz. peletni prah zelo slabo topi v metanolu ter se zato voda počasi sprošča iz vzorca. Hitrejše raztapljanje peletnega prahu smo dobili v mešanici brezvodnega metanola in formamida v volumskem razmerju 1 : 1. Kljub temu pa je bilo raztapljanje v tem topilu še vedno dokaj počasno, zato smo izbrali ekstrakcijski čas 300 s, da se je vzorec raztopil. V titracijski celici smo s pH lističi preverili tudi pH titracijskega medija pred in po titraciji. Izmerjena pH vrednost v obeh primerih je znašala 5,5, kar ustreza optimalnemu območju pH med 5 in 8.

- Priprava vzorca:

Pri pripravi vzorca smo ugotovili, da pelete tudi v mešanici brezvodnega metanola in formamida v volumskem razmerju 1 : 1 niso dovolj topne. Zato smo se odločili, da bomo analize izvajali na peletnem prahu, ki smo ga pripravili tako, da smo ustrezno količino pelet tik pred analizo uprašili v terilnici s pestilom. Da bi preverili vpliv sobne RH na navlažitev vzorcev med pripravo, smo izvedli pripravo pri sobnih pogojih (RH  $\approx 60$  %) in pri pogojih v suhi klimi (RH  $< 15$  %). Ugotovili smo, da sta rezultata v obeh primerih primerljiva in tako sobna RH ne vpliva na navlažitev vzorcev pri sprotni pripravi vzorcev.

- Ekstrakcijski čas:

Iz vrednosti za napetost [mV] smo opazili, da se večina vode sprosti iz vzorca po približno 120 sekundah. Zato smo se odločili, da bi meritvah uporabimo ekstrakcijski čas 300 sekund.

○ Zatehta vzorca:

Pri poskusnem analiziranju vzorca smo v titracijsko celilo prenesli približno 350 – 400 mg vzorca, uprašenih pelet. Za visoko stopnjo natančnosti je priporočljivo, da je poraba titranta med 30 % in 70 % nominalnega volumna birete. V našem primeru, ker smo uporabili 5 mL bireto, je tako priporočeno, da volumen porabe titranta znaša med 1,5 mL in 3,5 mL. Poraba titranta pri poskusni analizi je znašala 2,4165 mL, kar je ravno na sredini priporočene porabe in zato smo se odločili, da za analize uporabimo zatehto vzorca približno 350 mg. Rezultati začetne meritve vsebnosti vode v vzorcu z razvito metodo so zbrani v preglednici VII.

Preglednica VII: Rezultati začetne meritve vsebnosti vode v peletah z razvito metodo.

| $m_{\text{vzorec}}$ [g] | ekstrakcijski čas [s] | $c_{\text{titrant}}$ [mg/mL] | $V_{\text{titranta}}$ [mL] | $t_{\text{titracije}}$ [s] | Vsebnost vode [%] |
|-------------------------|-----------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------|
| 0,35877                 | 300                   | 5.25364                      | 2,2373                     | 456                        | 3,276             |

Iz izmerjenih rezultatov je razvidno, da je izbira titranta Hydranal Composite 5 ustrezna, saj so izmerjene vrednosti za vsebnost vode v vzorcu večje od 2,0 %. Največjo težavo je predstavljalo dejstvo, da je vzorec slabo topen v metanolu. Želeli smo se izogniti uporabi formamida, ki je kancerogen in zdravju škodljiv, kar pa ni bilo mogoče. Z uporabo mešanice metanol : formamid = 1 : 1 in s pomočjo trenja pelet v fin prah smo izboljšali topnost vzorca, kar je bilo razvidno iz titracijske krivulje. Kljub temu se je voda ekstrahirala iz vzorca do pribl. 120 s, zato smo uporabili ekstrakcijski čas 300 s. Poskusili smo tudi podaljšati ekstrakcijski čas na 600 s. Videli smo, da pri tem ni signifikantnih sprememb, zato smo pustili ekstrakcijski čas na 300 s, ter tako zmanjšali čas, potreben za analizo vzorca.

## 4.2 Validacija KF metode za določanje vsebnosti vode

Razvito metodo (poglavje 3.4.2.2) smo validirali kot je predstavljeno v poglavju 3.4.2.3. Pridobljene rezultate smo nato vrednotili skladno z Lekovimi predpisi predstavljenimi v prilogi 1.

### 4.2.1 Natančnost metode znotraj dneva (ponovljivost)

Preglednica VIII prikazuje rezultate meritev preverjanja natančnosti metode znotraj dneva.

Preglednica VIII: Prikaz rezultatov meritev preverjanja natančnosti metode znotraj dneva.

| Vzorec - A (paralelka)                                            | Izmerjena vsebnost vode [%] |
|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| 1                                                                 | 3,321                       |
| 2                                                                 | 3,276                       |
| 3                                                                 | 3,302                       |
| 4                                                                 | 3,333                       |
| 5                                                                 | 3,319                       |
| 6                                                                 | 3,266                       |
| Povprečje [%]                                                     | 3,303                       |
| SD [%]                                                            | 0,027                       |
| RSD [%]                                                           | 0,81                        |
| 95 % interval zaupanja: $n = 6$ :<br>$t_{tab}(0,05, n-1) = 2,571$ | 3,234 – 3,372               |

Iz izmerjenih rezultatov smo izračunali povprečno vsebnost vode v vzorcu, ki je znašala 3,303 %. Nato smo preverili, ali naši rezultati ustrezajo zahtevam, predstavljenim v prilogi 1. Izračunan RSD 6 paralelk je znašal 0,81 %, kar ustreza zahtevanemu pogoju  $RSD \leq 5 \%$  za nivo vsebnosti vode 2 – 5 %. Preverili smo še, da so vse izmerjene vrednosti znotraj 95 % intervala zaupanja, ki znaša 3,234 – 3,372 %. Tako lahko trdimo, da je razvita KF metoda, glede na kriterije za ponovljivost, natančna.

### 4.2.2 Natančnost metode med dnevi (vključuje tudi rigidnost)

Preglednica IX prikazuje rezultate meritev preverjanja natančnosti metode med dnevi. Natančnost metode med dnevi smo preverili tako, da smo na drug dan kot natančnost metode znotraj dneva, izvedli analize vzorca v šestih paralelkah. Pri preverjanju te karakteristike je vključeno tudi preverjanje rigidnosti metode, saj smo analizo izvajali na drugem KF instrumentu. Vse izračune smo vrednotili glede na zahteve predstavljene v prilogi 1. Iz izmerjenih rezultatov smo izračunali povprečno vsebnost vode 6 izmerjenih paralelk, ki je

znašala 3,220 % ter RSD, ki je znašal 0,62 %, kar ustreza zahtevanemu pogoju  $RSD \leq 5 \%$  za vsebnost vode 2 – 5 %. Rezultate smo nato primerjali z rezultati, dobljenimi pri preverjanju natančnosti metode znotraj dneva in izračunali relativno razliko, ki je znašala -2,508 %, kar ustreza kriteriju  $\leq \pm 8 \%$  za vsebnost vode 2 – 5 %.

Preglednica IX: Prikaz rezultatov meritev preverjanja natančnosti metode med dnevi.

| Vzorec (paralelka)                                                | Izmerjena vsebnost vode [%] |       |
|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-------|
|                                                                   | A                           | B     |
| 1                                                                 | 3,321                       | 3,232 |
| 2                                                                 | 3,276                       | 3,234 |
| 3                                                                 | 3,302                       | 3,200 |
| 4                                                                 | 3,333                       | 3,192 |
| 5                                                                 | 3,319                       | 3,220 |
| 6                                                                 | 3,266                       | 3,242 |
| Povprečje [%]                                                     | 3,303                       | 3,220 |
| SD [%]                                                            | 0,027                       | 0,020 |
| RSD [%]                                                           | 0,81                        | 0,62  |
| Relativna razlika [%]                                             | -2,508                      |       |
| Skupno povprečje [%]                                              | 3,261                       |       |
| SD [%]                                                            | 0,049                       |       |
| RSD [%]                                                           | 1,50                        |       |
| 95 % interval zaupanja: $n = 6$ :<br>$t_{tab}(0,05, n-1) = 2,571$ | 3,154 – 3,369               |       |

Izračunali smo še skupno povprečje vseh 12 meritev, ki je znašalo 3,261 %, ter RSD za 12 meritev, ki je znašal 1,50 %, kar ustreza pogoju  $\leq 8 \%$  za nivo vsebnosti vode 2 – 5 %. Preverili smo še, da so vse izmerjene vrednosti znotraj 95 % intervala zaupanja, ki znaša 3,154 – 3,369 %. Tako lahko zaključimo, da je razvita analitska metoda, glede na kriterije za natančnost metode med dnevi, natančna in rigidna.

Za namene preverjanja točnosti in linearnosti metode smo iz rezultatov za natančnost metode med dnevoma izračunali tudi povprečno vsebnost vode v vzorcu 3,261 %, povprečno maso vzorca 368,78 mg in povprečno porabo titranta, ki je znašala 2,261 mL.

### 4.2.3 Linearnost metode

Pred začetkom izvajanja analiz smo izračunali približne vrednosti zateht vodnega standarda, tako da smo zajeli območje vsebnosti vode 1,2 – 6,0 % oz. od QL do 150 % informativne specifikacijske meje za vsebnost vode (4,0 %). Koncentracija vodnega standarda je znašala 10,02 mg/g. Analize smo izvedli v treh paralelkah. Po izračunih predstavljenih v poglavju 3.4.2.3 smo nato izračunali zatehtano vodo in % vode glede na maso vzorca. % vode glede na maso vzorca smo izračunali po enačbi 7:

$$\% \text{ vode glede na maso vzorca} = \frac{\text{zatehtana voda [mg]}}{\text{povprečna masa vzorca (znotraj dneva) [mg]}} \cdot 100$$

Enačba 7: Izračun % vode glede na maso vzorca.

ter maso dodane vode po enačbi 8:

$$\text{masa dodane vode [mg]} = \frac{\text{masa vodnega standarda [mg]} \cdot \text{konc. vodnega standarda} \left[\frac{\text{mg}}{\text{g}}\right]}{1000 \left[\frac{\text{mg}}{\text{g}}\right]}$$

Enačba 8: Izračun mase dodane vode.

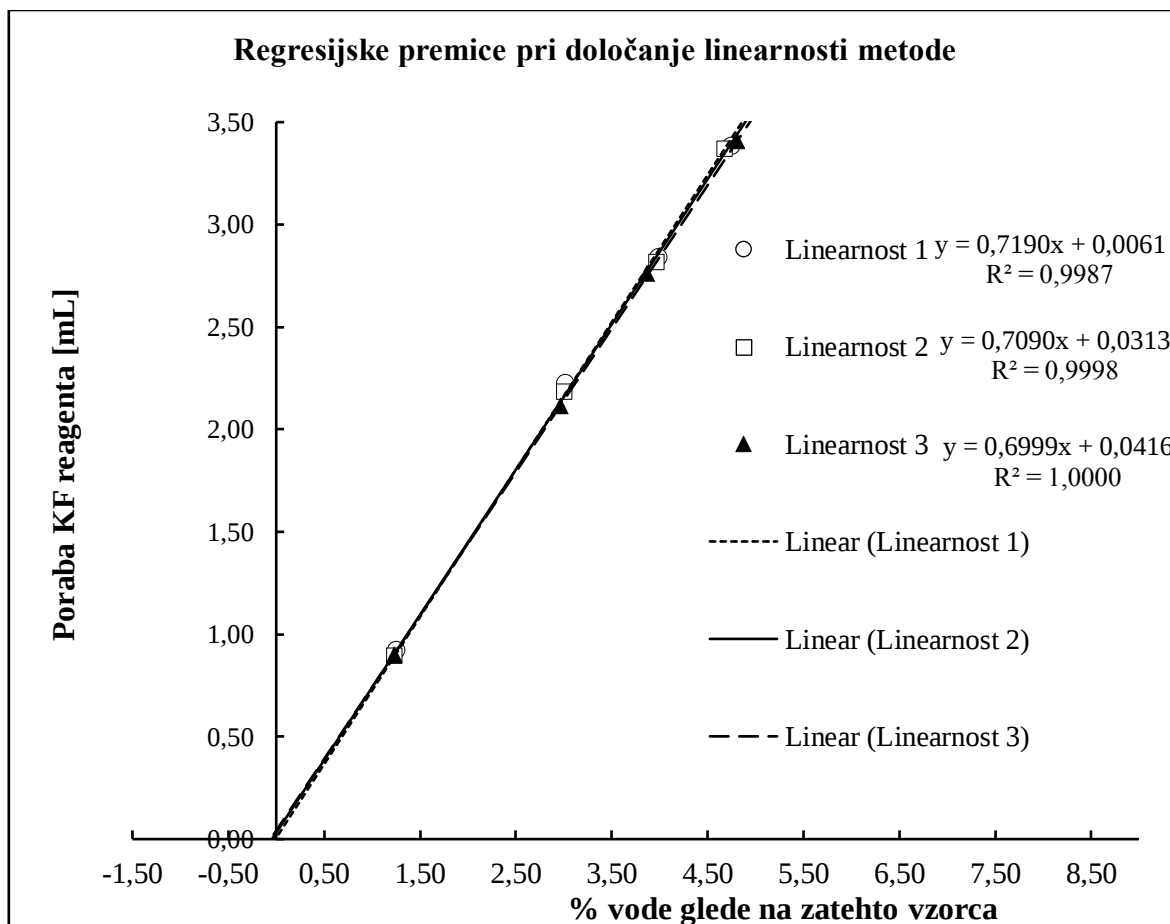
Iz izvedenih meritev smo dobili tudi porabo KF reagenta. Rezultati in meritve so predstavljene v preglednici X.

Preglednica X: Rezultati meritev za preverjanje linearnosti metode KF za določanje vsebnosti vode.

| Paralelka 1           |                                    |                         | Paralelka 2           |                                    |                         | Paralelka 3           |                                    |                         |
|-----------------------|------------------------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------------------|-------------------------|
| Masa dodane vode [mg] | % vode glede na povprečno m vzorca | Poraba KF reagenta [mL] | Masa dodane vode [mg] | % vode glede na povprečno m vzorca | Poraba KF reagenta [mL] | Masa dodane vode [mg] | % vode glede na povprečno m vzorca | Poraba KF reagenta [mL] |
| 4,64                  | 1,26                               | 0,916                   | 4,52                  | 1,23                               | 0,894                   | 4,53                  | 1,23                               | 0,898                   |
| 11,13                 | 3,02                               | 2,220                   | 11,07                 | 3,00                               | 2,183                   | 10,92                 | 2,96                               | 2,111                   |
| 14,70                 | 3,99                               | 2,834                   | 14,60                 | 3,96                               | 2,816                   | 14,25                 | 3,86                               | 2,759                   |
| 17,57                 | 4,76                               | 3,377                   | 17,26                 | 4,68                               | 3,366                   | 17,72                 | 4,81                               | 3,403                   |
| 22,02                 | 5,97                               | 4,346                   | 21,93                 | 5,95                               | 4,242                   | 21,77                 | 5,90                               | 4,167                   |

Linearnost smo opredelili tako, da smo s pomočjo linearne regresije odzivov vodnega standarda določili umeritveno premico, ki opisuje odnos med porabo KF reagenta in % vode glede na maso vzorca. Iz dobljenega determinacijskega koeficienta ( $R^2$ ) smo izračunali  $R^2$

vrednost za vse 3 premice. Vrednosti so ustrezale pogoju  $R^2 \geq 0,98$ , saj je  $R^2$  prve premice znašal 0,9994, druge 0,9999 in tretje 1,0000. Premice so predstavljene na sliki 5. Izračunali smo še presečišča z y-osjo, ki so znašala 0,18 %, 0,93 % in 1,23 %, kar ustreza pogoju  $\pm 25$  % za odstop odseka na y-osi glede na specifikacijsko mejo.



**Slika 5:** Prikaz regresijskih premic za določanje linearnosti metode.

Po vrednotenju dobljenih rezultatov glede na kriterije navedene v *prilogi 1* lahko zaključimo, da je analizna metoda linearna med 1,2 % in 6,0 % vsebnosti vode.

#### 4.2.4 Točnost metode

Za preverjanje točnosti metode smo po dodatku vzorca v titracijsko celico dodali še znano količino vodnega standarda, ki je ustrezala 30 %, 100 % in 120 % specifikacijske vrednosti za vsebnost vode (4,0 %). Dodano vodo smo nato izračunali s pomočjo mase dodane vode in zatehte vzorca po enačbi:

$$\text{dodana voda [\%]} = \frac{\text{masa dodane vode [mg]}}{\text{masa vzorca [mg]}} \cdot 100$$

Enačba 9: Izračun dodane vode za preverjanje točnosti KF metode

Rezultati preverjanja točnosti so predstavljeni v preglednici XI.

Preglednica XI: Rezultati preverjanja točnosti metode za določanje vode KF.

| Masa dodane vode [mg]    | Masa vzorca [mg] | Izmerjen % vode v vzorcu (s standardom) | Izmerjena voda [%] | Dodana voda [%]             | Izkoristek [%] |
|--------------------------|------------------|-----------------------------------------|--------------------|-----------------------------|----------------|
| 4,59                     | 353,10           | 4,624                                   | 1,363              | 1,299                       | 104,93         |
| 14,54                    | 347,05           | 7,440                                   | 4,179              | 4,189                       | 99,76          |
| 17,82                    | 349,24           | 8,376                                   | 5,115              | 5,102                       | 100,25         |
| <b>Paralelka 1</b>       |                  | <b>x (n = 3) = 101,65 %</b>             |                    | <b>RSD (n = 3) = 2,80 %</b> |                |
| 4,51                     | 360,46           | 4,552                                   | 1,291              | 1,250                       | 103,28         |
| 14,29                    | 350,05           | 7,411                                   | 4,150              | 4,084                       | 101,62         |
| 17,75                    | 347,88           | 8,454                                   | 5,193              | 5,102                       | 101,78         |
| <b>Paralelka 2</b>       |                  | <b>x (n = 3) = 102,23 %</b>             |                    | <b>RSD (n = 3) = 0,90 %</b> |                |
| 4,64                     | 349,82           | 4,557                                   | 1,296              | 1,327                       | 97,66          |
| 14,29                    | 348,86           | 7,450                                   | 4,189              | 4,097                       | 102,25         |
| 17,81                    | 353,41           | 8,442                                   | 5,181              | 5,040                       | 102,80         |
| <b>Paralelka 3</b>       |                  | <b>x (n = 3) = 100,90 %</b>             |                    | <b>RSD (n = 3) = 2,79 %</b> |                |
| <b>Skupni izkoristek</b> |                  | <b>x (n = 9) = 101,59 %</b>             |                    | <b>RSD (n = 9) = 2,11</b>   |                |

S pomočjo povprečne vsebnosti vode (3,261 %), pridobljene pri preverjanju natančnosti metode med dnevi (n = 12) in rezultatov, pridobljenih pri analizi vzorcev ob dodatku znane količine vodnega standarda, smo za določanje točnosti izračunali izmerjeno vodo po enačbi 10:

$$\text{izmerjena voda [\%]} = \% \text{ vode v vzorcu z dodatkom standarda} - \% \text{ vode v vzorcu (n = 12)}$$

Enačba 10: Izračun izmerjene vode pri preverjanju točnosti metode.

Iz izračunanih vrednosti za izmerjeno in dodano vodo smo nato izračunali še izkoristek po enačbi 11:

$$\text{izkoristek [\%]} = \frac{\text{dodana voda [\%]}}{\text{izmerjena voda [\%]}} \cdot 100$$

Enačba 11: Izračun izkoristka za dodano vodo k vzorcu pri preverjanju točnosti metode

Izračunali smo RSD meritev in rezultate vrednotili glede na kriterije, predstavljene v *prilogi 1*. Dobljeni rezultati v preglednici XI ustrezajo pogoju za povprečni izkoristek paralelke ( $n = 3$ ) v območju med 90 % in 110 % in  $\text{RSD} (n = 3) \leq 10 \%$  za nivo vsebnosti vode 0,6 – 5 %. S pomočjo povprečnega izkoristka, izračunanega glede na koncentracijo ( $n = 3$ ), SD in  $t_{\text{tab}}$  smo izračunali še 95 % intervale zaupanja in ugotovili, da so vsi rezultati znotraj omenjenega intervala zaupanja. Rezultati so predstavljeni v preglednici XII. Glede na vrednotene parametre lahko zaključimo, da je razvita KF metoda za določanje vsebnosti vode točna.

Preglednica XII: Izračunani rezultati za vrednotenje točnosti metode.

| Koncentracijski nivo <sup>1</sup> | Povprečni izkoristek (x) [%] (n = 3) | SD [%] (n = 3) | RSD [%] (n = 3) | $t_{\text{tab}} (n=3): 4,303$ |                    |
|-----------------------------------|--------------------------------------|----------------|-----------------|-------------------------------|--------------------|
|                                   |                                      |                |                 | $x - (t \times s)$            | $x + (t \times s)$ |
| 30 %                              | 101,96                               | 3,81           | 3,74            | 85,57                         | 118,35             |
| 100 %                             | 101,21                               | 1,29           | 1,27            | 95,66                         | 106,76             |
| 120 %                             | 101,61                               | 1,28           | 1,26            | 96,10                         | 107,12             |

#### 4.2.5 Robustnost metode

Robustnost metode smo preverjali z variacijo mase  $\pm 50 \%$  glede na maso uporabljeno pri analizah. Vzorce s 50 % in 150 % maso smo analizirali v treh paralelkah in jih primerjali z rezultati pridobljenimi pri preverjanju natančnosti metode znotraj dneva ( $n = 6$ ). Rezultate smo nato vrednotili glede na kriterije v *prilogi 1*. Rezultati preverjanja robustnosti metode so predstavljeni v preglednici XIII.

Iz izmerjenih rezultatov smo izračunali povprečno vsebnost vode v vzorcu za 50 % zatehto, ki je znašala 3,259 % in RSD 2,53 % ter povprečno vsebnost vode za 150 % zatehto, ki je znašala 3,295 in RSD 0,92 %. Obe vrednosti RSD sta bili  $\leq 5 \%$  in tako ustrezata pogoju. Rezultate smo nato primerjali z rezultati pridobljenimi pri preverjanju natančnosti znotraj dneva. Relativna razlika 50 % zatehte vzorca je znašala -1,317 % ter 150 % zatehte -0,237

---

<sup>1</sup> Vrednost dodanega vodnega standarda, glede na specifikacijsko mejo.

%, kar ustreza pogoju  $\leq 8$  %. Izračunali smo še povprečne vsebnosti vode in RSD za 50 % in 100 % zatehte ( $n = 9$ ) ter 100 % in 150 % zatehte ( $n = 9$ ). RSD vrednosti sta znašali 1,56 % in 0,80 %, kar ustreza kriteriju  $\leq 8$  % za vsebnost vode v vzorcu 2 – 5 %. Prav tako smo preverili, da so vse izmerjene vrednosti znotraj 95 % intervala zaupanja. Iz dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da je metoda robustna na spremembo mase  $\pm 50$  % (tj. 175 mg – 525 mg).

Preglednica XIII: Rezultati preverjanja robustnosti KF metode za določanje vsebnosti vode.

| Vzorec                                                                                                  | Vsebnost vode v vzorcu |                                               |                      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|-----------------------------------------------|----------------------|
|                                                                                                         | 50 % zatehta vzorca    | 100 % zatehta vzorca (meritve: znotraj dneva) | 150 % zatehta vzorca |
| 1                                                                                                       | 3,178                  | 3,266                                         | 3,277                |
| 2                                                                                                       | 3,343                  | 3,319                                         | 3,278                |
| 3                                                                                                       | 3,257                  | 3,333                                         | 3,330                |
| 4                                                                                                       |                        | 3,302                                         |                      |
| 5                                                                                                       |                        | 3,276                                         |                      |
| 6                                                                                                       |                        | 3,321                                         |                      |
| <b>Povprečje [%]</b>                                                                                    | 3,259                  | 3,303                                         | 3,295                |
| <b>SD [%]</b>                                                                                           | 0,083                  | 0,027                                         | 0,030                |
| <b>RSD [%]</b>                                                                                          | 2,53                   | 0,81                                          | 0,92                 |
| <b>95 % interval zaupanja</b> ( $n = 6$ , $t_{\text{tab}}$ : 2,571; $n = 3$ , $t_{\text{tab}}$ : 4,303) | 2,904 – 3,614          | 3,234 – 3,372                                 | 3,165 – 3,425        |
| <b>Relativna razlika [%]</b>                                                                            | -1,317                 |                                               | -0,237               |
| <b>Povprečje (<math>n = 9</math>) [%]</b>                                                               | 3,288                  |                                               | 3,300                |
| <b>SD [%]</b>                                                                                           | 0,051                  |                                               | 0,026                |
| <b>RSD (<math>n = 9</math>) [%]</b>                                                                     | 1,56                   |                                               | 0,80                 |
| <b>95 % interval zaupanja</b> ( $n = 9$ , $t_{\text{tab}}$ : 2,306)                                     | 3,170 – 3,406          |                                               | 3,240 – 3,361        |

### 4.3 Validacija metode za določanje vodne aktivnosti

Tudi v primeru določanja  $a_w$  smo najprej morali razviti ustrezno metodo. Ker je sama tehnika merjenja  $a_w$  dokaj preprosta, je edina možna spremenljivka na napravi temperatura merjenja. Priporočila proizvajalca aparature so, da se merjenje izvaja čim bližje sobni temperaturi, zato smo se odločili, da bomo merili  $a_w$  vzorcem pri  $T = 22,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Metodo smo nato validirali skladno z Lekovimi internimi predpisi. Rezultate smo vrednotili skladno s kriteriji, predstavljenimi v *prilogi 2*.

#### 4.3.1 Natančnost metode znotraj dneva

Preglednica XIV prikazuje rezultate meritev znotraj dneva in natančnost metode med dnevi. Preglednica XIV: Rezultati preverjanja natančnosti metode  $a_w$  znotraj dneva in med dnevi.

| Vzorec (paralelka)                                                 | Izmerjena $a_w$   |                 |
|--------------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------|
|                                                                    | A (znotraj dneva) | B (med dnevi)   |
| 1                                                                  | 0,4413            | 0,4449          |
| 2                                                                  | 0,4383            | 0,4475          |
| 3                                                                  | 0,4344            | 0,4386          |
| 4                                                                  | 0,4371            | 0,4403          |
| 5                                                                  | 0,4350            | 0,4364          |
| 6                                                                  | 0,4349            | 0,4381          |
| Povprečje                                                          | 0,4368            | 0,4410          |
| SD                                                                 | 0,0027            | 0,0043          |
| RSD [%]                                                            | 0,61              | 0,98            |
| Absolutna razlika                                                  | 0,0041            |                 |
| Skupno povprečje                                                   | 0,4389            |                 |
| SD                                                                 | 0,0040            |                 |
| RSD [%]                                                            | 0,92              |                 |
| 95 % interval zaupanja: $n = 6$ :<br>$t_{tab}(0,05, n-1) = 2,571$  | 0,4300 – 0,4437   | 0,4299 – 0,4521 |
| 95 % interval zaupanja: $n = 12$ :<br>$t_{tab}(0,05, n-1) = 2,201$ | 0,4300 – 0,4478   |                 |

Iz izmerjenih rezultatov smo izračunali povprečno  $a_w$  0,4368 in RSD meritev 0,61 %, kar ustreza zahtevi predstavljeni  $\leq 10\%$ . Preverili smo, da so vse izmerjene vrednosti znotraj 95 % intervala zaupanja, ki znaša 0,4300 – 0,4437. Zaključimo lahko, da je metoda glede na kriterije za ponovljivost, natančna.

#### 4.3.2 Natančnost metode med dnevi

Preglednica XIV prikazuje tudi meritve preverjanja natančnosti metode med dnevi. Natančnost metode med dnevi smo preverili tako, da smo na drug dan kot natančnost metode znotraj dneva, izvedli analize vzorca v šestih paralelkah. Analize smo izvedli na drugi aparaturi in tako preverili tudi rigidnost metode. Iz izmerjenih vrednosti smo najprej izračunali vrednost RSD ( $n = 6$ ), ki je znašala 0,98 %, kar ustreza pogoju  $\leq 10$  %. Iz povprečnih vrednosti za oba seta rezultatov smo izračunali absolutno razliko, ki je znašala 0,0041, kar ustreza pogoju  $\leq 0,05$ . Tudi RSD vseh 12 meritev je ustrezal kriteriju. Preverili smo še, da so vse izmerjene vrednosti znotraj 95 % intervala zaupanja ( $n = 6$  oz. 12).

#### 4.3.3 Točnost metode

Točnost metode smo preverili v treh paralelkah na vzorcu, ki smo ga predhodno navlažili pri 60 % RH. Po 7. dneh na pogoju 25 °C/60 % RH smo vzorce analizirali. Rezultati so zbrani v preglednici XV.

Preglednica XV: Rezultati preverjanja točnosti metode za merjenje  $a_w$ .

| Vzorec (paralelka) | Teoretična $a_w$ | Izmerjena $a_w$ | Absolutna razlika | Izkoristek [%] |
|--------------------|------------------|-----------------|-------------------|----------------|
| 1                  | 0,6000           | 0,5654          | 0,0346            | 94,23          |
| 2                  | 0,6000           | 0,5649          | 0,0351            | 94,15          |
| 3                  | 0,6000           | 0,5636          | 0,0364            | 93,93          |

Izračunali smo absolutno razliko med teoretično in izmerjeno vrednostjo. Rezultati so bili ustrezni, saj so vse vrednosti  $\leq 0,05$ . Izračunali smo posamezne izkoristke, ki ustrezajo kriteriju in so v območju 91,0 – 109,0 % in RSD, ki je znašal 0,17 %. Preverili smo, da so vsi izkoristki znotraj 95 % intervala zaupanja, 93,41 – 94,79 %. Zaključimo lahko, da rezultati potrjujejo točnost metode.

#### 4.3.4 Robustnost metode

Robustnost metode smo preverili z variacijo temperature merjenja. Vrednosti izmerjene pri priporočni temperaturi 22,5 °C smo primerjali z vrednostmi izmerjenimi pri 20 °C in 25 °C. Rezultati so predstavljeni v preglednici XVI.

Preglednica XVI: Rezultati preverjanja robustnosti metode za merjenje  $a_w$ .

| Vzorec (paralelka)                                             | T = 22,5 °C | T = 20 °C       | T = 25 °C       |
|----------------------------------------------------------------|-------------|-----------------|-----------------|
| 1                                                              | 0,4413      | 0,4352          | 0,4353          |
| 2                                                              | 0,4383      | 0,4349          | 0,4330          |
| 3                                                              | 0,4344      | 0,4389          | 0,4327          |
| Povprečje (n = 3)                                              | 0,4380      | 0,4363          | 0,4337          |
| RSD (n = 3)                                                    | 0,80        | 0,50            | 0,32            |
| Povprečje (n = 6)                                              |             | 0,4372          | 0,4358          |
| RSD (n = 6)                                                    |             | 0,64            | 0,78            |
| Absolutna sprememba                                            |             | 0,0017          | 0,0043          |
| 95 % interval zaupanja:<br>n = 6: $t_{tab}(0,05, n-1) = 2,571$ |             | 0,4300 – 0,4444 | 0,4271 – 0,4445 |

Iz izmerjenih vrednosti smo nato izračunali povprečja in RSD (n = 3) meritev pri eni temperaturi. Nato smo izračunali še skupno povprečje in RSD meritev pri T = 22,5 °C in T = 20 °C oziroma T = 22,5 °C in T = 25 °C (n = 6). Izračunali smo še absolutno spremembo meritev pri 20 °C in 25 °C glede na priporočeno temperaturo merjenja 22,5 °C. Vrednosti, ki so predstavljene v preglednici XVI, ustrezajo kriterijem, predstavljenim v prilogi 2. Preverili smo, da so izmerjene vrednosti znotraj 95 % intervala zaupanja.

Z izvedenimi poskusi smo potrdili ustreznost metode za določanje  $a_w$  v peletah. Vsi preučevani parametri ustrezajo kriterijem predstavljenim v prilogi 2.

#### 4.4 Vpliv vlage na kemijsko stabilnost omeprazola v kapsulah z zakasnelim sproščanjem

Skozi obdobje testiranja pospešene stabilnosti, smo vodo v vzorcih določali na dva različna načina, in sicer s KF titracijo in določanjem  $a_w$ . Preverili smo vpliv pogojev pospešenega testiranja stabilnosti (40 °C/ 75 % RH) na vsebnost vode v vzorcih in ovrednotili vpliv števila kapsul v enoti ovojnine (HDPE plastenke z 30 ali 1000 kapsul) ter vpliv odmerka učinkovine v kapsuli (10, 20 in 40 mg) na porast vsebnosti vode skozi obdobje pospešenega testiranja stabilnosti. Za 10 mg odmerek z ZU proizvajalca 1 smo preverili, kako vpliva dodatno sušenje kapsul pred pakiranjem na vsebnost vode v vzorcu in kemijsko stabilnost FO. Pri tem odmerku smo preverili tudi vpliv higroskopnosti ZU proizvajalcev 1 in 2 na kemijsko

stabilnost FO. Vsebnost vode v vzorcih smo pomerili na začetku, preden so bili pakirani v plastenke in nato po 3 in 6 mesecih pospešenega testiranja stabilnosti. Pri nekaterih vzorcih smo dodatno določili vsebnost vode tudi po 1, 2 in nato še po 9 in 12 mesecih na pogoju 40 °C/75 % RH. Vsi vzorci so bili analizirani najkasneje 1 mesec po datumu vzorčenja.

#### 4.4.1 Vpliv števila kapsul v ovojnini na vsebnost vode in vodno aktivnost

Vsebnost vode KF in  $a_w$  smo določili peletam, ki so bile polnjene v HGC in pakirane v različno velike HDPE plastenke. Plastenke so vsebovale po 30 ali 1000 kapsul in ustrezno količino silikagela (preglednica V) in bile izpostavljene pogojem pospešenega testiranja stabilnosti za 6 mesecev. V primeru, ko smo imeli na razpolago dovolj vzorca, smo vzorce pustili na staranju pri pogojih pospešenega testiranja stabilnosti še do 9 in 12 mesečnega termina. Plastenke se razlikujejo po volumnu in večji kot je odmerek, večje so kapsule in večje kot je število kapsul v plastenki, večji je volumen plastenke (preglednica V). Količina sušilnega sredstva na kapsulo v večjih in manjših plastenkah se razlikuje (33,3 mg oz. 66,6 mg/kapsulo v manjših plastenkah in 10 mg oz. 20 mg/kapsulo v večjih plastenkah - preglednica V). Prav tako večje plastenke, zaradi večje površine, prepustijo več vlage kot manjše plastenke iz enakega materiala. Glede na to smo pričakovali različen porast vlage v različno velikih plastenkah.

Vpliv števila kapsul v ovojnini na vsebnost vode smo določali peletam treh različnih odmerkov z ZU proizvajalca 1. Rezultati so zbrani v preglednicah XVII - XVIII in predstavljeni na sliki 6 (spreminjanje  $a_w$  v odvisnosti od časa). Iz preglednice XVII je razvidno, da so v času pospešenega testiranja stabilnosti (6 mesecev), izmerjene vrednosti znotraj specifikacijske meje za vsebnost vode ( $\leq 4$  %).

Preglednica XVII: Rezultati določanja vsebnosti vode z metodo KF pri pogoju 40 °C/ 75 % RH. Začetno analizo smo izvedli na končnem izdelku pred pakiranjem v ovojnino.

| Odmerek<br>[mg] | Št.<br>kapsul | Čas shranjevanja pri 40 °C/75 % RH<br>[mesec] |       |       |       |       |
|-----------------|---------------|-----------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
|                 |               | 0                                             | 3     | 6     | 9     | 12    |
| 10              | 30            | 3,7 %                                         | 3,0 % | 3,1 % |       |       |
|                 | 1000          | 3,7 %                                         | 3,3 % | 3,6 % | 3,7 % |       |
| 20              | 30            | 3,3 %                                         | 3,0 % | 3,3 % | 3,6 % | 3,9 % |
|                 | 1000          | 3,3 %                                         | 3,2 % | 3,2 % | 3,4 % | 3,4 % |
| 40              | 30            | 3,4 %                                         | 2,8 % | 3,0 % | 3,1 % | 3,2 % |
|                 | 1000          | 3,4 %                                         | 3,2 % | 3,4 % | 3,4 % | 3,4 % |

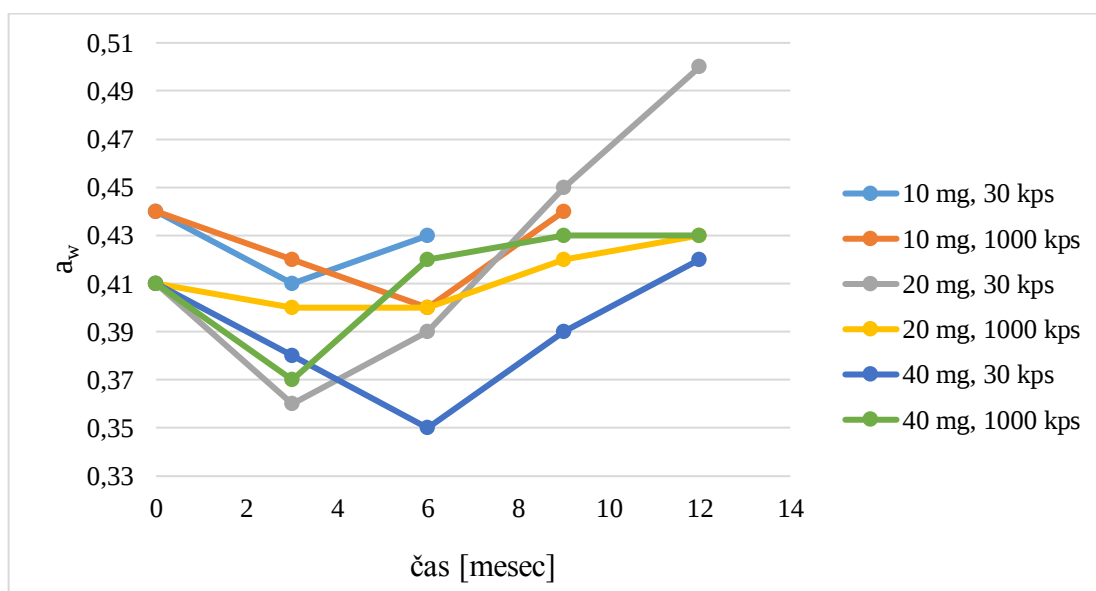
Preglednica XVIII: Rezultati določanja  $a_w$  pri pogoju 40 °C/75 % RH. Začetno analizo smo izvedli na končnem izdelku pred pakiranjem v ovojnino.

| Odmerek<br>k [mg] | Št.<br>kapsul | Čas shranjevanja pri 40 °C/75 % RH [mesec] |      |      |      |      |
|-------------------|---------------|--------------------------------------------|------|------|------|------|
|                   |               | 0                                          | 3    | 6    | 9    | 12   |
| 10                | 30            | 0,44                                       | 0,41 | 0,43 |      |      |
|                   | 1000          | 0,44                                       | 0,42 | 0,40 | 0,44 |      |
| 20                | 30            | 0,41                                       | 0,36 | 0,39 | 0,45 | 0,50 |
|                   | 1000          | 0,41                                       | 0,40 | 0,40 | 0,42 | 0,43 |
| 40                | 30            | 0,41                                       | 0,38 | 0,35 | 0,39 | 0,42 |
|                   | 1000          | 0,41                                       | 0,37 | 0,42 | 0,43 | 0,43 |

Iz izmerjenih vrednosti je razvidno, da vsebnost vode in vodna aktivnost najprej padeta, kar je še posebej opazno pri vsebnosti vode. Padec vodne aktivnosti in vsebnosti vode lahko razlagamo z delovanjem sušilnih sredstev, kapsul s silikagelom. Potem, ko zapakiramo kapsule z ZU in silikagel, sušilno sredstvo veže vodo iz kapsul in vodo, ki prehaja v ovojnino iz okolice zaradi prepustnosti ovojnine za vlago. Tako sušilno sredstvo najprej osuši kapsule in posledica tega so nižje vsebnosti vode in vodne aktivnosti po 3 mesečnem terminu. S časom se sušilno sredstvo nasiči z vlago in učinkovitost vezave vode na sušilno sredstvo se zmanjša oz. izgubi. Po tej časovni točki vzorec ponovno veže vlago, ki prehaja skozi ovojnino in vsebnost vode oz.  $a_w$  se zviša, kar se je zgodilo tudi v našem primeru (slika 6).

V primeru, ko je v enoti ovojnine večje število kapsul, lahko opazimo, da padec vsebnosti vode oz. vodne aktivnosti ni tako visok, kot v primeru manjšega števila kapsul v manjšem

vsebniku. Količina sušilnega sredstva v večjem vsebniku ni premo sorazmerna količini v manjšem vsebniku, zato v primeru večje plastenke sušilno sredstvo veže večjo količino začetne vode ter tako izgubi sposobnost nadaljne vezave vode. Obratno se v manjših vsebnikih z manjšim številom kapsul dlje časa vzdržuje minimalna RH znotraj vsebnika. Pri 20 mg vzorcu s 30 kapsulami v vsebniku lahko opazimo, da se ob podaljšanem izpostavitvi pogojem pospešene stabilnosti (9 in 12 mesecev) vzorec navlaži nekoliko bolj od ostalih vzorcev. Za odmerka 10 in 40 mg lahko zaključimo, da v vsebniku z manjšim številom kapsul opazimo večji padec vsebnosti vode napram vsebnostim v večjih vsebnikih s 1000 kapsulami in pri manjšem številu kapsul v ovojnicini nato vsebnost vode tudi počasneje naraste.



**Slika 6:** Prikaz spreminjanja  $a_w$  v odvisnosti od časa izpostavljenosti pogojem testiranja pospešene stabilnosti

#### 4.4.2 Vpliv začetne vsebnosti vode v peletah na kemijsko stabilnost omeprazola

Začetna količina vode v FO z ZU omeprazol je zelo pomembna za kemijsko stabilnost ZU. HGC so zelo higroskopne in vsebujejo približno 12 – 15 % vode. V primeru, če kapsule preveč osušimo, le te postanejo krhke, še posebej, ko jih zapakiramo skupaj s sušilnim sredstvom, ki jih še dodatno posuši. To smo opazili tudi v našem primeru, ko so se dodatno sušene kapsule krušile pri rokovanju. Vpliv vlage na kemijsko stabilnost omeprazola smo preverili tako, da smo kapsule z 10 mg odmerkom ZU proizvajalca 1 pred pakiranjem v ovojnicino (po 30 in 1000 kapsul) dodatno posušili in jih primerjali z ne posušeniimi. Vzorce

smo nato izpostavili pogojem pospešenega testiranja stabilnosti (40 °C/ 75 % RH) za obdobje 6 mesecev. Zaradi minimalnega razkroja izdelka, smo staranje podaljšali še za nadaljnje 3 mesece. V tem času smo spremljali porast vode v peletah s KF in  $a_w$  in porast RP. Rezultati so predstavljeni v preglednici XIX.

Preglednica XIX: Primerjava rezultatov pospešenega testiranja stabilnosti za dodatno sušene kapsule z ZU proizvajalca 1 pred pakiranjem, s kapsulami, ki niso bile dodatno posušene. Začetne meritve so izvedene na končnem izdelku pred pakiranjem v ovojnino in pred dodatnim sušenjem.

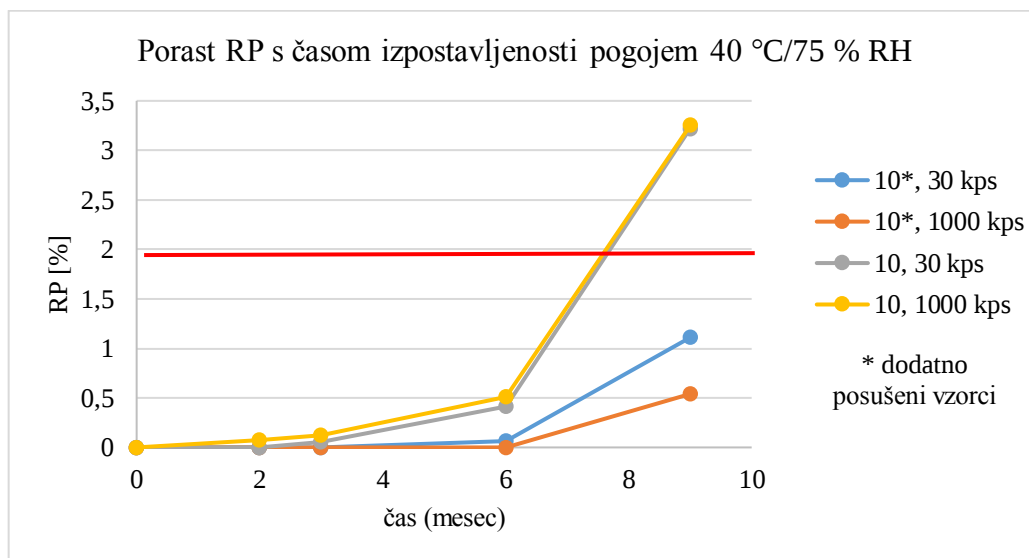
| Odmerek [mg] (* dodatno posušen) | Št. kapsul | Določanje vode / RP | Čas shranjevanja pri 40 °C/75 % RH [mesec] |        |        |        |        |      |
|----------------------------------|------------|---------------------|--------------------------------------------|--------|--------|--------|--------|------|
|                                  |            |                     | 0                                          | 1      | 2      | 3      | 6      | 9    |
| 10*                              | 30         | KF [%]              | 3,5                                        | 2,6    | 2,0    | 2,3    | 2,7    | 2,9  |
|                                  |            | $a_w$ [/]           | 0,43                                       | 0,29   | 0,20   | 0,24   | 0,32   | 0,38 |
|                                  |            | RP [%]              | < 0,05                                     | < 0,05 | < 0,05 | < 0,05 | 0,06   | 1,11 |
|                                  | 1000       | KF [%]              | 3,5                                        | 2,0    | 2,0    | 2,0    | 2,3    | 2,2  |
|                                  |            | $a_w$ [/]           | 0,43                                       | 0,17   | 0,20   | 0,18   | 0,24   | 0,22 |
|                                  |            | RP [%]              | < 0,05                                     | < 0,05 | < 0,05 | < 0,05 | < 0,05 | 0,54 |
| 10                               | 30         | KF [%]              | 3,5                                        | 2      | 3,5    | 3,2    | 3,1    | 3,4  |
|                                  |            | $a_w$ [/]           | 0,43                                       |        | 0,42   | 0,41   | 0,42   | 0,46 |
|                                  |            | RP [%]              | < 0,05                                     | < 0,05 | 0,05   | 0,05   | 0,41   | 3,22 |
|                                  | 1000       | KF [%]              | 3,5                                        | 3      | 3,3    | 3,2    | 3,1    | 3,3  |
|                                  |            | $a_w$ [/]           | 0,43                                       |        | 0,43   | 0,40   | 0,42   | 0,44 |
|                                  |            | RP [%]              | < 0,05                                     | < 0,05 | 0,07   | 0,12   | 0,51   | 3,25 |

Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da ima dodatno sušenje kapsul vpliv na kemijsko stabilnost omeprazola v FO. Razvidno je, da se  $a_w$  pri 2 mesečnem terminu razlikuje tudi za 0,2, kar pomeni, da je v FO manj prisotne proste vode, ki je na voljo za interakcije in posledično za kemijski razkroj omeprazola. Iz rezultatov predstavljenih v preglednici XIX je razvidno, da so vzorci, ki vsebujejo manj vode veliko bolj kemijsko stabilni, kot vzorci, ki vsebujejo več vode. Pri dodatno sušenih vzorcih, ki vsebujejo manj vode, je vsota RP po 6 mesecih testiranja pospešene stabilnosti 0,06 %, za pakiranje po 30 kapsul v plastenko, kar je tik nad mejo poročanja. Pri kapsulah, ki niso bile dodatno posušene, je vsota razkrojnih produktov po 6 mesecih pri pogoju 40 °C/75 % RH bistveno višja in znaša 0,41 % za pakiranje po 30 kapsul v plastenko in 0,51 % za pakiranje po 1000 kapsul v plastenko. Tudi

<sup>2</sup> Meritve za vsebnost vode KF in  $a_w$  pri tem terminu niso bile izvedene.

<sup>3</sup> Meritve za vsebnost vode KF in  $a_w$  pri tem terminu niso bile izvedene.

podaljšanje izpostavljenosti pogoju 40 °C/75 % RH pokaže, da so vzorci z manjšo vsebnostjo vode kemijsko stabilnejši. Iz tega sklepamo, da vlaga v vzorcu pomembno vpliva na kemijsko stabilnost omeprazola v peletah z zakasnelim sproščanjem v HGC. Opazimo, da naraščanje razkrojnih produktov s časom ne izkazuje linearnega obnašanja in, da podaljšanje shranjevanja vzorcev pri pogojih pospešenega testiranja stabilnosti za dodatne 3 mesece (9 mesečni termin) zelo pospeši razkroj omeprazola, kar je razvidno iz slike 7.

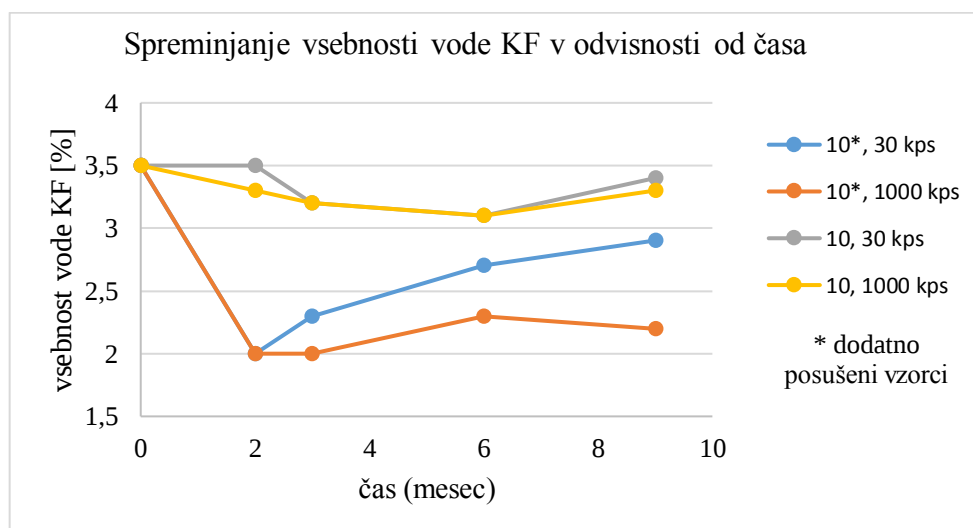


**Slika 7:** Prikaz prirasta RP s časom pri pogojih testiranja pospešene stabilnosti za različna pakiranja 10 mg odmerka med shranjevanjem pri 40 °C/ 75 % RH. Rdeča črta prikazuje specifikacijsko mejo za vsoto RP.

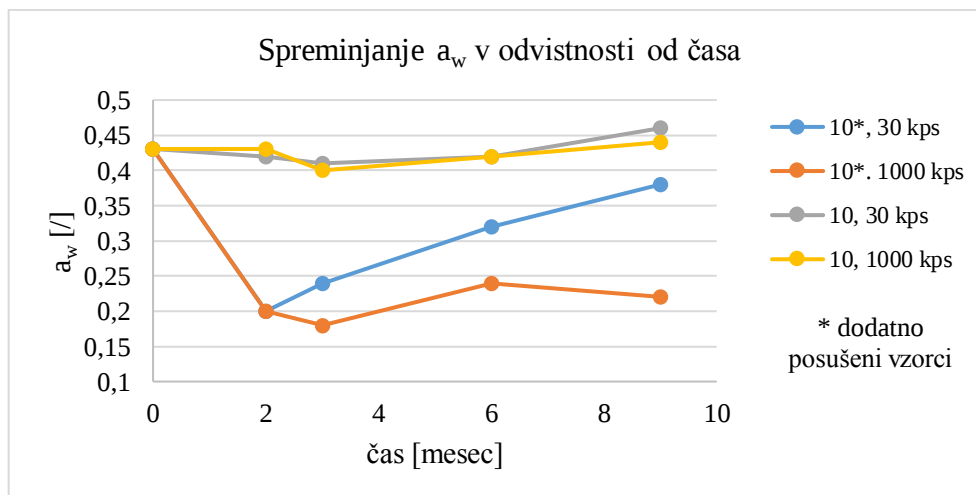
Pri kapsulah, ki niso bile dodatno posušene, lahko opazimo, da sušilno sredstvo v ovojnini najprej nekoliko posuši pelete in nato vzdržuje približno konstantno RH v ovojninu. Prirast vsebnosti vode se pojavi šele po 9 mesecih pri pogojih pospešenega testiranja stabilnosti. Opazimo pa, da v primeru pakiranja 1000 kapsul v vsebnik, vsebnost vode in vodna aktivnost pelet v kapsulah počasneje naraščata kot pri pakiranju 30 kapsul v vsebnik. Podobne rezultate smo dobili s pomočjo SDMT modela Excelovega izračuna, kjer smo spreminjali mase polnitev v plastenko in opazili, da več kot je mase v plastenki, kasneje se le-ta navlaži. Podoben pojav smo opazili že v prejšnjem poglavju. Prirast vsebnosti vode (KF) in vodne aktivnosti v odvisnosti od časa izpostavljenosti pogoju pospešene stabilnosti prikazujeta sliki 8 in 9.

Začetna vsebnost vode v FO vpliva na hitrost razkroja omeprazola. Pelete z nižjo vsebnostjo vode so bolj stabilne, prav tako je nižja vsota RP. Kljub temu prirast razkrojnih produktov

po 6 mesecih pri pogojih pospešenega testiranja stabilnosti ni blizu specifičnjsko določene meje (2,0 %) tako, da lahko zaključimo, da je v našem primeru FO glede na testiranje pospešene stabilnosti dovolj stabilna. V primeru, da bi se zaradi povečanja vsebnosti vode v FO seštevek razkrojnih produktov približal specifičnjski meji, bi lahko razmislili o dodatnem sušenju kapsul pred pakiranjem in o zamenjavi HGC s hidroksipropilmetil celuloznimi kapsulami (HPMC), ki vsebujejo manj vode.



**Slika 8:** Prikaz spreminjanja vsebnosti vode določene s KF titracijo, pri pogojih testiranja pospešene stabilnosti, za različna pakiranja 10 mg odmerka kapsul pri 40 °C/ 75% RH.



**Slika 9:** Prikaz spreminjanja vodne aktivnosti, pri pogojih testiranja pospešene stabilnosti, za različna pakiranja 10 mg odmerka kapsul pri 40 °C/ 75% RH.

#### 4.4.3 Vpliv higroskopnosti ZU na kemijsko stabilnost FO

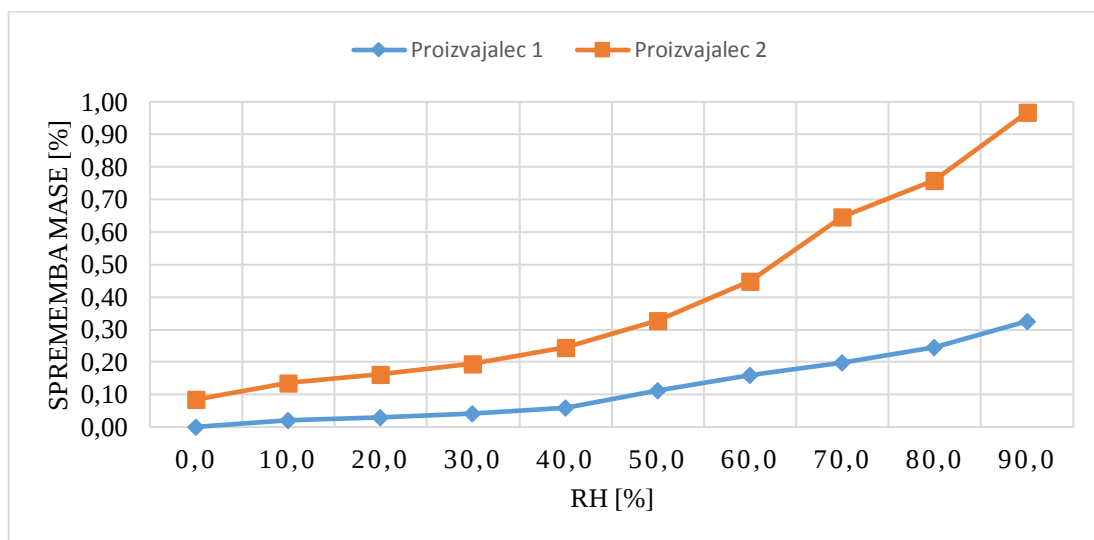
Z namenom, da bi ovrednotili vpliv higroskopnosti ZU na kemijsko stabilnost omeprazola v kapsulah z zakasnelim sproščanjem, smo medsebojno primerjali FO z ZU dveh različnih proizvajalcev. Proučevali smo kapsule 10 mg odmerka, ki so se razlikovale le v proizvajalcu ZU. Z namenom, da bi preverili higroskopnost ZU proizvajalcev 1 in 2, smo zbrali podatke o sorpcijskem obnašanju ZU. Izoterme so bile določene v Leku z metodo DVS v območju od 0 % RH do 90 % RH z višanjem RH v korakih po 10 %. Rezultati meritev so zbrani v preglednici XX.

Preglednica XX: Prikaz rezultatov določanja sorpcijskih izoterm proizvajalec ZU 1 in 2 z metodo DVS.

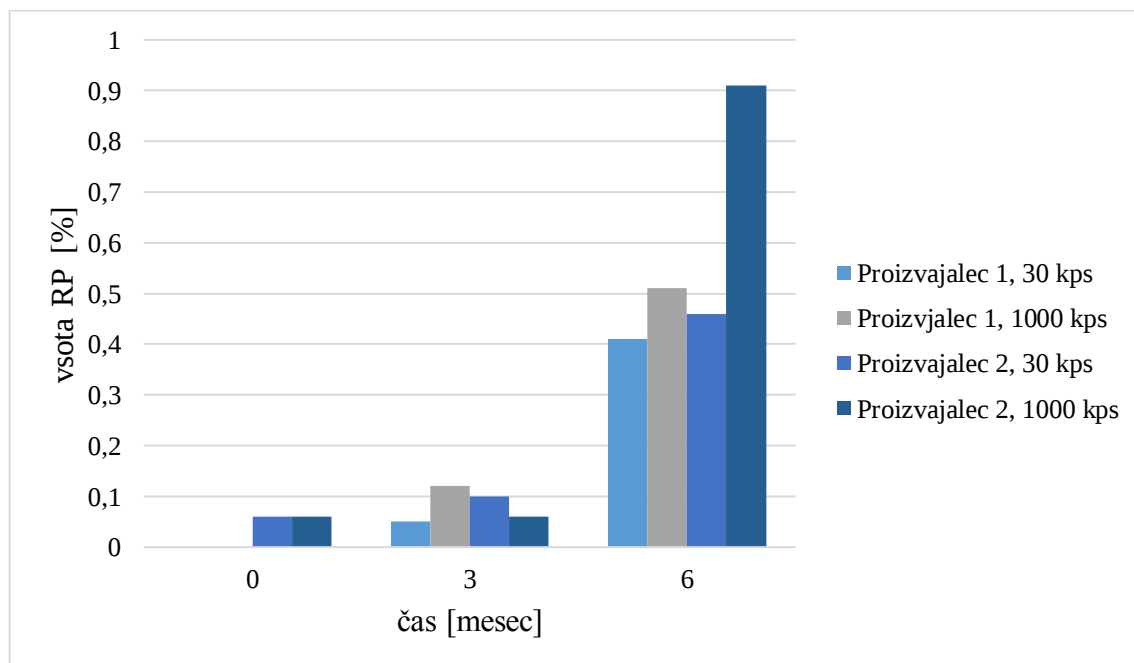
| <b>RH [%]</b> | <b>Sprememba mase [%]<br/>proizvajalec 1</b> | <b>Sprememba mase [%]<br/>proizvajalec 2</b> |
|---------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|
| <b>0,0</b>    | 0,0007                                       | 0,0842                                       |
| <b>10,0</b>   | 0,0206                                       | 0,1146                                       |
| <b>20,0</b>   | 0,0292                                       | 0,1333                                       |
| <b>30,0</b>   | 0,0430                                       | 0,1533                                       |
| <b>40,0</b>   | 0,0590                                       | 0,1870                                       |
| <b>50,0</b>   | 0,1120                                       | 0,2157                                       |
| <b>60,0</b>   | 0,1607                                       | 0,2875                                       |
| <b>70,0</b>   | 0,1991                                       | 0,4468                                       |
| <b>80,0</b>   | 0,2450                                       | 0,5129                                       |
| <b>90,0</b>   | 0,3257                                       | 0,6420                                       |

Iz rezultatov zbranih v preglednici XX in slike 10 je razvidno, da je ZU proizvajalca 2 bolj higroskopna. Z namenom, da bi ovrednotili vpliv higroskopnosti ZU na kemijsko stabilnost omeprazola v kapsulah z zakasnelim sproščanjem, smo primerjali vsoto RP za posamezno FO. Rezultati pospešene stabilnosti FO z ZU proizvajalca 1 so zbrani v preglednici XIX medtem, ko so rezultati proizvajalca 2 predstavljeni v preglednici XXII. Opazimo lahko, da v primeru bolj higroskopne ZU proizvajalca 2, količina RP po 6 mesečnem terminu pospešene stabilnosti nekoliko višja (0,46 % in 0,91 %), kot v primeru ZU proizvajalca 1 (0,41 % in 0,51 %). Naraščanje RP v kapsulah z ZU različnih proizvajalcev pri pogojih pospešene stabilnosti prikazuje slika 11. Kljub temu so izmerjene vrednosti znotraj specifikacijskih mej. Tudi iz primerjave vsebnosti vode in  $a_w$  je razvidno, da se ne spremenita

bistveno. Vsebnost vode KF je v obeh primerih enaka, medtem, ko je  $a_w$  za pelete z ZU proizvajalca 1 0,42, proizvajalca 2 pa 0,43. Zaključimo lahko, da sta obe FO z ZU različnih proizvajalcev stabilni pod pogoji pospešenega testiranja stabilnosti, ker specifikacijske vrednosti niso presežene. Kljub temu higroskopsnost ZU vpliva na kemijsko stabilnost. Tako je vsota RP pri peletah z bolj higroskopno ZU višja, kot pri peletah z manj higroskopno ZU.



**Slika 10:** Sorpcijski izotermi za ZU proizvajalcev 1 in 2 .



**Slika 11:** Prikaz naraščanja RP med testiranjem pospešene stabilnosti za 10 mg odmerke omeprazol kapsul z ZU različnih proizvajalcev.

#### 4.5 Pospešeno testiranje stabilnosti

Vzorci smo testirali pod pogoji testiranja pospešene stabilnosti skladno z ICH smernicami, da bi preverili stabilnost FO. Za vse tri odmerke smo preverili vsebnost vode (KF), vodno aktivnost in vsebnost razkrojnih produktov. Rezultati so zbrani v preglednicah XXI in XXII.

Testiranje je bilo izvedeno na peletah z ZU proizvajalca 2, polnjenih v HGC. Iz rezultatov je razvidno, da shranjevanje vzorcev pri pogojih pospešene stabilnosti vpliva na razkroj omeprazola. Ponovno lahko opazimo znižanje vsebnosti vode in  $a_w$  pri 3 mesečnem terminu napram začetnim vrednostim pred pakiranjem, kar je posledica sorpcije vlage na sušilno sredstvo. Vsebnost vode nato pri 6 mesečnem terminu ponovno naraste. Opazimo, da se pri 3 mesečnem terminu vsebnost vode in  $a_w$  najbolj znižata pri 40 mg odmerku v pakiranju po 30 kapsul v ovojni. Zanimivo je, da je vsota RP v tem primeru najnižja, kar potrjuje občutljivost omeprazola za razpad ob prisotnosti vlage. Izmerjene vrednosti za vsebnost vode in razkrojnih produktov pri shranjevanju pri povišani temperaturi in vlažnosti niso presegle specifikacijskih mej za vodo  $\leq 4,0 \%$  in razkrojne produkte  $\leq 2,0 \%$  ( $\leq 0,3 \%$  za posamezen znan razkrojni produkt oz.  $\leq 0,2 \%$  za posamezen neznan razkrojni produkt). S testi pospešenega testiranja stabilnosti smo preverili odpornost izdelka pri povišani temperaturi in vlagi glede na priporočene pogoje shranjevanja (25 °C/ 60 % RH). Skozi testiranje pospešene stabilnosti smo vrednotili razkrojne produkte omeprazol A, omeprazol benzimidazol in omeprazol N-oksid. Specifikacijska meja za posamezen razkrojni produkt je znašala  $\leq 0,3 \%$ . Za druge neznane razkrojne produkte je bila določena specifikacijska meja  $\leq 0,2 \%$ , seštevek vseh določenih razkrojnih produktov pa ni smel presegati 2,0 %. Iz preglednice XXI je razvidno, da so vsi izmerjeni rezultati znotraj specifikacijsko določenih mej. Opazimo, da od specificiranih RP pri pogojih pospešene stabilnosti narašča le omeprazol A. Iz rezultatov v preglednici XXII opazimo, da se vsebnost vode KF in  $a_w$ , po 3 mesecih izpostavljenosti pogojem 40 °C/75 % RH nekoliko znižata in po 6 mesecih ponovno naraseta na približno enako vrednost, kot na začetku. Tako je težko opredeliti vpliv vlage na razkroj ZU. Lahko pa opazimo, da se pri pogojih pospešene stabilnosti vsota RP povečuje.

Preglednica XXI: Prikaz določanja razkrojnih produktov v času pospešenega testiranja stabilnosti. Začetne meritve so izvedene na končnem izdelku pred pakiranjem v ovojnino. Pri neznanih RP število v oklepaju prikazuje število nastalih neznanih RP. Meja poročanja za nastale RP je 0,05 %. Rezultati so podani v % porasta RP.

| Odmerek<br>[mg] | Št.<br>kapsul | Razkrojni produkt   | Čas shranjevanja pri 40 °C/75 %<br>RH [mesec] |          |           |
|-----------------|---------------|---------------------|-----------------------------------------------|----------|-----------|
|                 |               |                     | 0                                             | 3        | 6         |
| 10              | 30            | Omeprazol A         | < 0,05                                        | < 0,05   | 0,09      |
|                 |               | Omepr. benzimidazol | < 0,05                                        | < 0,05   | < 0,05    |
|                 |               | Omeprazol N-oksidi  | < 0,05                                        | < 0,05   | < 0,05    |
|                 |               | Neznani RP          | 0,06                                          | 0,10 (2) | 0,37 (5)  |
|                 | 1000          | Omeprazol A         | < 0,05                                        | 0,06     | 0,13      |
|                 |               | Omepr. benzimidazol | < 0,05                                        | < 0,05   | < 0,05    |
|                 |               | Omeprazol N-oksidi  | < 0,05                                        | < 0,05   | < 0,05    |
|                 |               | Neznani RP          | 0,06 (1)                                      | < 0,05   | 0,78 (10) |
| 20              | 30            | Omeprazol A         | < 0,05                                        | < 0,05   | 0,09      |
|                 |               | Omepr. benzimidazol | < 0,05                                        | < 0,05   | < 0,05    |
|                 |               | Omeprazol N-oksidi  | < 0,05                                        | < 0,05   | < 0,05    |
|                 |               | Neznani RP          | 0,07 (1)                                      | 0,12 (2) | 0,24 (4)  |
|                 | 1000          | Omeprazol A         | < 0,05                                        | 0,06     | 0,11      |
|                 |               | Omepr. benzimidazol | < 0,05                                        | < 0,05   | < 0,05    |
|                 |               | Omeprazol N-oksidi  | < 0,05                                        | < 0,05   | < 0,05    |
|                 |               | Neznani RP          | 0,07 (1)                                      | 0,11 (2) | 0,67 (8)  |
| 40              | 30            | Omeprazol A         | < 0,05                                        | < 0,05   | 0,09      |
|                 |               | Omepr. benzimidazol | < 0,05                                        | < 0,05   | < 0,05    |
|                 |               | Omeprazol N-oksidi  | < 0,05                                        | < 0,05   | < 0,05    |
|                 |               | Neznani RP          | 0,06 (1)                                      | 0,10 (2) | 0,37 (6)  |
|                 | 1000          | Omeprazol A         | < 0,05                                        | 0,06     | 0,13      |
|                 |               | Omepr. benzimidazol | < 0,05                                        | < 0,05   | < 0,05    |
|                 |               | Omeprazol N-oksidi  | < 0,05                                        | < 0,05   | < 0,05    |
|                 |               | Neznani RP          | 0,06 (1)                                      | < 0,05   | 0,78 (10) |

Testiranje pospešene stabilnosti je izvedeno pri ostrejših pogojih, kot so predpisani pogoji shranjevanja. Zato s testiranjem pospešene stabilnosti ovrednotimo obnašanje izdelka pod ostrejšimi pogoji, kot jim je sicer le-ta izpostavljen pri predpisanem shranjevanju. Z rezultati pospešenega testiranja stabilnosti smo pokazali, da je izdelek stabilen pri povišani temperaturi in vlagi za obdobje 6 mesecev, zato lahko pričakujemo, da bo izdelek znotraj specifikacijskih mej tudi pri pogojih testiranja dolgoročne stabilnosti za rok uporabnosti. Kljub temu je za ustrezno stabilnost izdelka le-to potrebno potrditi z dolgoročnim testiranjem stabilnosti za čas roka uporabnosti (2 leti).

Preglednica XXII: Rezultati meritev v času shranjevanja pri pogojih pospešene stabilnosti za vzorce z ZU proizvajalca 2.

| Odmerek [mg] | Št. kapsul v enoti ovojnine | Določanje vode / RP | Čas shranjevanja pri 40 °C/75 % RH [mesec] |      |      |
|--------------|-----------------------------|---------------------|--------------------------------------------|------|------|
|              |                             |                     | 0                                          | 3    | 6    |
| 10           | 30                          | KF [%]              | 3,7                                        | 3,0  | 3,1  |
|              |                             | a <sub>w</sub> [/]  | 0,44                                       | 0,41 | 0,43 |
|              |                             | RP [%]              | 0,06                                       | 0,10 | 0,46 |
|              | 1000                        | KF [%]              | 3,7                                        | 3,3  | 3,6  |
|              |                             | a <sub>w</sub> [/]  | 0,44                                       | 0,42 | 0,40 |
|              |                             | RP [%]              | 0,06                                       | 0,06 | 0,91 |
| 20           | 30                          | KF [%]              | 3,3                                        | 3,0  | 3,3  |
|              |                             | a <sub>w</sub> [/]  | 0,41                                       | 0,36 | 0,39 |
|              |                             | RP [%]              | 0,07                                       | 0,12 | 0,33 |
|              | 1000                        | KF [%]              | 3,3                                        | 3,2  | 3,2  |
|              |                             | a <sub>w</sub> [/]  | 0,41                                       | 0,40 | 0,40 |
|              |                             | RP [%]              | 0,07                                       | 0,17 | 0,67 |
| 40           | 30                          | KF [%]              | 3,4                                        | 2,8  | 3,0  |
|              |                             | a <sub>w</sub> [/]  | 0,41                                       | 0,28 | 0,35 |
|              |                             | RP [%]              | 0,07                                       | 0,10 | 0,19 |
|              | 1000                        | KF [%]              | 3,4                                        | 3,2  | 3,4  |
|              |                             | a <sub>w</sub> [/]  | 0,41                                       | 0,37 | 0,42 |
|              |                             | RP [%]              | 0,07                                       | 0,21 | 0,80 |

#### 4.6 Napovedovanje stabilnosti s pomočjo modeliranja podatkov pospešenega testiranja stabilnosti

##### 4.6.1 Sorpcijske izoterme za vlago

Sorpcijske izoterme za vlago smo izdelali tako, da smo kapsule s peletami z ZU proizvajalca 2 vseh odmerkov izpostavili znanim RH v komorah. Za vzpostavitev določene RH v komori smo uporabili nasičene solne raztopine LiCl, MgCl<sub>2</sub>, NaBr in NaCl, za katere smo teoretične podatke o RH pridobili iz literature (39). Teoretične vrednosti RH v komori in izmerjene vrednosti so prikazane v preglednici XXIII. Opazimo, da se teoretične in izmerjene RH v komorah nekoliko razlikujejo. Menimo, da bi lahko bil vzrok tudi v slabšem tesnjenju komor oz. v vstopu sobne RH zaradi pogostega odpiranja komor skozi daljše časovno obdobje.

Preglednica XXIII: Prikaz teoretičnih in izmerjenih RH vrednosti nasičenih solnih raztopin v komorah. Teoretične vrednosti RH smo pridobili iz literature (39) in so podane pri 25 °C. RH vrednosti smo izmerili pri sobni temperaturi 22,5 °C.

|                   | <b>LiCl</b> | <b>MgCl<sub>2</sub></b> | <b>NaBr</b> | <b>NaCl</b> |
|-------------------|-------------|-------------------------|-------------|-------------|
| Teoretična RH [%] | 11,3        | 32,8                    | 52,9        | 75,3        |
| Izmerjena RH [%]  | 16,3        | 36,4                    | 58,4        | 72,2        |

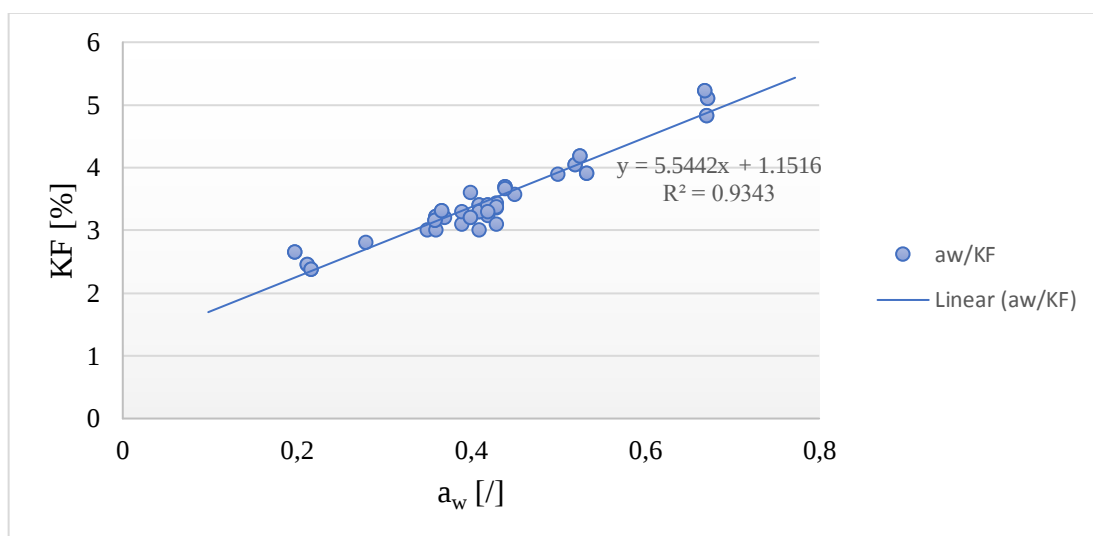
Po 25 dneh smo vzorcem pomerili vsebnost vode s KF titracijo in  $a_w$ . Pri izdelavi sorpcijske izoterme za naše vzorce smo upoštevali še izmerjene vrednosti vsebnosti vode KF in  $a_w$  pridobljene pri testiranju pospešene stabilnosti (preglednica XXII).

Preglednica XXIV: Rezultati meritev vsebnosti vode KF in  $a_w$  vzorcem, ki so bili izpostavljeni znanim RH.

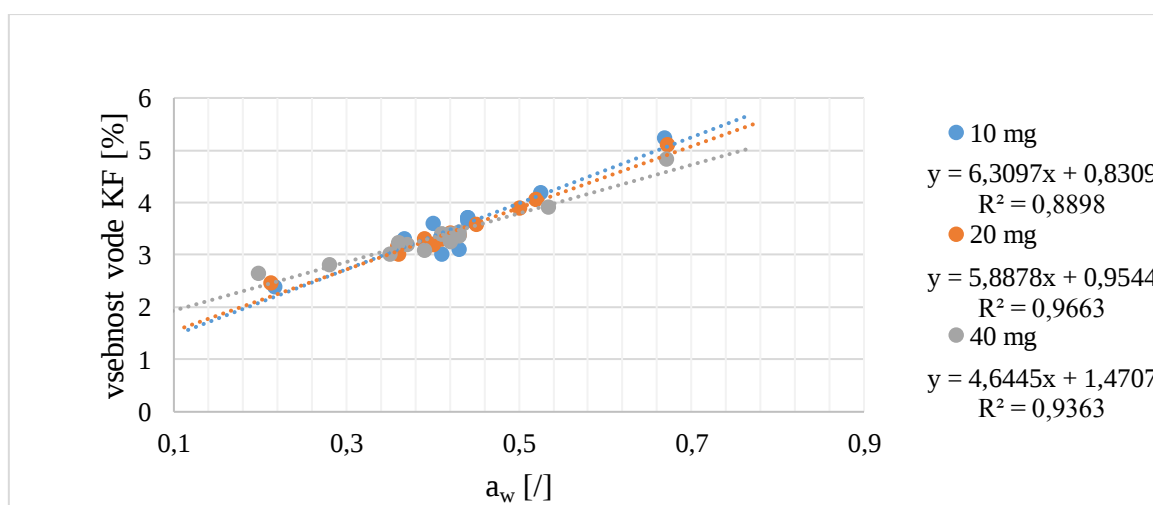
| <b>Odmerek [mg]</b> | <b>Analizna metoda</b> | <b>LiCl</b> | <b>MgCl<sub>2</sub></b> | <b>NaBr</b> | <b>NaCl</b> |
|---------------------|------------------------|-------------|-------------------------|-------------|-------------|
| <b>10</b>           | KF [%]                 | 2,4         | 3,3                     | 4,2         | 5,2         |
|                     | $a_w$ [/]              | 0,22        | 0,37                    | 0,53        | 0,67        |
| <b>20</b>           | KF [%]                 | 2,5         | 3,2                     | 4,1         | 5,1         |
|                     | $a_w$ [/]              | 0,21        | 0,36                    | 0,52        | 0,67        |
| <b>40</b>           | KF [%]                 | 2,6         | 3,2                     | 3,9         | 4,8         |
|                     | $a_w$ [/]              | 0,20        | 0,36                    | 0,53        | 0,67        |

Iz izmerjenih podatkov smo narisali graf  $a_w$  v odvisnosti od vsebnosti vode KF. Skozi točke na grafu smo nato narisali premico, ki predstavlja linearni del sorpcijske izoterme (slika 12). Meritve vsebnosti vode KF in  $a_w$  smo izvajali na peletah. Naši vzorci so vsebovali enake pelete, le da so bile pakirane v različno velike kapsule, da smo zagotovili ciljni odmerek. Tako so kapsule z odmerkom 20 mg vsebovale 2 krat večjo maso pelet kot kapsule 10 mg odmerka in kapsule z odmerkom 40 mg, 4 krat večjo maso pelet kot kapsule 10 mg odmerka. Ker kapsule različnih odmerkov vsebujejo enake pelete, smo vse izmerjene podatke različnih odmerkov združili v eno sorpcijsko izotermo z namenom, da bi dobili kar se da natančno izotermo (slika 12). Iz slike 13, kjer so predstavljene sorpcijske izoterme za posamezen

odmerek, lahko vidimo, da so sorpcijske izoterme dokaj podobne, kar potrjuje ustreznost naše odločitve o združevanju izoterm v skupno sorpcijsko izotermo.



**Slika 12:** Združena sorpcijska izoterma vseh odmerkov opisuje spreminjanje vsebnosti vode določene s KF titracijo v odvisnosti od  $a_w$ .



**Slika 13:** Sorpcijske izoterme za posamezen odmerek.

Iz podobnosti med serijami sledi tudi, da je izoterma funkcija sestave. Ker pa so kapsule z različnimi odmerki polnjene z enakimi peletami, smo pričakovali, da bodo sorpcijske izoterme enake.

Iz preglednice XXIV lahko razberemo, da sta izmerjeni  $a_w$  vzorca in izmerjena RH v komori enaki pri nasičeni solni raztopini  $MgCl_2$ . Večje razlike se pojavi pri rezultatih  $a_w$  v komorah

z nasičeno solno raztopino LiCl in NaCl, kjer smo pričakovali, da se bodo vzorci navlažili bližje izmerjeni RH v komori. Z namenom, da bi se prepričali, da so se pelete res navlažile na ciljno RH smo preverili tudi  $a_w$  ovojnic. Pri tem smo opazili, da sta izmerjeni vrednosti za pelete in ovojnice enaki. Menimo, da je lahko prišlo do razlike tudi zaradi izpostavljenosti vzorca sobni RH pred merjenjem. Pred merjenjem je bilo treba odstraniti pelete iz kapsul, kar je bilo še posebej težavno pri kapsulah iz komore z nasičeno solno raztopino LiCl, ker so bile kapsule elektrostatične. Kljub temu, da smo želeli pomeriti  $a_w$  vzorcev v čim krajšem času po odstranitvi iz komor, je priprava vzorca trajala približno 5–10 min pri sobni RH (pribl. 60 %), kar bi lahko delno vplivalo na razliko med izmerjenimi  $a_w$  vzorca in izmerjenimi RH nasičenih solnih raztopin LiCl in NaCl.

#### 4.6.2 Napovedovanje dolgoročne stabilnosti s pomočjo izračuna

##### **4.6.2.1 Izračun sorpcijske izoterme**

Najprej smo s pomočjo v Leku izdelanega Excelovega izračuna pridobili teoretično sorpcijsko izotermo za pelete in jo primerjali s praktično iz poglavja 4.6.1. *Sorpcijske izoterme za vlago* (slika 12). Teoretično sorpcijsko izotermo smo sestavili tako, da smo pridobili Lekove interne podatke o sorpcijskih izotermah posameznih PS in ZU. Nekatere izoterme smo izračunali s pomočjo enačbe 5 in parametrov pridobljenih iz literature (31). Soprcijski izotermi za ZU proizvajalcev 1 in 2 smo izmerili z DVS in sta predstavljeni v preglednici XX. Posamezne izoterme smo nato združili v skupno izotermo glede na masni delež (m/m %) sestavine v peletah. V Excelov izračun smo vnesli izoterme za PS in ZU ter masne deleže posameznih sestavin v peletah, iz katerih smo nato izračunali skupno sorpcijsko izotermo. Izračunana in praktična izoterma FO z ZU proizvajalca 2 sta prikazani v preglednici XXV.

Praktično izotermo smo določili z merjenjem vsebnosti vode KF in  $a_w$  v peletah z ZU proizvajalca 2, zato smo tudi pri izračunu upoštevali le sestavo pelet brez ovojnic. Z rezultati meritev smo izvedli linearno regresijo ter z ekstrapolacijo rezultatov pri določeni RH ( $a_w \cdot 100$ ) določili praktično sorpcijsko izotermo. Praktična izoterma je prikazana na sliki 12. Iz rezultatov zbranih v preglednici XXV je razvidno, da se praktična in teoretična izoterma precej razlikujeta. Menimo, da do razlik pride predvsem zaradi odstopanj pri izdelavi praktičnih izoterm. Kot smo opisali že v poglavju 4.6.1. *Sorpcijske izoterme za vlago*, vzorcev pri nizki RH nismo uspeli dovolj posušiti, pri visokih RH pa se pelete niso dovolj

navlažile, kar je razvidno iz vrednosti  $a_w$ . Razlog je verjetno lahko tudi v tehnološkem postopku, saj se pri peletiranju lahko toliko spremenijo PS, da se jim spremeni higroskopnost.

Do odstopanj bi lahko prišlo tudi zaradi neupoštevanja HGC. Kot smo že omenili HGC vsebujejo znatno količino vode in jih je zato težje posušiti. To bi lahko vplivalo tudi na neuspešno sušenje kapsul v komori z nasičeno solno raztopino LiCl (izmerjena RH = 16,8 %), kjer so se kapsule (oz. pelete) posušile na RH = 22 %. Izračunano sorpcijsko izotermo smo nato uporabili pri napovedovanju dolgoročne stabilnosti s pomočjo Excelovega izračuna.

Preglednica XXV: Praktična in teoretična sorpcijska izoterma. Praktično izotermo smo izračunali s pomočjo linearne regresije (slika 12). Teoretično izotermo smo izračunali z združevanjem teoretičnih izoterm PS in izmerjene izoterme za ZU ob upoštevanju masnih deležev posameznih sestavin v FO.

| RH [%] | Vsebnost vode [%] praktično | Vsebnost vode [%] teoretična |
|--------|-----------------------------|------------------------------|
| 10,0   | 1,7                         | 0,7                          |
| 20,0   | 2,3                         | 1,1                          |
| 30,0   | 2,8                         | 1,6                          |
| 40,0   | 3,3                         | 2,0                          |
| 50,0   | 3,9                         | 2,6                          |
| 60,0   | 4,5                         | 3,2                          |
| 70,0   | 5,0                         | 4,0                          |
| 80,0   | 5,6                         | 4,4                          |

#### 4.6.2.2 Napovedovanje dolgoročne stabilnosti

Iz pridobljenih podatkov testiranja pospešene stabilnosti in stresnih testov smo želeli preveriti možnost napovedovanja dolgoročne stabilnosti. Za napovedovanje smo izbrali kapsule s peletami z ZU proizvajalca 1, saj smo pri 10 mg odmerku imeli na voljo največ podatkov.

Iz meritev pridobljenih med testiranjem pospešene stabilnosti (preglednica XIX) kapsul 10 mg odmerka smo s pomočjo linearne regresije preverili kinetiko razpada omeprazola. Izračunana  $R^2$  sta znašala med 0,86, za 10 mg odmerek v pakiranju po 30 kapsul v plastenko, in 0,92, za 10 mg odmerek v pakiranju po 1000 kapsul v plastenko. Iz izračunanih  $R^2$

opazimo, da razpad ZU v izdelku skozi obdobje pospešenega testiranja stabilnosti ne sledi kinetiki ničtega reda.

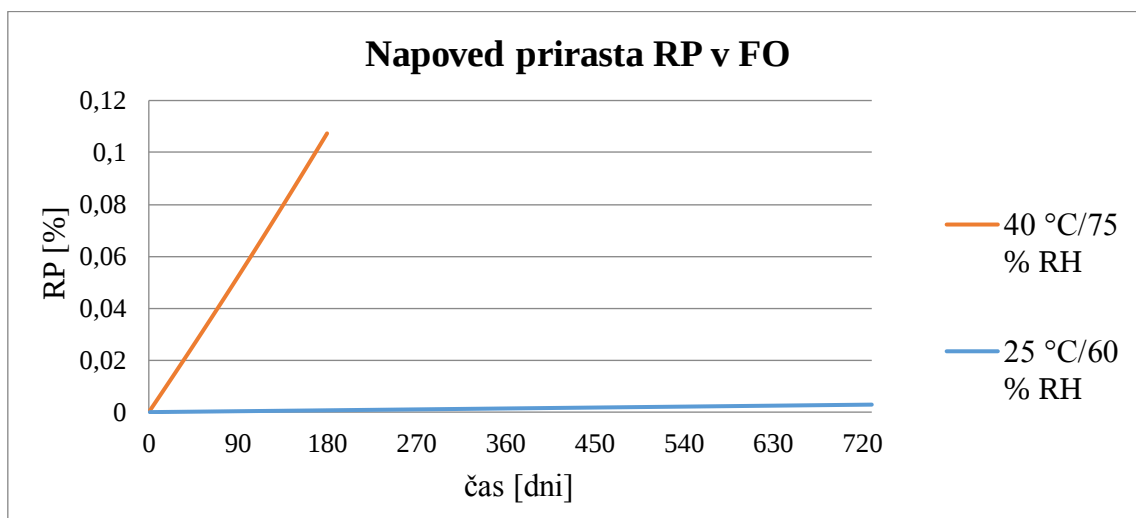
S pomočjo rezultatov meritev  $a_w$  in RP pri pospešenem testiranju stabilnosti in stresnih testov smo določili posamezne člene v Arrheniusovi enačbi s členom za vlago (enačba 3). Za napovedovanje razkroja pri pogojih dolgoročne stabilnosti, za čas roka uporabnosti (2 leti), smo uporabili teoretično sorpcijsko izotermo za pelete z ZU proizvajalca 1, sorpcijsko izotermo za HGC kapsule, sorpcijsko izotermo sušilnega sredstva, mase in začetne RH posameznih komponent v ovojnini. Napovedovanje smo izvedli za kapsule z 10 mg odmerkom s peletami z ZU proizvajalca 1, polnjene v HDPE platenke po 1000 kapsul. Pridobili smo tudi podatke o prepustnosti 500 mL HDPE platenke za vlago pri pogojih 40 °C/75 % RH (3,00 mg/dan), 30 °C/75 % RH (1,03 mg/dan) in 25 °C/60 % RH (0,41 mg/dan). Tudi te podatke smo upoštevali pri napovedovanju. Podatki za izračun parametrov v Arrheniusovi enačbi s členom za vlago so zbrani v preglednici XXVI. Izračunan parameter  $\ln(A)$  je znašal 90,18, parameter  $E_a$  61,55 kcal/mol (257,53 kJ/mol) in parameter B 0,0476.

Preglednica XXVI: Prikaz podatkov za izračun parametrov v prilagojeni Arrheniusovi enačbi s členom za vlago.

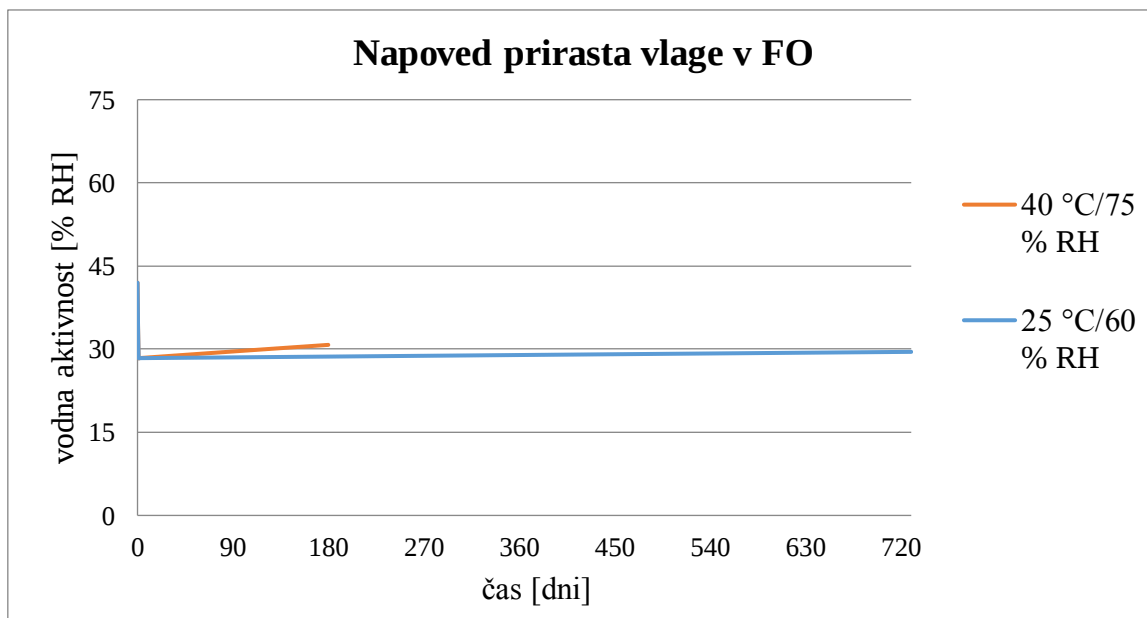
| Čas (dni) | T [°C] | % RH | % RP |
|-----------|--------|------|------|
| 30        | 40     | 15   | 0,01 |
| 60        | 40     | 19   | 0,01 |
| 90        | 40     | 16   | 0,01 |
| 120       | 40     | 22   | 0,02 |
| 60        | 40     | 43   | 0,07 |
| 90        | 40     | 40   | 0,12 |
| 14        | 50     | 75   | 1,36 |
| 14        | 50     | 0    | 0,05 |

Pri napovedovanju smo pričakovali nekaj težav, saj smo večino podatkov pridobili pri enaki temperaturi 40 °C, kar je otežilo natančnejše napovedovanje. Prav tako smo hitro opazili, da razpad ZU v našem vzorcu ne sledi kinetiki 0. reda. Tudi sama FO je kompleksna, saj je za napovedovanje potrebno upoštevati PS in ZU v peletah, ovojnice iz želatine ter ovojnino. S pomočjo izračunanih parametrov smo s programom izračunali % RP pri 25 °C/60 % RH po 24 mesecih. Rezultat je prikazan na sliki 14. Rezultat smo primerjali z rezultati pridobljenimi pri dolgoročnem testiranju stabilnosti (12 mesečni termin).

S pomočjo programa smo napovedali tudi prirast vlage znotraj ovojnine skozi obdobje shranjevanja pri pogojih pospešene stabilnosti in ga primerjali z izmerjenim. Napovedovanje smo izvedli tako, da smo upoštevali sorpcijske izoterme za silikagel, pelete in želatinaste ovojnice ter mase posamezne komponente v ovojlini. Upoštevali smo še prepustnost ovojnine za vlogo pri pogojih shranjevanja. Napoved je prikazana na sliki 15.



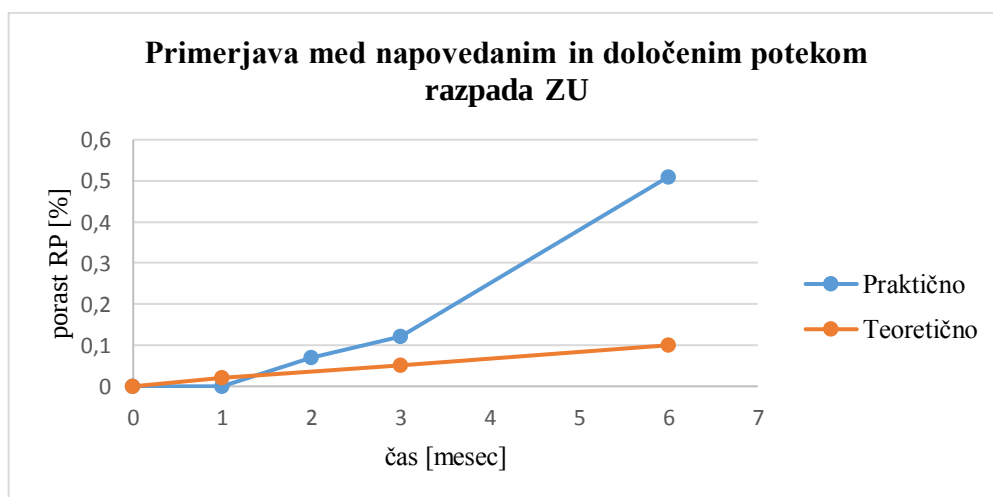
**Slika 14:** Napovedan prirast RP za obdobje pospešenega in dolgoročnega testiranja stabilnosti za 10 mg odmerek omeprazol kapsul z ZU proizvajalca 1, v pakiranju po 1000 kapsul na plastenki.



**Slika 15:** Napovedan prirast vlage v ovojlini pri pogojih pospešenega in dolgoročnega testiranja stabilnosti za 10 mg odmerek omeprazol kapsul z ZU proizvajalca 1, v pakiranju po 1000 kapsul na plastenki.

Pridobljene rezultate o napovedi kemijske stabilnosti pri priporočenih pogojih shranjevanja smo primerjali z 12. mesečnim terminom dolgoročnega testiranja stabilnosti. Vsi razkrojni produkti v tem terminu so bili pod mejo poročanja ( $\leq 0,05\%$ ), kar se dobro ujema z napovedjo. Za čas roka uporabnosti (2 leti) s pomočjo izračuna napovemo porast vsote RP do  $0,03\%$ . Opazimo, da je izdelek zelo stabilen in je vsota RP veliko nižja od specifikacijske meje ( $\leq 2,0\%$ ). Pri primerjavi napovedi stabilnosti pri pogojih  $40\text{ }^{\circ}\text{C}/75\% \text{ RH}$  in dejanskih meritev RP pri testiranju dolgoročne stabilnosti opazimo, da se rezultata ne ujemata (slika 16). Praktično smo pri 6 mesečnem terminu testiranja pospešene stabilnosti določili vsoto RP  $0,51\%$ . Z napovedjo določimo vsoto RP  $0,1\%$  po 6 mesecih pri pogoju  $40\text{ }^{\circ}\text{C}/75\% \text{ RH}$ . Za napovedovanje smo predpostavili, da razkroj sledi 0. redu reakcij, kar se v našem primeru ni manifestiralo. Razlog za odstopanje je lahko kompleksen mehanizem razkroja omeprazola, ki lahko poteka preko raznih paralelnih in zaporednih reakcij, ki niso 0. reda.

Iz napovedi za porast vlage v ovojni (slika 15) je razvidno, da se vzorec v ovojni ne posuši toliko, kot smo teoretično napovedali in pričakovali. Glede na napovedi z upoštevanom dodano količino silikagela bi se moral, glede na rezultate izračuna, izdelek zaradi vezave vlage na silikagel posušiti do približno  $a_w = 0,29$ . Pri 6. mesecih izpostavljenosti pogojem pospešene stabilnosti bi se, glede na rezultate izračuna,  $a_w$  povečala na  $0,32$ . Praktično se vzorec posuši samo do  $a_w = 0,40$ ,  $a_w$  pa nato ostane približno konstanta skozi obdobje testiranja pospešene stabilnosti.



**Slika 16:** Primerjava teoretične napovedi stabilnosti pri  $40\text{ }^{\circ}\text{C}/75\% \text{ RH}$  in rezultati pridobljenimi s testiranjem dolgoročne stabilnosti.

## 5 SKLEP

Kot sledi iz namena, smo v prvem delu magistrske naloge uspešno razvili in validirali metodi za določanje vsebnosti vode s Karl Fischer titracijo in določanje vodne aktivnosti v peletah z omeprazolom. Pri razvoju metode za določanje vsebnosti vode v vzorcu s Karl Fischer titracijo smo imeli največ težav s slabim raztapljanjem pelet. S trenjem pelet v fin prah in izbiro mešanice metanola in formamida v volumskem razmerju 1 : 1 kot topila, smo dosegli ustrezno topnost pelet v topilu, za določanje vsebnosti vode. Razvito metodo smo nato validirali in potrdili njeno ustreznost za namen določanja vsebnosti vode v vzorcu. Glede na postavljene kriterije validacije smo potrdili, da je metoda natančna, linearna, točna in robustna. Tudi v primeru metode za določanje vodne aktivnosti smo z validacijo s preverjanjem natančnosti, točnosti in robustnosti potrdili ustreznost metode za namen uporabe.

V drugem, osrednjem, delu magistrske naloge smo preverili vpliv vlage na kemijsko stabilnost omeprazola v peletah z zakasnelim sproščanjem polnjenih v trde želatinaste kapsule. Najprej smo preverili, kako število kapsul v enoti ovojnine vpliva na porast vodne aktivnosti in vsebnosti vode. Ugotovili smo, da se v času pospešene stabilnosti v manjšem pakiranju pelete v kapsulah pod vplivom sušilnega sredstva nekoliko bolj posušijo, kot v pakiranju po 1000 kapsul v platenko. Ko je kapaciteta sušilnega sredstva presežena, se pelete v kapsulah v manjšem pakiranju, navlažijo nekoliko manj, kot pelete v kapsulah v večjem pakiranju. To je še posebej izraženo v primeru 40 mg odmerka kapsul. Ugotovili smo, da vsebnost vode v peletah polnjenih v kapsule občutno vpliva na kemijsko stabilnost omeprazola. Kapsule, ki so bile pred pakiranjem v platenke dodatno posušene, so bile v času testiranja pospešene stabilnosti stabilnejše. Tako smo pri dodatno posušeni kapsulah po 6 mesecih na pogoju 40 °C/75 % RH določili minimalen razkroj, tik nad mejo poročanja 0,05 %. Pri kapsulah, ki niso bile dodatno posušene, je vsota razkrojnih produktov po 6 mesecih pri omenjenem pogoju znašala približno 0,5 %. Ugotovili smo, da podaljšanje časa izpostavljenosti pogoju 40 °C/75 % RH občutno vpliva na porast vsote razkrojnih produktov. Preverili smo tudi vpliv higroskopske zdravilne učinkovine na kemijsko stabilnost farmacevtske oblike in ugotovili, da je vsota razkrojnih produktov nekoliko višja v primeru bolj higroskopske zdravilne učinkovine, kar je še posebej opazno v primeru večjega pakiranja po 1000 kapsul v platenko. Pokazali smo, da izdelek izkazuje dobro kemijsko stabilnost pri povišani temperaturi in vlagi v času testiranja pospešene stabilnosti, saj je vsota

razkrojnih produktov veliko nižja od specifikacijske meje  $\leq 2,0$  %. Zato lahko pričakujemo, da bo izdelek znotraj specifikacijskih mej tudi pri priporočenih pogojih shranjevanja. Kljub temu je za potrditev ustrezne (kemijske) stabilnosti le-to potrebno potrditi s testiranjem dolgoročne stabilnosti za čas roka uporabnosti, pri priporočenih pogojih shranjevanja.

V zadnjem delu magistrske naloge smo preverili možnost napovedovanja stabilnosti s pomočjo izračuna, ki temelji na prilagojeni Arrheniusovi enačbi s členom za vlago. Za naš vzorec smo izdelali praktično sorpcijsko izotermo za vlago, ki opisujejo razmerje med vodno aktivnostjo in vsebnostjo vode. Praktično sorpcijsko izotermo smo primerjali s teoretično, ki smo jo izračunali glede na masne deleže in znanih sorpcijskih izoterm za posamezno pomožno snov in zdravilno učinkovino. Pri tem smo ugotovili, da se izoterme razlikujeta, kar je najverjetneje posledica spremembe pomožnih snovi v tehnološkem procesu peletiranja. Preverili smo tudi možnost napovedovanja stabilnosti s pomočjo literaturnih podatkov in podatkov pridobljenih v kratkem času s pomočjo stresnih testov in testiranja pospešene stabilnosti. Napovedovanje smo izvedli s pomočjo izračuna na podlagi prilagojene Arrheniusove enačbe s členom za vlago, sorpcijsko-desorpcijskega prenosa vlage med komponentami v ovojni in prepustnosti ovojnine za vlago. Opazili smo, da zdravilna učinkovina omeprazol ne razpada s kinetiko reakcije 0. reda, kar je otežilo napovedovanje. Posledica tega je večja razlika v napovedi porasta razkrojnih produktov pri pospešenem testiranju stabilnosti, v primerjavi s praktično določeno. Pri napovedovanju dolgoročne stabilnosti za rok uporabnosti je bilo ujemanje večje. Napoved je bila primerljiva s praktičnimi rezultati, pridobljenimi pri 12 mesečnem terminu testiranja dolgoročne stabilnosti. Za bolj točno napoved, bi bilo potrebno uporabiti kinetični model paralelnih in zaporednih reakcij za opis razpada omeprazola in jo natančneje opisati v več točkah s pomočjo večjega števila podatkov, pridobljenih iz stresnih testov stabilnosti.

## 6 LITERATURA

- 1) Olbe L, Carlsson E, Lindberg PA: Proton-pump inhibitor expedition: The case histories of omeprazole and esomeprazole. *Nature Reviews Drug Discovery* 2003; 2: 132-9.
- 2) Mejia A, Kraft WK: Acid peptic diseases: pharmacological approach to treatment. *Expert review of clinical pharmacology*. 2009; 2: 295-314.
- 3) Ortanol SmPC (Lek), Centralna baza zdravil. Dostop: december 2017.  
[http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/DE2B2CE4EEDEE9A7C12579C2003F6681/\\$File/s-018011.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/DE2B2CE4EEDEE9A7C12579C2003F6681/$File/s-018011.pdf)
- 4) Esplugues JVA: Pharmacological Approach to Gastric Acid Inhibition. *Drugs* 2005; 1: 7-12.
- 5) Agatonovic-Kustrin S, Markovic N, Ginic-Markovic M, Mangan M, Glass BD: Compatibility studies between mannitol and omeprazole sodium isomers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2008; 48: 356-60.
- 6) Vrbanec T, Šket P, Merzel F, Smrkolj M, Grdadolnik P: Spectroscopic Characterization of Omeprazole and Its Salts. *Journal of Spectroscopy* 2017; Article ID: 6505706, 11 str., <https://doi.org/10.1155/2017/6505706>.
- 7) Yoshioka S, Stella VJ: *Stability of Drugs and Dosage Forms*. Kluwer Academic Publisher, New York, 2002: 1-2.
- 8) Waterman KC, Adami RC: Accelerated aging: Prediction of chemical stability of pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics* 2005; 293: 101-25.
- 9) Khan H, Ali M, Ahuja A, Ali J: Stability Testing of Pharmaceutical Products – Comparison of Stability Testing Guidelines. *Current Pharmaceutical Analysis* 2010; 6: 142-50.
- 10) Huynh-Ba K: *Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development (Regulations, methodologies and best practices)*. Springer, New York, 2008: 1-20, 43-92, 116-35.
- 11) ICH Guidance for Industry Q1A(R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products. Dostop december 2017.

[https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q1A\\_R2/Step4/Q1A\\_R2\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2_Guideline.pdf)

12) Carstensen JT, Rhodes CT: Drug Stability: Principles and Practices, 3rd Edition. Marcel Dekker Inc., New York, 2000: 2-17, 416-80.

13) EMEA Guideline on Stability testing: Stability testing of existing active substances and related finished products. Dostop: december 2017.

[https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-stability-testing-stability-testing-existing-active-substances-related-finished-products\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-stability-testing-stability-testing-existing-active-substances-related-finished-products_en.pdf)

14) Shargel L, Kafne, I: Generic Drug Product Development: Solid Oral Dosage Forms, Second Edition. CRC Press, Taylor & Francis Group, New York, 2014: 137-71.

15) Climatic Zones for Stability Studies. Dostop: december 2017

<https://www.pharmaguideline.com/2010/12/different-climatic-zones-for-stability.html>

16) Naveršnik K, Jurečič R: Humidity-corrected Arrhenius equation: The reference condition approach. International Journal of Pharmaceutics 2016; 500: 360-65.

17) Waterman KC: The Application of the Accelerated Stability Assessment Program (ASAP) to Quality by Design (QbD) for Drug Product Stability. AAPS PharmSciTech 2011; 12: 932-37.

18) Kummanaboyina B, Rhodes CT: Trends in Stability Testing, with Emphasis on Stability During Distribution and Storage. Drug Development and Industrial Pharmacy 1999; 25: 857-68.

19) Blessy M, Patel RD, Prajapati PN, Agrawal YK: Development of forced degradation and stability indicating studies of drug – A review. Journal of Pharmaceutical Analysis 2014; 4: 159-65.

20) Sanjay B, Saranjit S: Methods for Stability Testing of Pharmaceuticals. Springer, New York, 2018: 53-75, 213-32.

21) Mettler-Toledo: Good Titration Practice in Karl Fischer Titration. Dostop: december 2017.

<https://www.mt.com/dam/LabDiv/Campaigns/TestingLabs2013/moisture/package/gtp-karl-fischer-EN.pdf>

- 22) MacLeod SK: Moisture Determination Using Karl Fischer Titrations. Analytical Chemistry 1993; 63: 557-66.
- 23) Jamnik A: Fizikalna kemija, skripta, Ljubljana: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2013: 336.
- 24) Barbosa-Canovas GV, Fontana AJ Jr, Schmidt JS, Labuza TP: Water Activity in Foods, Fundamentals and Applications. Blackwell Publishing, New Jersey, 2007: 15-28.
- 25) Airaksinen S: Role of Excipients in Moisture Sorption and Physical Stability of Solid Pharmaceutical Formulations. Akademski disertacija, Univerza v Helsinkih, Fakulteta za farmacijo, 2005.
- 26) The Role of Water Activity in ICH Guidelines and QbD in the Pharmaceutical Market. Dostop: december 2017.  
[http://manuals.decagon.com/Application%20Notes/13972\\_Role%20of%20Water%20Activity%20in%20ICH%20Guidelines%20and%20QbD%20in%20Pharmaceutical%20Market\\_Print.pdf](http://manuals.decagon.com/Application%20Notes/13972_Role%20of%20Water%20Activity%20in%20ICH%20Guidelines%20and%20QbD%20in%20Pharmaceutical%20Market_Print.pdf)
- 27) European Pharmacopoeia, 8th Edition, Council of Europe, Strasbourg 2013, 353-57.
- 28) Pharmaceutical Applications for Water Activity. Dostop: december 2017.  
<http://www.aqualab.com/assets/Uploads/PharmaceuticalApplicationforAw.pdf>
- 29) Lallanilla M: What Is Dew Point? Dostop: december 2017.  
<https://www.livescience.com/43269-what-is-dew-point.html>
- 30) AquaLab Series 4TE Water Activity Meter Operator's Manual. Dostop: junij 2018.  
[http://library.metergroup.com/Manuals/20115\\_AQUALAB4\\_Manual\\_Web.pdf](http://library.metergroup.com/Manuals/20115_AQUALAB4_Manual_Web.pdf)
- 31) Qiu F, Scrivens G: Accelerated Predictive Stability (APS), Fundamentals and Pharmaceutical Industry Practices. Elsevier Science, London, 2018: 3-14, 34-72, 100, 106-45.
- 32) ICH smernica Q1E: Evaluation of stability data. Dostop: december 2017.  
[https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q1E/Step4/Q1E\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1E/Step4/Q1E_Guideline.pdf)

- 33) Saripella KK, Mallipeddi R, Neau SH: Crospovidone interactions with water. II. Dynamic vapor sorption analysis of the effect of polypasdoneparticle size on its uptake and distribution of water. *International Journal of Pharmaceutics* 2014; 475: 174-80.
- 34) Waterman KC, Macdonald BC: Package Selection for Moisture Protection for Solid, Oral Drug Products. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2010; 99: 4437-52.
- 35) Fundamentals of Moisture Sorption Isotherms. Dostop: december 2018.  
[https://pittcon.org/wp-content/uploads/2016/02/Aqualab\\_Fundamentals-of-Moisture-Sorption-Isotherms.pdf](https://pittcon.org/wp-content/uploads/2016/02/Aqualab_Fundamentals-of-Moisture-Sorption-Isotherms.pdf)
- 36) Kontny MJ, Zografi G: Sorption of water by solids. V: Physical characterization of pharmaceutical solids. Marcel Dekker Inc., New York, 1993: 387-418.
- 37) IUPAC Recommendations. Reporting Physisorption data for gas/solid systems. *Pure and Applied Chemistry* 1985; 57: 603-19.
- 38) Zografi G, Kontny MJ: The interactions of water with cellulose- and starch-derived pharmaceutical excipients. *Pharmaceutical Research* 1986; 3: 187-94.
- 39) Greenspan L: Humidity Fixed Points of Binary Saturated Aqueous Solutions. *Journal of Research of the National Bureau of Standards – A. Physics and Chemistry* 1997; 81: 89-96.
- 40) Omeprazole 40 mg capsules (Sandoz Limited), SmPC. Dostop: junij 2018.  
<https://www.medicines.org.uk/emc/product/4894/smpc#EXCIPIENTS>
- 41) Zografi G, Grandofli GP, Kontny MJ, Mendenhall DW: Prediction of moisture transfer in mixtures of solids: transfer via the vapour phase. *International Journal of Pharmaceutics* 1988; 42: 77-78.
- 42) Waterman KC, Carella AJ, Gumkowski MJ, Lukulay P, MacDonald BC, Roy MC, Shamblin SL: Improved protocol and data analysis for accelerated shlef-life estimation of solid dosage forms. *Pharmaceutical Research* 2007; 24: 780-90.

## 7 PRILOGE

Priloga 1: Vrednoteni parametri pri validaciji razvite KF metode in upoštevani kriteriji (nadaljevanje na naslednji strani).

| PARAMETER                                                                                                                                                                                    | KRITERIJI                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Natančnost metode znotraj dneva</b><br>(ponovljivost)                                                                                                                                     | <u>RSD (<math>n \geq 6</math>):</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <math>\leq 2,5 \%</math> za nivo vode <math>\geq 5 \%</math></li> <li>○ <math>\leq 5 \%</math> za nivo vode <math>2 - 5 \%</math></li> <li>○ <math>\leq 10 \%</math> za nivo vode <math>0,6 - 1 \%</math></li> <li>○ <math>\leq 20 \%</math> za nivo vode <math>0,2 - 0,5 \%</math></li> <li>○ <math>\leq 30 \%</math> za nivo vode <math>&lt; 0,2 \%</math></li> </ul> $n = 6: t_{tab}(0,05, n-1) = 2,571; t_{tab}(0,01, n-1) = 4,032^*$                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>Natančnost metode med dnevi.</b> Vključuje tudi <b>rigidnost metode.</b><br><br>Merimo na istem oz. drugem inštrumentu/ drug analitik/ drugi dan ali na drugem inštrumentu/isti analitik. | <u>RSD (<math>n \geq 6</math>): enako kot znotraj dneva</u><br><u>RSD (<math>n \geq 12</math>):</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <math>\leq 4 \%</math> za nivo vode <math>\geq 5 \%</math></li> <li>○ <math>\leq 8 \%</math> za nivo vode <math>2 - 5 \%</math></li> <li>○ <math>\leq 15 \%</math> za nivo vode <math>0,6 - 1 \%</math></li> <li>○ <math>\leq 30 \%</math> za nivo vode <math>0,2 - 0,5 \%</math></li> <li>○ <math>\leq 40 \%</math> za nivo vode <math>&lt; 0,2 \%</math></li> </ul> $n = 12: t_{tab}(0,05, n-1) = 2,201; t_{tab}(0,01, n-1) = 3,106^*$<br><u>Relativna sprememba povprečne vsebnosti glede na natančnost metode znotraj dneva:</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <math>\leq 4 \%</math> za nivo vode <math>\geq 5 \%</math></li> <li>○ <math>\leq 8 \%</math> za nivo vode <math>2 - 5 \%</math></li> <li>○ <math>\leq 15 \%</math> za nivo vode <math>0,6 - 1 \%</math></li> <li>○ <math>\leq 30 \%</math> za nivo vode <math>0,2 - 0,5 \%</math></li> <li>○ <math>\leq 40 \%</math> za nivo vode <math>&lt; 0,2 \%</math></li> </ul> |
| <b>Linearnost metode</b> od QL oz. vsaj od $80 \%$ do min. $150 \%$ specifikacijske meje (vključno s $120 \%$ )                                                                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <math>R^2 \geq 0,98</math></li> <li>○ <math>\pm 25 \%</math> odstop odseka na y-osi glede na specifikacijsko mejo</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| <b>Točnost metode</b> od QL oz. vsaj od $80 \%$ do $120 \%$ specifikacijske meje. Izvedba z vzorcem in vodnim standardom z znano vsebnostjo vode.                                            | <u>Povprečni izkoristek:</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ za nivo vode <math>&lt; 0,2</math>: <math>70 - 130 \%</math></li> <li>○ za nivo vode <math>0,2 - 0,5</math>: <math>80 - 120 \%</math></li> <li>○ za nivo vode <math>0,6 - 5</math>: <math>90 - 110 \%</math></li> <li>○ za nivo vode <math>&gt; 5</math>: <math>95 - 105 \%</math></li> </ul> $n = 3: t_{tab}(0,05, n-1) = 4,303^*$<br><u>RSD po nivojih (<math>n = 3</math>):</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <math>\leq 30 \%</math> za nivo vode <math>&lt; 0,2 \%</math></li> <li>○ <math>\leq 20 \%</math> za nivo vode <math>0,2 - 0,5 \%</math></li> <li>○ <math>\leq 10 \%</math> za nivo vode <math>0,6 - 5 \%</math></li> <li>○ <math>\leq 2,5 \%</math> za nivo vode <math>&gt; 5 \%</math></li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <b>Robustnost metode.</b><br><br>Zatehte vzorca od $50 \%$ do $150 \%$ .                                                                                                                     | <u>RSD (<math>n = 3</math>): kriterij enak kot znotraj dneva</u><br><u>RSD (<math>n \geq 6</math>):</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <math>\leq 4 \%</math> za nivo vode <math>\geq 5 \%</math></li> <li>○ <math>\leq 8 \%</math> za nivo vode <math>2 - 5 \%</math></li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

|                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                                                                                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <math>\leq 15\%</math> za nivo vode 0,6 – 1 %</li> <li>○ <math>\leq 30\%</math> za nivo vode 0,2 – 0,5 %</li> <li>○ <math>\leq 40\%</math> za nivo vode <math>&lt; 0,2\%</math></li> </ul> <p><math>n = 6</math>: <math>t_{tab}(0,05, n-1) = 2,571</math>; <math>t_{tab}(0,01, n-1) = 4,032^*</math></p> <p><u>Relativna sprememba povprečne vsebnosti glede na natančnost metode znotraj dneva:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <math>\leq 4\%</math> za nivo vode <math>\geq 5\%</math></li> <li>○ <math>\leq 8\%</math> za nivo vode 2 – 5 %</li> <li>○ <math>\leq 15\%</math> za nivo vode 0,6 – 1 %</li> <li>○ <math>\leq 30\%</math> za nivo vode 0,2 – 0,5 %</li> <li>○ <math>\leq 40\%</math> za nivo vode <math>&lt; 0,2\%</math></li> </ul> |
| <p>* Opomba: Vsi rezultati morajo biti znotraj intervala zaupanja pri 95 % (<math>t_{tab}(0,05)</math>) zanesljivosti oz. pri 99 % (<math>t_{tab}(0,01)</math>) zanesljivosti.</p> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

Priloga 2: Vrednoteni parametri pri validaciji metode za merjenje vodne aktivnosti in upoštevani kriteriji.

| PARAMETER                                                                                                                                                                                                                | KRITERIJI                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Natančnost metode znotraj dneva</b><br>(ponovljivost).<br>Minimalno 6 paralelk vzorca.                                                                                                                                | <u>RSD (<math>n \geq 6</math>):</u> <ul style="list-style-type: none"> <li><math>\leq 10\%</math> za <math>a_w \geq 0,15\%</math></li> <li><math>\leq 20\%</math> za <math>a_w &lt; 0,15\%</math></li> </ul> $n = 6: t_{tab}(0,05, n-1) = 2,571; t_{tab}(0,01, n-1) = 4,032^*$                                                                                                                                                                        |
| <b>Natančnost metode med dnevi.</b> Vključuje tudi <b>rigidnost metode.</b><br>Merimo na istem oz. drugem inštrumentu/ drug analitik/ drugi dan ali na drugem inštrumentu/isti analitik.<br>Minimalno 6 paralelk vzorca. | <u>RSD (<math>n \geq 6, 12</math>):</u> <ul style="list-style-type: none"> <li><math>\leq 10\%</math> za <math>a_w \geq 0,15\%</math></li> <li><math>\leq 20\%</math> za <math>a_w &lt; 0,15\%</math></li> </ul> <p>Absolutna sprememba povprečne <math>a_w \leq 0,05</math><br/> <math>n = 6: t_{tab}(0,05, n-1) = 2,571; t_{tab}(0,01, n-1) = 4,032^*</math><br/> <math>n = 12: t_{tab}(0,05, n-1) = 2,201; t_{tab}(0,01, n-1) = 3,106^*</math></p> |
| <b>Točnost metode.</b> Izvedemo v treh paralelkah na vzorcu, ki je bil predhodno izpostavljen v stabilnostni komori na pogojih $25\text{ }^\circ\text{C}/60\% \text{ RH}$ za minimalno 5 dni.                            | Absolutna razlika med pravo in izmerjeno vrednostjo: $\leq 0,05$<br><br>Posamezni in celokupni izkoristek za $a_w = 0,60$ : $91,0 - 109,0\%$<br><br><u>RSD po nivojih (<math>n \geq 3</math>):</u> <ul style="list-style-type: none"> <li><math>\leq 10\%</math> za <math>a_w \geq 0,15\%</math></li> <li><math>\leq 20\%</math> za <math>a_w &lt; 0,15\%</math></li> </ul> $n = 3: t_{tab}(0,05, n-1) = 4,303^*$                                     |
| <b>Robustnost metode.</b><br>Izvedemo v treh paralelkah pri temperaturi $20\text{ }^\circ\text{C}$ , $22,5\text{ }^\circ\text{C}$ in $25\text{ }^\circ\text{C}$ .                                                        | <u>RSD (<math>n \geq 3, 6</math>):</u> <ul style="list-style-type: none"> <li><math>\leq 10\%</math> za <math>a_w \geq 0,15\%</math></li> <li><math>\leq 20\%</math> za <math>a_w &lt; 0,15\%</math></li> </ul> <p>Absolutna sprememba <math>a_w</math> (znotraj dneva / robustnost): <math>\leq 0,05</math><br/><br/> <math>n = 6: t_{tab}(0,05, n-1) = 2,571; t_{tab}(0,01, n-1) = 4,032^*</math></p>                                               |
| * Opomba: Vsi rezultati morajo biti znotraj intervala zaupanja pri $95\%$ ( $t_{tab}(0,05)$ ) zanesljivosti oz. pri $99\%$ ( $t_{tab}(0,01)$ ) zanesljivosti.                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |