Primjena NIR spektroskopije u istraživanju otpuštanja alopurinola iz neobloženih tableta s trenutnim oslobađanjem

Smetiško, Jelena

Doctoral thesis / Disertacija

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:266489

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Jelena Smetiško

APPLICATION OF NIR SPECTROSCOPY IN THE STUDY OF ALLOPURINOL DISSOLUTION FROM IMMEDIATE RELEASE UNCOATED TABLETS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2017



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Jelena Smetiško

PRIMJENA NIR SPEKTROSKOPIJE U ISTRAŽIVANJU OTPUŠTANJA ALOPURINOLA IZ NEOBLOŽENIH TABLETA S TRENUTNIM OSLOBAĐANJEM

DOKTORSKI RAD

Mentor:
izv. prof. dr. sc. Snežana Miljanić

Zagreb, 2017.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Jelena Smetiško

APPLICATION OF NIR SPECTROSCOPY IN THE STUDY OF ALLOPURINOL DISSOLUTION FROM IMMEDIATE RELEASE UNCOATED TABLETS

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Dr. Snežana Miljanić, Associate Professor

Zagreb, 2017

Ovaj rad izrađen je Belupu d.d. lijekovi i kozmetika u sektoru Istraživanje i razvoj, odjel Analitički laboratoriji,
pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Snežane Miljanić
sa Zavoda za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Sadržaj

SAŽETAK ..... **XI**
ABSTRACT ..... **XIII**
§ 1. UVOD **1**
§ 2. LITERATURNI PREGLED **3**
2.1. Oslobađanje djelatne tvari **3**
2.1.1. Uloga oslobađanja *3*
2.1.2. Povijesni pregled *4*
2.1.3. Teorija mehanizma oslobađanja *5*
2.1.4. Opis uređaja i postupak analize *6*
2.1.5. Razvoj metode za oblike s trenutnim oslobađanjem *9*
2.1.6. Uloga pomoćnih tvari u otpuštanju djelatne tvari *12*
2.2. NIR spektroskopija **14**
2.2.1. Uvod u NIR spektroskopiju *14*
2.2.2. NIR instrumenti i načini mjerenja *16*
2.2.3. Razvoj i validacija NIR spektroskopske metode *17*
2.2.4. Primjena NIR spektroskopije u farmaceutskoj analizi *22*
2.2.4.1. Kvalitativna analiza *22*
2.2.4.2. Kvantitativna analiza *24*
2.2.4.2.1 Sadržaj vode, sadržaj i ujednačenost sadržaja djelatne tvari *24*
2.2.4.2.2 Kvantitativno praćenje fizikalnih parametara *27*
2.2.5. Procesna tehnologija kontrolirana NIR spektroskopijom *28*
2.2.6. NIR spektroskopija i oslobađanje *30*
2.3. Djelatna tvar alopurinol **36**
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO **39**
3.1. Uzorci sirovina i tableta **39**
3.2. Kemikalije za analizu oslobađanja **39**
3.3. Mjerni uređaji **40**
3.3.1. Snimanje NIR spektara *40*
3.3.2. Obrada NIR spektara i multivarijatna analiza podataka *40*
3.3.3. Analiza oslobađanja djelatne tvari *40*

3.3.4. Mjerenje promjera, debljine i tvrdoće tableta *40*
3.4. Referentna metoda oslobađanja djelatne tvari **41**
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA **43**
4.1. Opis uzoraka tableta **43**
4.2. Analiza oslobađanja alopurinola referentnom metodom **47**
4.2.1. Utjecaj sastava tableta *47*
4.2.2. Utjecaj fizikalnih parametara tableta *53*
4.2.3. Utjecaj uvjeta skladištenja tableta *57*
4.2.4. Usporedba komercijalnih serija *59*
4.3. NIR spektroskopija **63**
4.3.1. NIR spektri pojedinačnih sastojaka tableta *63*
4.3.2. Utjecaj fizikalnih svojstava na izgled NIR spektara *71*
4.3.3. Kvantitativna analiza oslobađanja alopurinola *83*
4.3.3.1. Oslobađanje alopurinola u 15. minuti *83*
4.3.3.2. Oslobađanje alopurinola u 20. minuti *96*
4.3.3.3. Oslobađanje alopurinola u 30. i 45. minuti *102*
4.3.3.4. Oslobađanje alopurinola u 5. i 10. minuti *111*
§ 5. ZAKLJUČAK **119**
§ 6. POPIS KRATICA I SIMBOLA **121**
§ 7. LITERATURNI IZVORI **123**
§ 8. PRILOZI ..... **XV**
§ 9. ŽIVOTOPIS ..... **XXIV**

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

PRIMJENA NIR SPEKTROSKOPIJE U ISTRAŽIVANJU OTPUŠTANJA ALOPURINOLA IZ NEOBLOŽENIH TABLETA S TRENUTNIM OSLOBAĐANJEM

Jelena Smetiško
Belupo d.d. lijekovi i kozmetika

Spektroskopija bliskog infracrvenog zračenja (NIRS) primijenjena je u istraživanju otpuštanja alopurinola iz tableta s trenutnim oslobađanjem (>85% u 15 minuta) doze 100 i 200 mg. Razvijeno je šest zasebnih PLS kalibracijskih modela za 5., 10., 15., 20., 30. i 45. minutu uzorkovanja u svrhu predviđanja oslobođene djelatne tvari. Uzorci iz 57 različitih serija uključeni u razvoj modela sadržavali su deklariranu količinu alopurinola, a razlikovali su se prema kvalitativnom i kvantitativnom sastavu pomoćnih tvari, tvrdoći, obliku, debljini i promjeru tableta, proizvodnom postupku, te proizvođaču djelatne tvari gotovog lijeka. Referentne vrijednosti oslobođenog alopurinola određene su pomoću primarne UV/Vis metode koja se koristi u rutinskoj analizi. Korelacijom referentnih vrijednosti i NIR spektara snimljenih difuznom refleksijom zračenja postignute su zadovoljavajuće vrijednosti koeficijenata korelacije, pristranosti predviđanja, nagiba, rezidualnog odstupanja predviđanja i korijena srednjih kvadratnih pogrešaka za 15. minutu oslobađanja, kao primarno vrijeme uzorkovanja, te za 20., 30. i 45. minutu. Rezultatima analize na setu uzoraka koji nije bio uključen u razvoj kalibracijskih modela potvrdila se mogućnost primjene NIR tehnike kao brže i jednostavnije alternative uobičajenim postupcima određivanja oslobođenog alopurinola. Multivarijatna tehnika PCA osigurala je dodatne informacije o fizikalno–kemijskim osobinama proizvoda koje nije bilo moguće opaziti klasičnim načinom analize.

(xxiv + 130 stranica, 61 slika, 17 + 3 tablica, 135 literaturna navoda, izvornik na hrvatskom jeziku)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: alopurinol/ kemometrika/ oslobađanje/ NIR spektroskopija / tablete s vrlo brzim oslobađanjem

Mentor: izv. prof. dr. sc. Snežana Miljanić

Rad prihvaćen: 6. prosinca 2017.

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Tomica Hrenar, PMF, Zagreb
izv. prof. dr. sc. Snežana Miljanić, PMF, Zagreb
dr. sc. Mladen Litvić., v. zn. sur., Belupo d.d., Hrvatska

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

APPLICATION OF NIR SPECTROSCOPY IN THE STUDY OF ALLOPURINOL DISSOLUTION FROM IMMEDIATE RELEASE UNCOATED TABLETS

Jelena Smetiško
Belupo, Pharmaceuticals & Cosmetics, Inc.

Near infrared spectroscopy (NIRS) was used in the study of allopurinol dissolution from immediate release tablets (>85% in 15 minutes) of 100 and 200 mg doses. Six separate PLS calibration models were developed for the 5th, 10th, 15th, 20th, 30th and 45th minute sampling points for prediction of dissolution of active substance. In the model development samples from 57 different series with declared amount of allopurinol, different qualitative and quantitative composition of excipients, hardness, shape, diameter and thickness of tablets, variation in production process and different manufacturer of finished product were introduced. Allopurinol dissolution reference values were measured by the routinely used UV/Vis method. Correlating reference values with NIR spectra measured in the diffuse reflectance mode satisfied values of correlation coefficients, bias, slope, residual prediction determination and root mean square errors for the 15th minute, set as a primary sampling point, and also for the 20th, 30th and 45th minute. Results of the analysis on a set of samples not used for calibration models development confirmed possibility of NIR technique as a faster and simpler alternative to classical dissolution testing methods. Multivariate technique PCA gave additional information about physical and chemical product properties which could not be obtained by classical method of analysis.

(xxiv + 130 pages, 61 figures, 17 + 3 tables, 135 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: allopurinol/ chemometrics/ dissolution/ NIR spectroscopy/ very fast dissolution rate tablets

Supervisor: Dr. Snežana Miljanić, Associate Proffesor

Thesis accepted: December 6, 2017

Reviewers: Dr. Tomica Hrenar, Professor, PMF, Zagreb
Dr. Snežana Miljanić, Associate Professor, PMF, Zagreb
Dr. Mladen Litvić, Senior Research Associate, Belupo Inc., Croatia

§ 1. UVOD

Proizvodnja lijekova vrlo je složen i strogo reguliran proces, pri čemu analiza oslobađanja djelatne tvari ima ključnu ulogu u prikupljanju informacija o kvaliteti i postojanosti gotovog proizvoda svake proizvedene serije te o mogućoj varijabilnosti u formulaciji i proizvodnom postupku. Oslobađanje djelatne tvari izražava se u postocima, a opisuje omjer mase djelatne tvari otpuštene iz ljekovitog oblika u otopinu i deklarirane mase djelatne tvari svake pojedinačne dozne jedinice. Obavezan je parametar u kontroli kvalitete gotovog ljekovitog oblika, kao i tijekom njegovog razvoja. Provodi se na svim krutim, polukrutim i tekućim oblicima koji prolaze postupak apsorpcije u organizmu u svrhu dobivanja željenog terapeutskog učinka. Unatoč vrlo širokoj primjeni, mnogi faktori koji se ne odnose na kvalitetu proizvoda, već potječu od samog postupka provođenja analize, mogu ubrzati ili usporiti mehanizam oslobađanja djelatne tvari i znatno utjecati na završni rezultat. Osim toga, rutinska analiza je dugotrajna, uz obaveznu upotrebu spektrofotometrijskih ili kromatografskih tehnika.

Alternativni pristup konvencionalnim metodama u farmaceutskoj analizi uključuje primjenu spektroskopije bliskog infracrvenog zračenja (engl. *Near Infrared Spectroscopy*, NIRS) u kombinaciji s multivarijatnim statističkim metodama. Spektroskopija bliskog infracrvenog zračenja je tehnika koja se u farmaceutskoj industriji značajnije koristi zadnjih dvadesetak godina. Postupno se uvodi i postaje nezamjenjiva u svim segmentima proizvodnje lijekova koji uključuju procese istraživanja i razvoja djelatnih tvari, kao i gotovih farmaceutskih oblika te proizvodni postupak. Vrlo važnu ulogu ima i u procesnoj analitičkoj tehnologiji (engl. *Process Analytical Technology*, PAT). Tehnika je vrlo brza, jednostavna i nedestruktivna. Spektar se može snimiti u svega nekoliko sekundi, bez prethodne pripreme uzoraka i bez otapala uz minimalnu intervenciju analitičara. Istovremeno je moguće pratiti nekoliko kemijskih i fizikalnih svojstava različitih analita u gotovo svakoj matrici, u laboratoriju ili direktno na mjestu proizvodnje. Takvim postupkom analize predviđa se otpuštanje djelatne tvari iz pojedinačne dozne jedinice bez provođenja klasičnog načina analize oslobađanja. No, razvoj takve NIR metode vrlo je zahtjevan proces. Robustan i pouzdan kalibracijski model, a kasnije i sama metoda zahtjeva set uzoraka u koji su uključene varijacije u kemijskim i fizikalnim osobinama uzoraka, kao i kritičnih proizvodnih

parametara. Nekolicina znanstvenih radova na tu temu ukazuje na mogućnost zamjene klasičnog postupka oslobađanja djelatne tvari s NIRS metodama. Opisane metode odnose se na tablete s prilagođenim oslobađanjem ili trenutnim oslobađanjem s manje od 85% otpuštene djelatne tvari u 15 minuta kao *off-line*[1-5] i *in-line*[6,7] analize. Razvoj NIRS metode za tablete s vrlo brzim oslobađanjem (>85% u 15 minuta) još je zahtjevniji postupak jer je potrebno osigurati set uzoraka čije su referentne vrijednosti jednoliko raspoređene duž cijelog kalibracijskog raspona, a to uključuje varijacije u formulaciji i proizvodnom postupku. Kod klasičnog načina provođenja analize oslobađanja većina podataka koja se odnosi na promjenu fizikalnih parametara ili manjih varijacija u sastavu tableta, nepovratno je izgubljena u 15. minuti uzorkovanja pa su referentne vrijednosti vrlo slične. Ranijim vremenima uzorkovanja unose se dodatne pogreške koje vrlo često proizlaze iz postupka provođenja analize pa relativna standardna devijacija može biti vrlo visoka.

Primjena NIR spektroskopije u određivanju oslobađanje djelatne tvari s vrlo brzim oslobađanjem nije dovoljno istražena, a upravo je zastupljenost navedenog oblika lijeka izrazito velika. Detaljnom analizom spektara mogle bi se dobiti informacije koje nije moguće utvrditi načinom analize koja se rutinski koristi.

Svrha ovog rada je primijeniti NIR spektroskopiju kao brzu i učinkovitu metodu pri određivanju oslobađanja alopurinola iz neobloženih tableta s vrlo brzim oslobađanjem (>85% u 15 minuta) doze 100 i 200 mg te na temelju NIR spektara dobiti informacije o fizikalnim i kemijskim parametrima koji utječu na mehanizam oslobađanja, a nije ih moguće očitati iz referentnih vrijednosti. Snimljeni spektri će se detaljno analizirati i po potrebi matematički obraditi te kao takvi uključiti u kalibracijski model parcijalnog postupka najmanjih kvadrata (engl. *Partial Least Squares*, PLS) uz podatke o oslobađanju alopurinola određenih UV/Vis spektrofotometrijom kao primarnom tehnikom. Obzirom da se djelatna tvar iz istraživanog ljekovitog oblika vrlo brzo oslobađa, naglasak će biti na 15. minuti, uz dodatno proučavanje i ostalih vremena uzorkovanja (5., 10., 20., 30. i 45. minuta). Primjenom analize po glavnim komponentama (engl. *Principal Component Analysis*, PCA) za koju nisu potrebni podaci određeni primarnom metodom, pratit će se fizikalno–kemijske razlike tableta alopurinola samo na temelju snimljenih NIR spektara.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Oslobađanje djelatne tvari

2.1.1. Uloga oslobađanja

Industrijska proizvodnja gotovih ljekovitih oblika vrlo je skup, složen i dugotrajan proces. Potrebno je zadovoljiti sve propisane zahtjeve dobre proizvođačke prakse (engl. *Good Manufacturing Practice*, GMP) kako bi se osigurala kvaliteta proizvoda i njegova namjena. Osim referentnih (izvornih) ljekovitih oblika na tržištu su prisutni i razni generički lijekovi jednakih svojstava i djelotvornosti. Generički lijek ima isti kvalitativni sastav, istu količinu djelatne tvari i jednakog je farmaceutskog oblika kao referentni lijek čija je bioekvivalencija dokazana pogodnim studijama bioraspoloživosti.[8] Bioraspoloživost (engl. *Bioavailability*, BA) je brzina i stupanj apsorpcije djelatne tvari iz farmaceutskog oblika definirana krivuljom odnosa koncentracije i vremena u sistemskoj cirkulaciji ili izlučivanjem u urinu. Generički lijek je bioekvivalentan (engl. *Bioequivalent*, BE) referentnom lijeku ako je njihova bioraspoloživost usporediva nakon primjene u istoj molarnoj koncentraciji.[9] Iako je generički lijek vrlo vjerna kopija izvornog lijeka, njegova proizvodnja također mora zadovoljiti sva GMP načela. Najširu primjenu i proizvodnju imaju oralni oblici poput tableta, kapsula i suspenzija.

Ključnu ulogu u razvoju generičkih lijekova ima analiza oslobađanja djelatne tvari koja se provodi na dva različita načina, ovisno o svrsi prikazivanja trenutnog stanja proizvoda. Razlikujemo profile oslobađanja koji uključuju više točaka uzorkovanja tijekom vremena i tzv. obično oslobađanje s najčešće jednom točkom uzorkovanja. Obično oslobađanje jedan je od najvažnijih parametara rutinske kontrole kvalitete proizvoda. U ranoj fazi razvoja proizvoda provode se analize profila oslobađanja za odabir pogodne formulacije i detektiranje kritičnih varijabli u proizvodnom postupku. Uspoređuju se rezultati razvojnog i referentnog lijeka dobiveni pri jednakim uvjetima. Profili moraju biti usporedivi kako bi se smatralo da su proizvodi ekvivalentni. Nakon što je proizvod razvijen i odobren u svrhu komercijalne proizvodnje, profilima oslobađanja potvrđuje se njegova postojanost. Usporedbu profila oslobađanja potrebno je provesti nakon uvođenja kritičnih promjena u formulaciji i

proizvodnom postupku, zamjene postojećih komponenata proizvoda koje su kemijski istovrsne, ali različitog porijekla ili različitih fizikalnih svojstava te u svrhu praćenja stabilnosti proizvoda kako bi se provjerilo i očuvalo inicijalno stanje ljekovitog oblika.[10]

Druga važna uloga profila oslobađanja je u studijama *in vitro–in vivo* korelacije (engl. *in vitro–in vivo correlation*, IVIVC). Kada se profili oslobađanja generičkog i referentnog lijeka međusobno podudaraju te postoji IVIVC, tj. smatra se da se analizom *in vitro* oslobađanja može predvidjeti koncentracija lijeka u plazmi, u nekim slučajevima nije potrebno provoditi *in vivo* bioekvivalenciju. Taj uvjet zadovoljavaju gotovi oblici za oralnu primjenu koji se vrlo brzo otapaju, a djelatna tvar je dobro topljiva i dobro permeabilna. Time se smanjuju troškovi i ubrzava postupak razvoja proizvoda.[11,12]

Rutinska kontrola kvalitete svake proizvedene serije gotovog oblika ne zahtjeva usporedbu profila oslobađanja već farmakopejski opisane postupke koji su posljedica definiranih uvjeta proizašlih iz analize profila oslobađanja.

2.1.2. Povijesni pregled

Danas nije moguće zamisliti razvoj bilo kojeg krutog oralnog ljekovitog oblika ili rutinsku proizvodnju bez provođenja analize oslobađanja. Sami počeci istraživanja započeli su krajem 19. stoljeća i nisu bili vezani uz lijekove, nego jedna od tema istraživanja na području fizikalne kemije. Prve analize provedene su na teško topljivoj benzojevoj kiselini i olovnom kloridu 1897. godine (Noyes i Whitney) u uređaju pomoću kojeg su dobivene određene spoznaje o povezanosti brzine oslobađanja s koncentracijom otopljene tvari u određenom vremenu. Kasnije je razvijeno još nekoliko modela baziranih na postojanju difuznog sloja. Model difuznog sloja fizikalno je objašnjenje procesa oslobađanja u kojemu je ograničavajući faktor difuzija molekula otopljene tvari preko tekućeg filma koji obavija krutu tvar. Pomoću prvih uređaja za analizu oslobađanja, koji su bili slični današnjim, doneseni su prvi zaključci o ovisnosti fizikalnih svojstava tvari o uvjetima rotacije, površini izloženoj mediju, temperaturi i sl.[13]

U farmaceutskoj znanosti postupak oslobađanja djelatne tvari na krutim oralnim oblicima počeo se proučavati tek 1950–tih godina, a u prve monografije američke farmakopeje uveden je 1970–tih godina.[14] Preteča oslobađanja kao obaveznog parametra kontrole kvalitete gotovog proizvoda bila je raspadljivost. Raspadljivost je parametar koji se

još uvijek provodi u procesnoj kontroli krutih oralnih oblika, a postupak je opisan u općim poglavljima farmakopeja. Dobiveni rezultat je vrijeme potrebno za potpuni raspad krutog oblika u vodi ili propisanom mediju pri 37 °C.[15] Tim postupkom nije moguće opisati djelovanje lijeka, a niti prikupiti dovoljno informacija o fizikalno–kemijskim svojstvima gotovog proizvoda pa je bilo nužno uvesti parametar koji to može. U rijetkim slučajevima, kod oblika s trenutnim oslobađanjem čija je djelatna tvar vrlo topljiva, raspadljivost može zamijeniti oslobađanje, ali samo u svrhu rutinske kontrole gotovog proizvoda.[16] U razdoblju od 1950. do 1980. godine proučavala se povezanost oslobađanja i bioraspoloživosti lijeka. Istovrsni proizvodi različitih proizvođača pokazali su značajne razlike u rezultatima.[13] U današnje vrijeme oslobađanje se smatra okosnicom biofarmaceutskog sustava klasifikacije (engl. *Biopharmaceutics Classification System*, BCS).[17]

2.1.3. Teorija mehanizma oslobađanja

Otpuštanje lijeka iz ljekovitog oblika može biti trenutačno, sa zakašnjenjem ili produljeno, ovisno o vrsti i načinu djelovanja djelatne tvari u organizmu. Opisuje se pomoću različitih teorijskih/kinetičkih modela kao brzina prijenosa mase s krute površine u medij pri standardiziranim uvjetima temperature i sastava otapala te graničnog sloja tekućina/krutina. Tri su osnovna koraka: (1) molekule otapala ili komponenata medija gibaju se prema granici tekućina/krutina određenom brzinom, (2) proces adsorpcije na granici tekućina/krutina, (3) otopljene čestice lijeka gibaju se prema preostalom volumenu medija. Na mehanizam oslobađanja djelatne tvari iz tableta utječu brzina rotacije, temperatura, viskoznost, pH i sastav medija.[18]

Higuchi je naveo tri fizikalna modela kojima se može opisati mehanizam oslobađanja čistih tvari. Prvi je model difuznog sloja koji opisuje brzinu oslobađanja kao difuziju krutih čestica iz statičnog tekućeg filma (debljine *H*/cm) koji obavija krutu površinu u preostali medij prema prvom Fickovom zakonu:

$$J = -D_{\mathrm{f}} \times \frac{dc}{dx} \qquad (1)$$

gdje je J količina tvari koja okomito prolazi kroz površinu po jedinici vremena, D_f difuzijski koeficijent, a dc/dx koncentracijski gradijent. Jednom kada čestice krutine uđu u preostali volumen medija, koncentracijski gradijent nestaje. Koncentracijski gradijent je konstantan u slučaju *sink* uvjeta pri čemu je i brzina oslobađanja ravnomjerna.

Model međupovršinske prepreke nadovezuje se na prvi model uz opis savladavanja slobodne energetske barijere prije procesa otapanja krutine. Danckwertov model opisuje makroskopske pakete otapala koji nasumično dolaze do granice krutina/tekućina uz vrtlog difuzije.[19]

Vrsta djelatne tvari, polimorfna forma, veličina čestica, topljivost i količina te formulacija također utječu na kinetiku njenog otpuštanja.[11] Gotovo je nemoguće izvesti matematički model koji bi točno opisao složeni proces oslobađanja. Modeli koji se najčešće koriste su Higuchiev model, model nultog reda, Weibullov model i Korsmeyer–Peppas model u kojima je oslobođena količina djelatne tvari opisana kao funkcija vremena ($Q = f(t)$).[20] Odabir najpogodnijeg modela ovisi o vrstama gotovog oblika uz primjenu linearne regresije. Primjerice, model nultog reda kao i Higuchiev model mogu dovoljno precizno opisati oslobađanje djelatne tvari iz krutih gotovih oblika s produljenim oslobađanjem u hidrofilnoj matrici.[21,22]

Najjednostavniji prikaz oslobađanja opisuje se u dva stupnja. Prvi stupanj čini raspadanje gotovog oblika, a drugi stupanj otpuštanje djelatne tvari iz raspadnutih čestica u medij. Brzinu oslobađanja definira sporiji korak.[23]

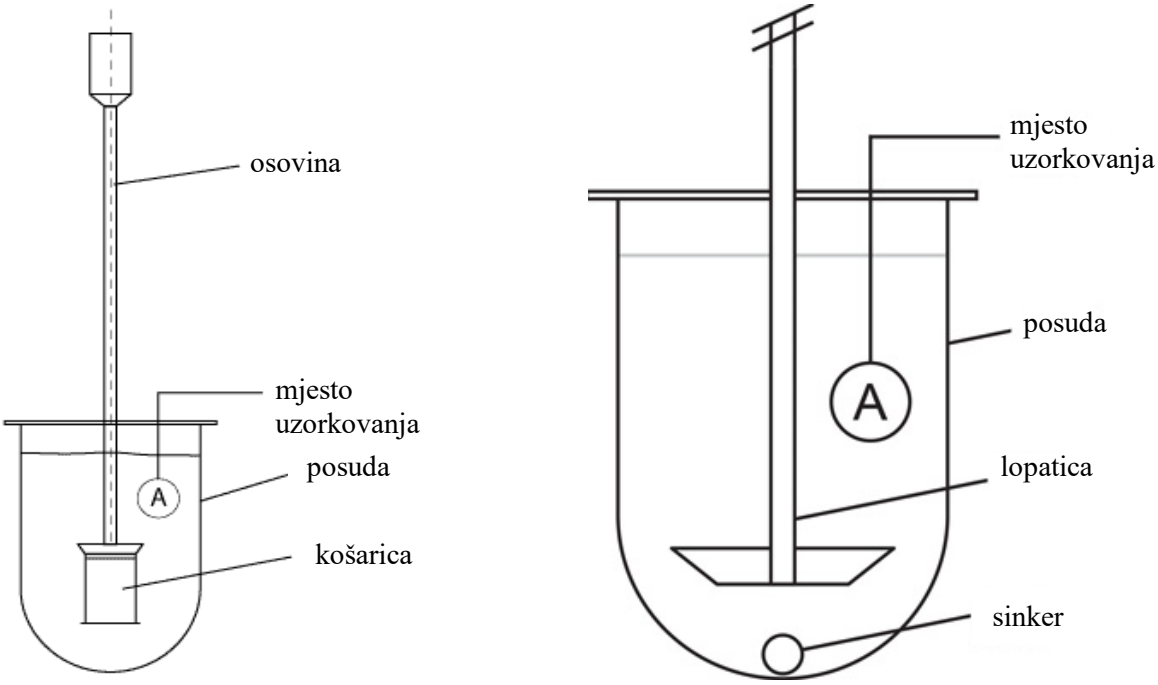
2.1.4. Opis uređaja i postupak analize

Analiza oslobađanja djelatne tvari iz gotovog farmaceutskog oblika provodi se u dva dijela. Prvi dio uključuje testiranje određene dozne jedinice u uređaju za oslobađanje pri strogo propisanim uvjetima, a drugi dio je određivanje koncentracije otpuštene djelatne tvari u otopini. Postoji sedam različitih tipova uređaja, a njihov odabir ovisi o vrsti gotovog oblika.[14] Prvi izbor za krute oralne oblike poput tableta i kapsula su uređaji prikazani na slici 1. Specifikacije uređaja, uvjeti i načini provođenja analiza propisani su u farmakopejama. Europska, američka i japanska farmakopeja usuglasile su zahtjeve i postupke analize oslobađanja kako bi dobiveni rezultati bili usporedivi neovisno o laboratoriju u kojemu je analiza provedena.[24]

Glavni dijelovi uređaja su posude u kojima se oslobađanje provodi te motor i prijenosna osovina s košaricom (uređaj 1) ili lopaticom (uređaj 2). Najčešća konfiguracija se sastoji od 6, 8 ili 12 posuda koje su djelomično uronjene u vodenu kupelj. Vodena kupelj održava temperaturu otopina u posudama na 37±0,5 °C tijekom cijele analize. Posude su napravljene od stakla ili nekog drugog inertnog i transparentnog materijala. Cilindričnog su oblika, najčešće okruglog dna i volumena od jedne litre. Dimenzije osovina, košarica i lopatica te njihov položaj u posudi također su propisani, a materijal od kojeg su izrađeni mora biti inertan i izdržljiv. Vibracije koje proizlaze iz samog uređaja i neusuglašenost postupaka oko provođenja analize mogu imati utjecaj na rezultate pa moraju biti kontrolirani.[25] Američka farmakopeja propisuje način te zahtjeve mehaničke i kemijske provjere uređaja koju je potrebno provoditi periodički u kraćim vremenskim intervalima (svakih 6 mjeseci ili češće) kako bi se osigurala pouzdanost dobivenih rezultata.[26]

Volumen medija u svakoj posudi je između 500 mL i 1000 mL, a najčešće 900 mL s maksimalno dozvoljenim odstupanjem od 1%. Prije početka analize potrebno je ukloniti mjehuriće zraka zbog mogućeg utjecaja na proces oslobađanja. Dopušteno maksimalno odstupanje od zadanog pH je unutar 0,05 jedinica.[25]

Najčešća brzina rotacije košarica je 100 okr./min, a lopatica između 50 i 75 okr./min. Brzine rotacija ispod 25 okr./min i iznad 150 okr./min nisu preporučljive zbog nejednolikog miješanja medija. Vrijeme analize kod oblika s trenutnim oslobađanjem je između 30 i 60 minuta i jednom točkom uzorkovanja, ako se analiza provodi u svrhu kontrole kvalitete gotovog proizvoda. Analiza oralnih oblika s prilagođenim oslobađanjem provodi se tijekom nekoliko sati uz više točaka uzorkovanja.[27] Uzorkovanje je potrebno provesti unutar propisanog vremena uz maksimalno odstupanje od 2%, iz područja na sredini između površine medija i vrha rotirajuće košarice ili lopatice, najmanje 1 cm od stjenke posude.[25]



Slika 1. Uređaji za oslobađanje: a) uređaj 1 (košarice)[28], b) uređaj 2 (lopatice).[29]

Nehomogenost hidrodinamičkih uvjeta prisutna je i kod predloženih brzina rotacije posebno u uređaju 2 te može imati utjecaj na krajnji rezultat. Stoga se velika pažnja posvećuje položaju krutih oblika u posudi koji bi trebali biti centrirani na dnu.[30]

Sam postupak analize vrlo je jednostavan. Kod uređaja 1 dozna jedinica stavi se u košaricu koja se zatim uroni u medij i pokrene rotacija. U slučaju lopatica, gotovi oblik se ubaci u posudu i pokrene rotacija. Nakon propisanog vremena rotacije izvadi se određena količina otopine, profiltrira i izmjeri.[25] Filtriranje otopine potrebno je provesti odmah nakon uzorkovanja kako bi se uklonile neotopljene čestice djelatne i pomoćnih tvari. Osim stvaranja poteškoća prilikom mjerenja, čestice se mogu nastaviti otapati pa izračunata koncentracija otopljene djelatne tvari ne bi odgovarala stvarnoj koncentraciji u propisanom vremenu uzorkovanja.[27] Mjerenje koncentracije otpuštene djelatne tvari najčešće se provodi UV/Vis spektrofotometrijom ili tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC).[31] Rezultati se izražavaju kao postotak oslobođene djelatne tvari u propisanom vremenu izračunan u odnosu na deklariranu vrijednost dozne jedinice. Analiza oslobađanja provodi se na svim djelatnim tvarima koje gotovi oblik sadrži. Jednu analizu oslobađanja čini 6 uzoraka gotovog oblika.

2.1.5. Razvoj metode za oblike s trenutnim oslobađanjem

Razvoj metode započinje prikupljanjem informacija o kemijskim i fizikalnim osobinama djelatne i pomoćnih tvari koje čine gotovi oblik. Na temelju tih podataka i informacija o proizvodnom postupku odabiru se najpovoljniji uvjeti oslobađanja.

Djelatne tvari klasificiraju se prema topljivosti u vodenim medijima i intestinalnoj permeabilnosti, a postupak se naziva BCS klasifikacija. Kod povezivanja BCS klasifikacije s procesom oslobađanja uzimaju se u obzir tri glavne značajke djelatne tvari kao što su njeno otpuštanje, topljivost i intestinalna permeabilnost, a dijele se u četiri kategorije: (1) dobro topljive i dobro permeabilne, (2) slabo topljive i dobro permeabilne, (3) dobro topljive i slabo permeabilne, (4) slabo topljive i slabo permeabilne. Supstancija se smatra dobro topljivom ako se količina maksimalne doze otopi u 250 mL vodenog medija.[32]

Izbor medija ovisi o topljivosti i stabilnosti djelatne tvari koje se ispituju u vodenim otopinama u rasponu pH od 1 do 7,5. Najčešće se koriste vodene otopine razrijeđene klorovodične kiseline (0,1 mol L^{-1} ili 0,01 mol L^{-1}), fosfatni ili acetatni puferi te simulirani želučani ili crijevni sokovi. U slučaju vrlo slabe topljivosti djelatne tvari moguće je dodati surfaktant najniže koncentracije pri kojoj je topljivost djelatne tvari minimalno tri puta veća od količine prisutne u jednoj dozi (*sink* uvjeti). Voda kao medij može se koristiti samo ako oslobađanje ne ovisi o vrsti korištenog medija, no obično se izbjegava. Kvaliteta vode varira iz dana u dan kao i pH koji nije strogo kontroliran kao kod pufera. Topljivost i stabilnost djelatne tvari ispituju se pri temperaturi od 37 °C. Jedan od najvažnijih uvjeta pri odabiru medija je postizanje *sink* uvjeta jer tada dobiveni rezultati oslobađanja odražavaju osobine doze lijeka u cjelini, a ne samo topljivost kao najčešći limitirajući faktor. Navedene uvjete moguće je postići u volumenu 500–1000 mL. Odabir pogodnog uređaja ovisi o formulaciji i ponašanju oblika. Blagim uvjetima oslobađanja prate se moguće varijabilnosti koje proizlaze iz promjena u formulaciji ili proizvodnog postupka. Prvi izbor je uređaj 2 pri rotaciji od 50 okr./min. Ako pri tim uvjetima nije moguće zadovoljiti tražene limite za količinu minimalno oslobođene djelatne tvari, brzina rotacije postupno se povećava. Tablete ili kapsule, nakon što se ubace u posudu s medijem te pokrene rotacija, moraju biti na dnu čaše. Plutanje po površini medija te gibanje u čaši sa svakim zamahom lopatice potrebno je izbjegavati. U tom slučaju moguće je koristiti pogodan pribor (sinkeri) kao pomoć pri potapanju koji prije standardne upotrebe mora biti provjeren u sklopu validacije metode. To je najčešće žica savinuta

nekoliko puta oko gotovog oblika ili košarice različitih dimenzija koje propuštaju odgovarajuću količinu medija. Drugi izbor je uređaj 1 pri rotaciji od 100 okr./min.[14,27]

Metoda prije redovnog korištenja mora biti validirana prema standardnim parametrima validacije metode, a to su: selektivnost, utjecaj filtera, linearnost, točnost, preciznost, robustnost, stabilnost otopina.[33,34]

Pravilan izbor uvjeta oslobađanja osigurava pouzdane rezultate koji su usporedivi s drugim rezultatima istog proizvoda. Varijabilnosti rezultata u sklopu istog testa moraju biti definirane i kontrolirane jer u protivnom nije moguće pratiti razlike u formulaciji, a kasnije niti provjeravati kvalitetu proizvoda. Rezultati se smatraju vrlo varijabilnim kada je relativna standardna devijacija na 12 uzoraka veća od 20% u vremenu od 10 minuta ili kraćem te veća od 10% u svakom sljedećem vremenu uzorkovanja. Metoda koja se koristi u rutinskoj kontroli mora biti robustna, ponovljiva i diskriminatorna.[35]

Prilikom razvoja proizvoda, a samim time i metode za oslobađanje provode se profili oslobađanja. Odabire se osnovni medij i propisuje vrijeme analize koji će se kasnije koristiti u rutinskoj analizi. U svrhu bioekvivalencije, analiza profila oslobađanja provodi se u tri različita medija pri pH 1,2 (pufer klorovodične kiseline), pH 4,5 (fosfatni, acetatni ili citratni pufer) i pH 6,8 (fosfatni pufer) bez dodataka surfaktanata. Uzorkovanje se provodi u više točaka, a najčešće u 10., 15., 20., 30., 45. i 60. minuti. Kod proizvoda koji imaju vrlo brzo oslobađanje moguće je provesti i uzorkovanje u 5. minuti.[36] Dobiveni rezultati razvojnog generičkog i referentnog lijeka uspoređuju se različitim matematičkim i statističkim metodama. Najčešće matematičke metode su izračunavanje faktora f_1 i f_2 koje opisuju Moor i Flannerove jednadžbe i Recignov indeks ξ_i.[20] Od navedenih matematičkih metoda prvi izbor prema europskim i američkim smjernicama je izračun faktora f_2 koji se naziva faktorom sličnosti:

$$f_2 = 50 \times \log\left[\frac{100}{\sqrt{1+\frac{\sum_{t=1}^{t=n}\left[\bar{R}(t)-\bar{T}(t)\right]^2}{n}}}\right] \qquad (2)$$

gdje je n broj točaka uzorkovanja; $R(t)$ srednja vrijednost oslobođene djelatne tvari referentnog lijeka na 12 jedinica u vremenu t izražena kao postotak; $T(t)$ srednja vrijednost oslobođene djelatne tvari testiranog lijeka na 12 jedinica u vremenu t izražena kao postotak. Upotrebljava se za oblike koji oslobode manje od 85% djelatne tvari u 15 minuta, na minimalno tri točke (isključujući nulu), a najviše jedna točka smije imati vrijednost veću od 85%. Relativna standardna devijacija prve točke uzorkovanja mora biti manja od 20%, a svaka sljedeća manja od 10%. Profili oslobađanja su podudarni ako je vrijednost f_2 između 50 i 100. Oblici koji oslobode više od 85% djelatne tvari u 15 minuta smatraju se usporedivim i nije potrebno provoditi druge matematičke i statističke testove.[12,36]

Statističke metode koje nisu izričito navedene u smjernicama za industriju kod usporedbe profila, ali se koriste kada izračunavanje f_2 faktora nije pogodno su: analiza varijance, multivarijatne metode (*Hotelling* T^2 test) te Chow i Ki′s metoda.[37]

Metoda koja se koristi u rutinskoj analizi ima samo jedan (osnovni) medij i jedno vrijeme uzorkovanja. Ovisno o rezultatima profila oslobađanja, moguće je proglasiti jedan od tri medija osnovnim. Osnovni medij mora zadovoljiti postavljen općeniti zahtjev za količinu oslobođene djelatne tvari u propisanom vremenu. Ukoliko to nije moguće, odabire se medij koji može zadovoljiti postavljene uvjete, a u slučaju slabe topljivosti djelatne tvari dodaje se surfaktant.[14,27]

U zahtjevu kvalitete za količinu oslobođene djelatne tvari navodi se samo donja granica, tj. najmanja količina djelatne tvari koju neki oblik mora osloboditi u zadanom vremenu. Proizvodi koji oslobode više od 85% djelatne tvari u 15 minuta klasificiraju se kao oblici s vrlo brzim oslobađanjem. Brzo oslobađanje imaju oblici koji oslobode više od 85% djelatne tvari u 30 minuta, a sporo oslobađanje oblici koji oslobode 85% u više od 30 minuta.[17] Općeniti zahtjev je minimalno 80% (Q = 75%) oslobođene djelatne tvari u 45 minuta za svaki od 6 pojedinačnih uzoraka.[38] Ako zahtjev nije zadovoljen u prvom stupnju, analiza se ponavlja na još 6 uzoraka. Dobivena srednja vrijednost na 12 uzoraka ne smije biti niža od postavljenog limita te niti jedan uzorak ne smije osloboditi manje od Q–15%. Kada rezultati ne odgovaraju niti drugom stupnju, analiza se odrađuje na još 12 uzoraka. Za treći stupanj oslobađanja srednja vrijednost svih 24 uzoraka ne smije biti niža od Q, najviše dva uzorka smiju osloboditi manje od Q–15%, a niti jedan ne smije osloboditi manje od Q–25%.[25]

2.1.6. Uloga pomoćnih tvari u otpuštanju djelatne tvari

Fizikalno–kemijska svojstva djelatne tvari važan su faktor u procesu njenog otpuštanja iz gotovog oblika, no ne i jedini. Ista djelatna tvar može imati trenutno ili produljeno oslobađanje iz tableta ili kapsula, a način oslobađanja ovisi o vrsti primijenjene terapije. Mogućnost kontroliranog otpuštanja djelatnih tvari najviše ovisi o pomoćnim tvarima koje su sastavni dio svakog ljekovitog oblika. Njihova uloga je osigurati pravilno terapeutsko djelovanje djelatne tvari s kojom moraju biti kemijski i fizikalno kompatibilne, spriječiti moguću degradaciju i olakšati primjenu.[39] Dijele se u nekoliko kategorija, ovisno o formulaciji čiji su sastavni dio. Tablete obično sadrže pomoćne tvari koje imaju funkciju punila, vezivnog sredstva (vlažnog ili suhog), sredstva za raspadljivost, lubrikanta, kliznog sredstva, bojila, ovojnice, sredstva za modificirano otpuštanje djelatne tvari i dr. Dodijeljena funkcija ovisi o masenom udjelu u pojedinoj vrsti gotovog oblika.[40] Najjednostavnija neobložena tableta, osim djelatne tvari, sadrži punilo, lubrikant, vezivno sredstvo i sredstvo za raspadljivost. Variranje omjera pomoćnih tvari može utjecati na profil oslobađanja djelatne tvari neovisno o njezinim fizikalno–kemijskim svojstvima.[41] Fizikalna svojstva pojedinih pomoćnih tvari poput veličine čestica, polimorfnog oblika te sadržaja prisutne vode definiraju i proizvodni postupak.

Punila povećavaju masu i volumen doze te je drže konstantnim, a pravilan odabir osigurava stabilan proizvodni postupak (pravilno tečenje i homogenost smjese, optimalnu tvrdoću tableta, stvaranje granula i sl.) i odgovarajuću ujednačenost sadržaja, raspadljivost, oslobađanje i stabilnost. Najčešće se koriste laktoza monohidrat, mikrokristalična celuloza, šećeri i manitol. [42]

Postupak vlažne granulacije vrlo često se primjenjuje u proizvodnji tableta i kapsula. Tijekom procesa smjesa praha pomoćnih i djelatnih tvari miješanjem s granulacijskom otopinom prelazi u granule. Vezivna sredstava se otapaju ili raspršuju u granulacijskoj tekućini (voda ili organsko otapalo) i dodaju u smjesu praha. Sušenjem se uklanja tekućina, a preostalo kruto vezivno sredstvo osigurava pogodnu veličinu, oblik i masu granula. Djelatna tvar ostaje zarobljena u granuli čime se sprječava moguće razdvajanje u sljedećim koracima proizvodnje. Također, tijekom faze tabletiranja osigurava se pravilno sabijanje i odgovarajuća kakvoća tableta.[43] Vezivna sredstva su najčešće prirodni i sintetički polimeri, a o njihovim kemijskim svojstvima kao što su struktura, funkcionalne skupine i umreženost te fizikalno svojstvo poput viskoznosti ovisi odabir za pojedini gotovi oblik.[42]

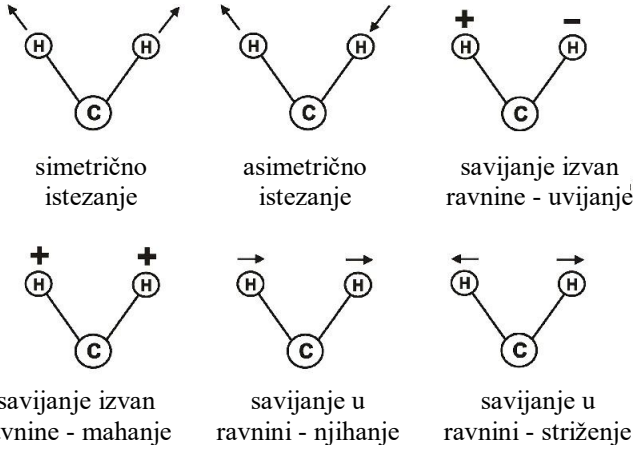
Sredstva za raspadljivost dodaju se u formulaciju kako bi se tablete brže podijelile na manje dijelove čime se zbog veće površine olakšava otpuštanje djelatne tvari. Zakašnjelo raspadanje može uzrokovati nepotpunu apsorpciju i djelovanje lijeka u organizmu. Imaju hidrofobna svojstva, a sam proces raspadljivosti najvjerojatnije je baziran na pokušajima hidratacije. U doticaju s vodenim otopinama bubre i uzrokuju pucanje tableta. Najširu primjenu imaju škrob (kukuruzni, krumpirov) te karboksimetil celuloza.[44]

Uloga lubrikanta je smanjenje sila trenja između čestica te čestica i metalnih površina proizvodne opreme prilikom proizvodnje krutih oralnih oblika. Klasificiraju se kao „granični" lubrikanti, fluid film lubrikanti i tekući lubrikanti. Magnezijev stearat je granični lubrikant s najčešćom primjenom kod tableta s trenutnim oslobađanjem, a sastoji se od polarne glave i dugih lanaca masnih kiselina. Kritični korak je osigurati dovoljnu količinu i homogenost lubrikanta u smjesi kako bi se spriječilo lijepljenje za metalne dijelove tijekom tabletiranja ili oštećenost tableta. Također, predugo vrijeme miješanja smanjuje tvrdoću tableta te produžuje vrijeme raspadanja i otpuštanje djelatne tvari što u konačnici može utjecati i na bioraspoloživost. Preporučeni maseni udio u tabletama iznosi 0,25–5%, a odgovarajuća količina odabire se po načelu ugradnje kvalitete u proizvod (engl. *Quality by Design*, QbD).[45,46]

2.2. NIR spektroskopija

2.2.1. Uvod u NIR spektroskopiju

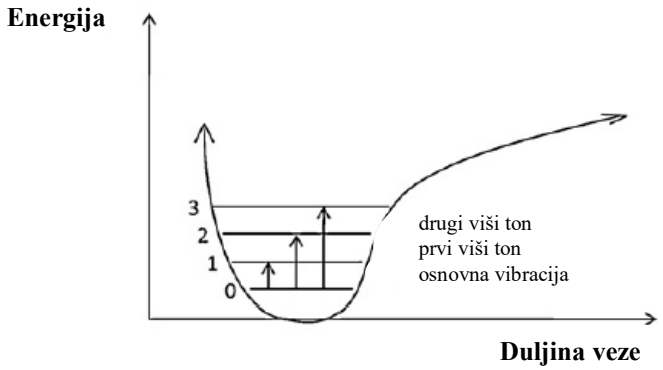
Blisko infracrveno područje (engl. *near infrared*, NIR) obuhvaća elektromagnetsko zračenje u rasponu od 12800 do 4000 cm^{-1} (780–2500 nm).[47] Opaženi spektar posljedica je apsorpcije zračenja kojom se pobuđuju vibracijski prijelazi, a vrpce u spektrima odgovaraju vibracijama tijekom kojih se mijenja dipolni moment. Dva su osnovna načina vibriranja: istezanje veza i deformacija kuteva. Vibracije istezanja javljaju se pri kraćim valnim duljinama u odnosu na vibracije savijanja. Istezanje može biti simetrično i asimetrično, a savijanje u ravnini i izvan ravnine. Za skupine koje sadrže središnji atom jedne vrste na koji su vezana dva atoma druge vrste savijanje u ravnini dijeli se na striženje i njihanje, a izvan ravnine na mahanje i uvijanje (slika 2).[48]



Slika 2. Osnovni načini vibriranja molekula.

NIR spektar čine kombinacije osnovnih (temeljnih) vibracija i viši tonovi. Viši tonovi nastaju uslijed apsorpcije zračenja kojima se pobuđuju prijelazi iz osnovnog vibracijskog stanja u drugo, treće i svako više vibracijsko stanje, dok su kombinacijske vrpce posljedica istovremene apsorpcije zračenja tijekom dviju vibracija. Kombinacijske vrpce jačeg su intenziteta od vrpci viših tonova. Postojanje viših tonova uvjetovano je anharmoničnošću vibracije (slika 3). Potencijalna energija u ravnotežnom stanju je niska. Približavanjem atoma inducira se odbijanje, a rezultat je povišena energija. Udaljavanje atoma jednog od drugog isprva dovodi do međusobnog privlačenja i više energije, no daljnje razdvajanje rezultira disocijacijom. Dozvoljeni su samo određeni vibracijski prijelazi koji u anharmoničnom

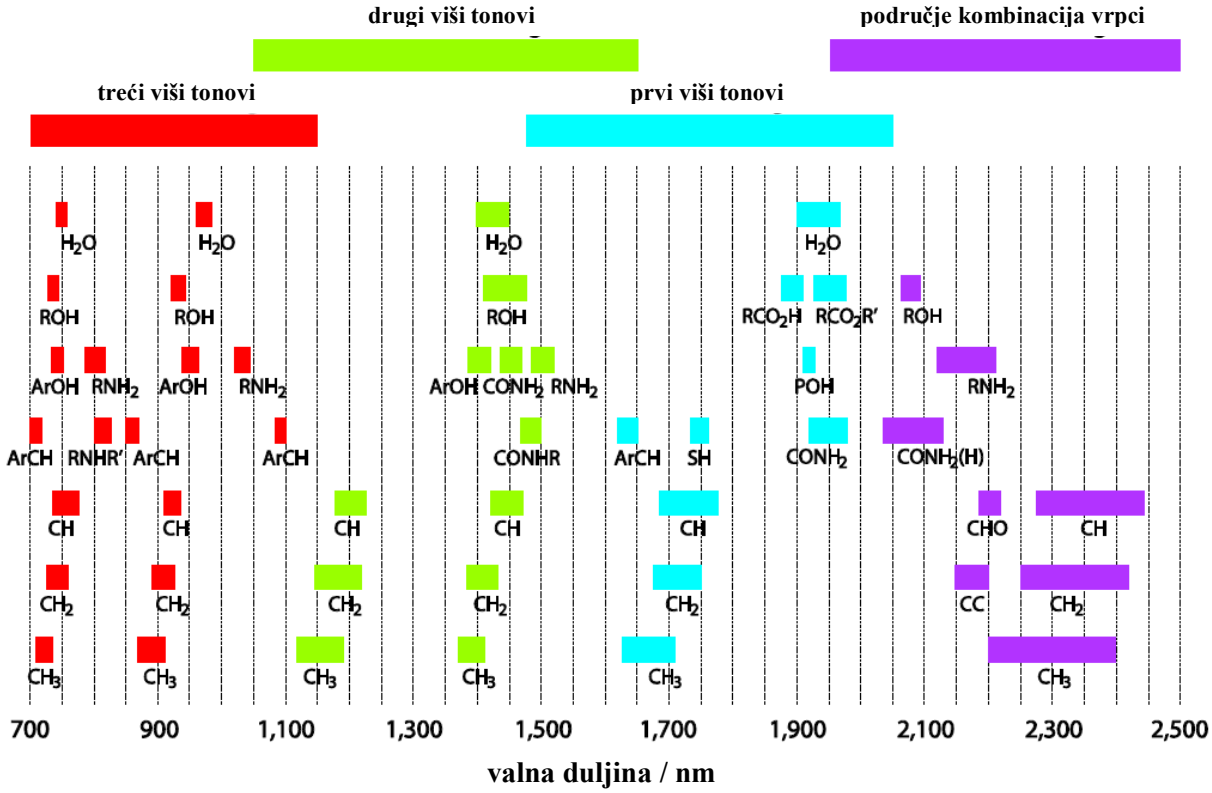
modelu nisu ekvidistantni. Veća razlika između termova ($\Delta v = \pm 1,2,3 \ldots$) znači i smanjeni intenzitet vrpci.[49,50]



Slika 3. Anharmonički vibracijski model.[50]

Vrpce u NIR području slabijeg su intenziteta (10–10000 puta) i šire od vrpci osnovnih vibracija u srednjem infracrvenom području (engl. *mid infrared*, MIR) od kojih potječu. Srednje infracrveno područje obuhvaća raspon od 4000 do 400 cm^{-1} (2500–25 nm). Najintenzivnije vrpce potječu od vibracija veza C–H (aldehidi, alkani, alkeni, alkini, aromatski sustavi), N–H (amidi, amini), O–H (alkoholi, karboksilne skupine) i S–H. Također, opažaju se i vrpce vibracije veza C=O (aldehidi, amidi, karboksilne kiseline, esteri, ketoni), C–N (amini, aromatske skupine, alkilne skupine), C–O (alkoholi, eteri i esteri) i NO_2. Zbog niske molarne apsorptivnosti duljina puta zračenja u čvrstim i tekućim uzorcima mjeri se u milimetrima što omogućava direktnu analizu uzoraka bez prethodne pripreme.[51]

Precizna asignacija vrpci u bliskom infracrvenom području vrlo je otežana jer jedna vrpca može biti posljedica nekoliko različitih kombinacija osnovnih vibracija i viših tonova koje se ujedno i preklapaju.[52] Spektri u NIR području sadrže informacije o razlikama u jačini veza, kemijskih vrsta, elektronegativnosti i vodikovoj vezi. Postojanje vodikove veze očituje se u pomaku vrpci prema višim valnim duljinama, a smanjenje jačine vodikove veze zbog razrjeđenja i više temperature pomiče ih prema nižim valnim duljinama.[48]



Slika 4. Područja valnih duljina vrpci vibracija pojedinih funkcionalnih skupina u NIR području elektromagnetskog zračenja.[53]

2.2.2. NIR instrumenti i načini mjerenja

Osnovni dijelovi NIR spektrometra su izvor zračenja, monokromator ili interferometar i detektor. Upadno zračenje oslabljeno je zbog apsorpcije ili raspršenja na molekulama uzoraka, a mjeri se kao transmisija ili refleksija. Najčešći monokromatori su akustičko–optički prilagodljivi filter (engl. *acousto–optical tuneable filter*, AOTF), rešetke ili prizme. U spektrometru s Fourierovom transformacijom valne duljine razdvajaju se pomoću interferometra. Kao izvor zračenja koriste se volfram–halogene žarulje visoke radne temperature. Detektor može biti silicijev, olovni sulfid, indij galij arsenid (InGaAs) i deuterirani triglicin sulfat. Uzorak se mjeri u kvarcnim kivetama, direktno ili pomoću optičkih vlakana, ovisno o njegovoj vrsti i načinu mjerenja. Mjerenje se najčešće provodi na dva načina, transmisijom i refleksijom te rjeđe kombinacijom jednog i drugog tj. transfleksijom.[54,55]

Transmitancija (propusnost) mjera je intenziteta zračenja kao funkcija valne duljine nakon prolaska (transmisije) zrake kroz uzorak. Uzorak se prilikom mjerenja postavlja u položaj između izvora zračenja i detektora. Mjere se otopine, disperzije ili krutine, a rezultat je moguće izraziti kao transmitanciju (T) ili apsorbanciju (A) tj. $\log_{10}(1/T)$. Prije snimanja spektara uzoraka potrebno je snimiti pozadinski referentni spektar, što može biti zrak, prazna ćelija, otapalo, referentni uzorak i sl. Difuzna refleksija se primjenjuje većinom na krutim uzorcima, a omjer je intenziteta reflektiranog zračenja uzorka i pozadine referentne površine. Najčešći referentni materijali su keramika, polimeri i zlato. Zračenje pada na uzorak koji ga pri određenim uvjetima apsorbira, te procesima raspršenja reflektira do detektora. Izmjereni spektar prikazan je kao ovisnost log ($1/R$) o valnoj duljini ili valnom broju.[56]

Načini mjerenja ovise o vrsti uzoraka kao i o parametru analize. Izgled spektara ovisi i o nekim vanjskim parametrima kao što su temperatura, vlaga i vibracije koje je potrebno kontrolirati. Spektrometri imaju nekoliko načina primjene, mogu biti laboratorijski, procesni analizatori u proizvodnji ili ručni (prijenosni). Instrumenti koji se koriste u laboratoriju zahtijevaju visoku osjetljivost i pouzdanost izmjerene vrijednosti, dok je brzina manje važna. Primjenjuju se za razvoj metoda, kao i u kontroli kvalitete ulaznih sirovina i gotovog proizvoda. Procesni analizatori moraju biti brzi, robustni, bez dijelova koji se pokreću i neosjetljivi na vanjske vibracije, a položaj optičkih vlakana ili uzoraka ne smije imati utjecaj na krajnji rezultat analiziranog parametra. Spektri snimljeni refleksijom zračenja obično sadrže i informacije karakteristične za proizvodni postupak tj. svojevrsni otisak prsta. Za brzu identifikaciju sirovina u skladištu ili u svrhu detektiranja krivotvorenih lijekova koriste se prijenosni NIR instrumenti vrlo malih dimenzija.[57,58]

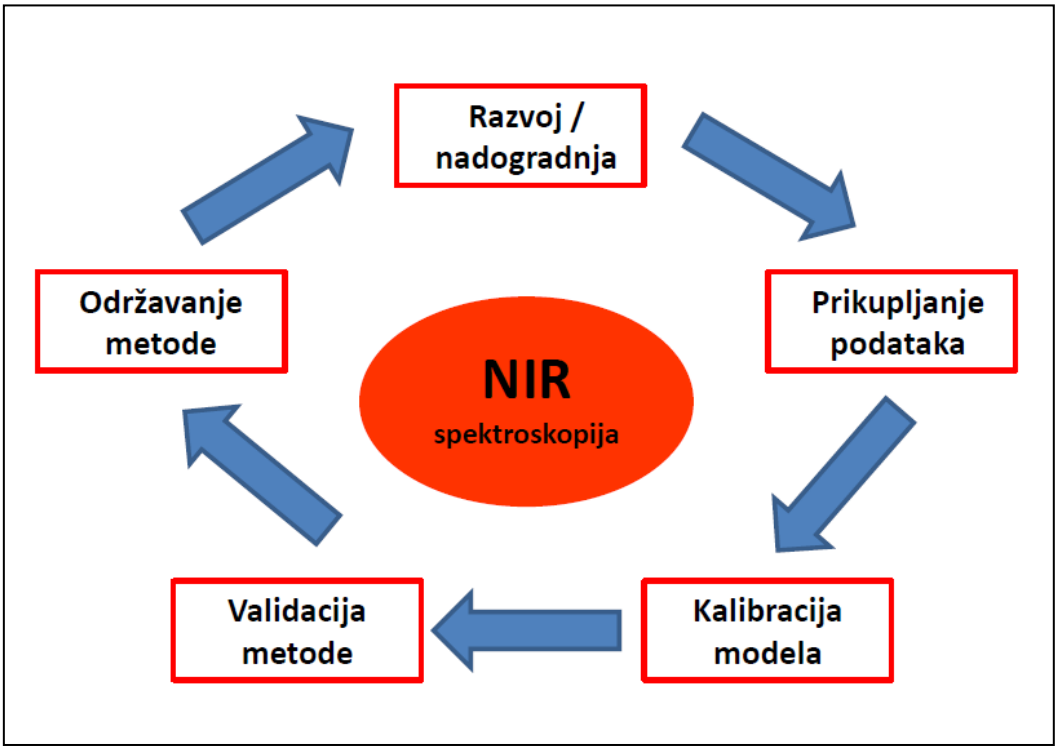
2.2.3. Razvoj i validacija NIR spektroskopske metode

Razvoj NIR metode za kvalitativna i kvantitativna ispitivanja prilično je zahtjevan i dugotrajan proces, a za dobivanje željenih podataka iz snimljenih spektara neophodno je korištenje kemometrike. Kemometrika je kemijska disciplina koja se bavi predviđanjem i optimiziranjem pokusa te dobivanjem optimalne kemijske obavijesti analizom podataka.[59]

Kemometričke metode koje se koriste u analizi NIR spektara mogu se podijeliti u tri skupine. Prvu skupinu čine metode kod kojih se matematičkom obradom spektara ističu važne informacije, a smanjuju ili eliminiraju nepotrebne kao što su npr. raspršenje zračenja,

varijacije u duljini puta i slučajan šum. To su najčešće postupci normalizacije, derivacije i glačanja. Spektri se matematički obrađuju prije multivarijatnog modeliranja i kao takvi koriste u daljnjoj analizi. Važno je napomenuti da matematička obrada spektara nije obavezna, a vrsta obrade ovisi o primjeni NIR metode. U drugu skupinu pripadaju metode koje se koriste u kvalitativnim analizama kao što je klasifikacija uzoraka pomoću NIR spektara. Takve analize bazirane su na metodama prepoznavanja uzorka tj. motiva (engl. *pattern recognition methods*) koje se dijele u dvije kategorije: nadgledane (engl. *supervised*) i nenadgledane (engl. *unsupervised*). Treću skupinu čine regresijske metode koje se primjenjuju u povezivanju spektara s kvantitativnim osobinama uzoraka.[60,61]

Svaka NIR metoda koja će se koristiti u kvalitativnim, kvantitativnim ili PAT analizama ima svoj životni ciklus koji se sastoji od pet temeljnih, međusobno ovisnih koraka (slika 5).



Slika 5. Životni ciklus NIR spektroskopske metode.

Prvi korak je ***razvoj / nadogradnja metode*** u kojemu se definiraju namjena metode, uvjeti i način mjerenja, priprema uzoraka, elementi koji mogu utjecati na odgovor instrumenta i sl. Drugi korak čini ***prikupljanje podataka*** kada se odabiru kalibracijski i validacijski setovi uzoraka, snimaju spektri i pohranjuju u bazu podataka te provode analize referentnim

metodama. Najčešće referentne metode su bazirane na klasičnim tehnikama analiza kao što su tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, UV/Vis spektrofotometrija, Karl-Fischer titracija i gubitak mase sušenjem, a dobiveni rezultati koriste se za razvoj kvantitativne NIR metode. Odabir dovoljnog broja pogodnih uzoraka za kalibraciju modela zahtjeva vrlo dobro poznavanje kemijskih i fizikalnih osobina uzoraka (analita), a kod nekih parametara analize i proizvodnog postupka. Metoda koja će se koristiti u rutinskoj analizi mora zadovoljiti sve validacijske parametre kao i referentna metoda koju zamjenjuje. Kvalitetan set uzoraka sadrži sve moguće varijabilnosti koje se mogu pojaviti prilikom rutinske proizvodnje. U slučaju gotovog farmaceutskog oblika to su varijacije u koncentraciji djelatne i pomoćnih tvari, fizikalnim parametrima sirovina poput veličine čestica i promjena kristalnog oblika te manje promjene u proizvodnom postupku. Također, poželjno je uključiti uzorke različitih starosti kao i one na kojima je ispitivana stabilnost pri različitim uvjetima vlage i temperature. Takav set uzoraka nemoguće je dobiti samo iz komercijalnih proizvodnih serija tako da su uključeni i uzorci laboratorijskih proba kao i pilotskih serija. No, tu valja biti oprezan zbog uvođenja dodatnih fizikalnih varijacija. Budući da je navedeni proces skup i dugotrajan, u svrhu dobivanja maksimalne količine informacija uz što manje uzoraka poželjno je koristiti pristup dizajna eksperimenata (engl. *Design of Experiments*, DoE). Odabrani uzorci dijele se u tri seta: kalibracijski set za izradu kalibracijskog modela, kalibracijski testni set za tzv. unutarnju validaciju i optimizaciju modela te neovisni validacijski set za vanjsku validaciju modela (metode). Svaki set treba pokriti cijeli raspon potencijalnih varijacija. Složeniji sustav zahtjeva i veći broj uzoraka. U praksi, dvije trećine uzoraka čine kalibracijski set, a preostala trećina kalibracijski testni set. Kada je broj uzoraka ograničen, unutarnju validaciju i optimizaciju modela moguće je provesti unakrsnom validacijom pomoću kalibracijskog seta.[62,63]

Kalibracija modela treći je korak u životnom ciklusu NIR metode. Spektri se prema potrebi matematički obrađuju te se na njima primjenjuju kalibracijski algoritmi. U matematičkoj obradi spektara najčešće se koriste standardna normalna variata (engl. *Standard Normal Variate*, SNV), višestruka korekcija raspršenog zračenja (engl. *Multiplicative Scatter Correction*, MSC) te prva i druga derivacija nakon Savitzky–Golay glačanja. Transformacija spektara pomoću SNV i MSC smanjuje umnožene interferencije nastale uslijed raspršenog zračenja na praškastim i gusto pakiranim uzorcima. Postupcima deriviranja spektara uklanja

se pozadinsko zračenje i povisuje spektralna rezolucija. U slučaju praćenja fizikalnih osobina uzoraka potreban je dodatan oprez zbog mogućeg gubitka korisnih informacija.[64]

Najčešće spominjani kalibracijski algoritam u kvalitativnim analizama je PCA, a u kvantitativnim analizama PLS.[65] Oba algoritma uključena su u razne komercijalno dostupne programske pakete. Osim PCA u svrhu kvalitativne analize u literaturi često se navodi i meko neovisno modeliranje analogije klasa (engl. *Soft Independent Modeling of Class Analogy*, SIMCA), a kod kvantitativnih analiza regresija po glavnim komponentama (engl. *Principal Component Regression*, PCR).[66]

PCA je matematički postupak koji rastavlja spektralne podatke u ortogonalne komponente čija linearna kombinacija aproksimira originalne podatke. Nove varijable nazivaju se glavne komponente (engl. *Principal Component*, PC) „eigenvektori" ili faktori. Prva glavna komponenta predstavlja najveću varijancu među svim linearnim kombinacijama, a svaka sljedeća maksimalni mogući ostatak sve dok ne ostane samo šum. Rezultati PCA promatraju se kao PC bodovi (engl. *scores*) i opterećenja (engl. *loadings*). Bodovi se mogu prikazati grafički u dvije ili tri dimenzije (engl. *score plots*) te se na taj način dobivaju vizualne informacije o uzorcima kao što je npr. postojanje klastera ili *outliera*. Faktorska opterećenja opisuju korelaciju između originalnih varijabli i glavnih komponenata i bogata su informacijama o značajnim varijablama koje se koriste za razumijevanje podataka. Pripada skupini nenadgledanih metoda i često se koristi kao međukorak u regresijskim, klaster ili faktorskim analizama. Glavne komponente određene pmoću PCA mogu se koristiti u PCR analizama.[55,65]

Parcijalni postupak najmanjih kvadrata pripada skupini nadgledanih metoda. Za razliku od PCA analize, tu su potrebne referentne vrijednosti dobivene primarnom tehnikom. Cilj PLS metode je uspostaviti linearnu poveznicu između dvije matrice, **X** koju čine spektri i **Y** koju čine referentne vrijednosti. Modeliranjem obiju matrica pronalaze se varijable u **X** matrici koje najbolje opisuju **Y** matricu. Slično kao i PCA, PLS izračunava set latentnih varijabli kako bi se reducirao broj varijabli, ali umjesto najveće varijacije u spektru prva latentna varijabla predstavlja najvažniju, pokazujući najbolju korelaciju s traženom osobinom uzorka kao što je npr. koncentracija analita.[61,67]

O odabiru dovoljnog broja varijabli, koji se često naziva i odabirom frekvencija ili valnih duljina ovisi i robustnost razvijenog modela. Preveliki broj može dovesti do „preusklađivanja" (engl. *overfitting*) te model vrlo vjerojatno neće proći vanjsku validaciju.

Nedovoljan broj varijabli dovodi do „podusklađivanja“ (engl. *underfitting*) tj. model neće moći prepoznati promjene u spektralnim svojstvima što dovodi do slabe reprodukcije spektralnih podataka.[60] Ne postoji dobar ili loš način odabira varijabli, a najbolji rezultati postižu se kombiniranjem analitičkih informacija o uzorku i statističkih metoda.[68]

Kalibracija i validacija metode prate se statističkim mjerama kao što su koeficijenti korelacije i nagib s vrijednostima bliskim jedinici te pristranost predviđanja (engl. *bias*) i odsječak čije vrijednosti moraju biti bliske nuli. Vrijednosti pogrešaka kao što su standardna pogreška kalibracije (engl. *Standard Error of Calibration*, SEC) ili korijen srednje kvadratne pogreške kalibracije (engl. *Root Mean Square Error of Calibration*, RMSEC), standardna pogreška unakrsne validacije (engl. *Standard Error of Cross Validation*, SECV) ili korijen srednje kvadratne pogreške unakrsne validacije (engl. *Root Mean Square Error of Cross Validation*, RMSECV), standardna pogreška predviđanja (engl. *Standard Error of Prediction*, SEP) ili korijen srednje kvadratne pogreške predviđanja (engl. *Root Mean Square Error of Prediction,* RMSEP) moraju biti što niže dok vrijednost rezidualnog odstupanja predviđanja (engl. *Residual Prediction Deviation*, RPD) treba biti što viša.[69]

Četvrti korak je ***validacija*** metode. Metodama koje će se koristiti u kvantitativnim analizama potrebno je provjeriti parametre: specifičnost, linearnost i raspon, točnost, preciznost, robustnost te granicu detekcije i kvantifikacije. Kod metode za kvalitativna ispitivanja dovoljno je provjeriti specifičnost i robustnost.[70–72]

Održavanje metode peti je korak u njenom životnom ciklusu. Tijekom vremena analizirat će se uzorci koji će sadržavati neke dodatne varijacije koje nisu bile uključene u početni kalibracijski model pa će biti potrebno nadograditi model kao i revalidirati metodu. Periodička provjera NIR mjernog sustava je neophodna, a neizbježna je i primjena metode na drugim instrumentima što također zahtjeva dodatna multivarijatna testiranja kao i sekundarne setove uzoraka.[73–75]

Na prvi pogled, uvođenje NIR metode u svakodnevnu upotrebu u svrhu razvoja proizvoda, a kasnije i rutinsku analizu čini se vrlo složenim i dugotrajnim, no najveća prednost, osim krajnje financijske uštede, kao i uštede vremena je bolje razumijevanje cijelog sustava stvaranja proizvoda što klasičnim pristupom nije moguće ostvariti. Takvim pristupom nedostaci NIR spektroskopije poput složenosti spektara, velike količine generiranih podataka te obavezno uključivanje visoko kvalificiranog osoblja, postaju prednost.

2.2.4. Primjena NIR spektroskopije u farmaceutskoj analizi

Vrlo široka primjena NIR spektroskopije u farmaceutskoj industriji pri klasičnoj proizvodnji lijekova uključuje kvalitativnu i kvantitativnu analizu sirovina i gotovih ljekovitih oblika. Potvrđuje se kemijski sastav,[76] prate određena fizikalna svojstva[77,78] te određuje sadržaj vode i djelatnih tvari u gotovom proizvodu.[66] Klasificiraju se sirovine i gotovi oblici ovisno o mjestu proizvodnje i proizvođaču te provjerava stabilnost proizvoda.[79–81]

Obzirom na mogućnost analize gotovo svih kritičnih kemijskih i fizikalnih parametara, NIR metode uključene su u postupke detektiranja krivotvorenih lijekova.[82,83]

2.2.4.1. Kvalitativna analiza

Kvalitativna analiza NIR metodom podrazumijeva identifikaciju tvari u smislu potvrde kemijske strukture, kao i kvalifikaciju koja uključuje mogućnost razlikovanja fizikalnih osobina poput veličina čestica ili polimorfa. Provodi se na čistim sirovinama i gotovim oblicima te se smatra jednim od parametara kontrole kvalitete. Analiza je bazirana na usporedbi spektralnih podataka analiziranog uzorka s podacima iz spektralne referentne baze podataka uz pomoć kemometrike. U skupinu kvalitativnih analiza pripadaju i postupci praćenja kritičnih dijelova procesa tijekom proizvodnje gotovih oblika lijekova (PAT).

Sve sirovine koje se koriste u proizvodnji gotovog ljekovitog oblika moraju zadovoljavati postavljene zahtjeve kvalitete propisane u farmakopejama i od strane dobre proizvođačke prakse.[84] Klasične metode su dugotrajne, a za potrebe identifikacije i kvalifikacije potrebno je provesti nekoliko različitih analiza. Postupak primarne identifikacije sirovine propisan u farmakopejama potrebno je provoditi na svakom zaprimljenom spremniku.[85] Prijenosnim NIR spektrometrima moguće je analizirati sirovine direktno preko primarnog spremnika (polietilenskih folija, stakla) i preskočiti korak ručnog uzorkovanja. Iako razvoj metode za takav način analize ponekad predstavlja pravi izazov, rutinske analize su krajnje jednostavne i brze te lakše kontrolirane.[86]

Pomoćne tvari kao što su mikrokristalična celuloza i celuloza u prahu iste su molekulske strukture, a razlikuju se u veličini čestica. Veličina čestica može znatno utjecati na proces granuliranja prilikom proizvodnje krutih oralnih oblika tako da je vrlo važno upotrijebiti odgovarajuću veličinu. Sljedeći primjer dokazuje da je klasičan način analize kao

što je npr. sitena analiza moguće zamijeniti NIR spektroskopijom. Snimljeni NIR spektri obiju sirovina razlikovali su se u pomaku bazne linije, a veće razlike postignute su MSC obradom spektara u kombinaciji s prvom derivacijom. Primjenom PCA metode u spektralnom području od 1400 do 1500 nm provedena je njihova klasifikacija sa zadovoljavajućom točnošću.[87]

Identifikaciju deset najčešćih pomoćnih tvari koje se koriste u proizvodnji krutih gotovih oblika moguće je provesti SIMCA metodom. Metoda je razvijena za bezvodni kalcijev hidrogenfosfat, bezvodnu laktozu, natrijev škrob glikolat, laktozu, magnezijev stearat, metocel, povidon, natrijev lauril sulfat, škrob i mikrokristaličnu celulozu. Analizirano je između 15 i 22 serije svake sirovine različitih dobavljača i starosti. Spektri su snimljeni refleksijom zračenja, uprosječavanjem 32 snimke u području od 1100 do 2486 nm, a ispitana su dva načina matematičke obrade, SNV i druga derivacija. Učinkovitost modela provjerena je postupkom unakrsne validacije izostavljanjem jednog po jednog uzorka pojedine pomoćne tvari. Metodu je moguće koristiti u rutinskoj kontroli kvalitete uz dodatnu provjeru na validacijskom setu uzoraka.[88]

Primjena NIR metode u identifikaciji djelatne tvari u gotovim oblicima prikazana je na primjeru tableta čija je djelatna tvar tiamazol. Tablete su sadržavale djelatnu tvar u vrlo malim količinama (2%, 4% i 8% (*m*/*m*)) uz laktozu kao glavnu pomoćnu tvar. Spektri su snimljeni transmisijom zračenja te matematički obrađeni SNV i prvom derivacijom. Kao identifikacijski algoritam korištena je diskriminantna analiza (engl. *Discriminant analysis,* DA) u spektralnom području od 9300 do 8750 cm^{-1} s vrpcama karakterističnim za tiamazol. Metoda je selektivna i robustna unatoč vrlo niskom masenom udjelu djelatne tvari. Odobrena je od strane europskog regulatornog tijela i može se koristiti u rutinskim analizama.[89]

Metodom koja uključuje analizu klastera moguće je razlikovati tri različita generička lijeka iste djelatne tvari (enalapril, 20 mg) bez otvaranja primarne ambalaže.[90]

Najčešći krivotvoreni kruti oralni oblik sadrži djelatnu tvar sildenafil u obliku sildenafil citrata, a poznat je pod imenom „Viagra“. Takvi proizvodi izgledaju kao originalni ili generički lijek, dok sastav može, ali i ne mora biti jednak. Štoviše, neki niti ne sadrže djelatnu tvar. Osim krivotvorenih lijekova loše kvalitete, sve je više i onih vrlo visoke kvalitete koji se klasičnim načinima analize ne mogu prepoznati. Primjenom NIR spektroskopske metode u kombinaciji s dva kemometrička algoritma, PCA i korelacija valnih duljina (engl. *Wavelength Correlation*, WC) provjerena je homogenost uzoraka, odvojene su

krivotvorine od originalnog lijeka, ispitivana je prisutnost sildenafila, a izmjereni uzorci uspoređeni su i s prijašnjim mjerenjima u svrhu detektiranja izvora nepoznatih proizvoda. Spektri su snimljeni difuznom refleksijom zračenja i nisu matematički obrađivani.[91]

Osim krivotvorenih lijekova, veliki problem predstavljaju i nedopuštene tvari kao što su amfetamin i njegovi derivati koji su sastavni dijelovi nekad legalnog lijeka pod imenom „Ecstasy“. Razni tipovi celuloza i laktoza najčešće su pomoćne tvari koje se koriste u proizvodnji navedenog preparata. Njihovom klasifikacijom pomoću PCA metode moguće je kategorizirati različite vrste tableta amfetamina.[92]

2.2.4.2. Kvantitativna analiza

U skupinu najčešćih parametara koji se kvantitativno prate NIR spektroskopijom pripadaju određivanje sadržaja vode i djelatnih tvari u gotovom proizvodu, zatim fizikalna svojstva poput tvrdoće tableta, masenog udjela različitih kristalnih oblika djelatne tvari, raspodjele veličine čestica te parametri procesne tehnologije.

2.2.4.2.1 Sadržaj vode, sadržaj i ujednačenost sadržaja djelatne tvari

Prisutnost vode u sirovinama i gotovim oblicima lijekova može imati velik, većinom negativan utjecaj na njihova kemijska, fizikalna, tehnološka i biofarmaceutska svojstva. Prednost NIR spektroskopije pri određivanju sadržaja vode u odnosu na klasične metode, poput Karl-Fischer titracije i gubitka sušenjem, je mogućnost razlikovanja vezanih molekula vode u kristalnoj rešetci od onih adsorbiranih, a dostupnost tih podataka osigurava željena fizikalna svojstva završnog proizvoda.[93] Intenzivna vrpca pri približno 5150 cm^{-1} (1940 nm) kombinacija je asimetričnog istezanja i savijanja molekule vode. Prvi viši ton istezanja veze O–H nalazi se pri približno 6900 cm^{-1} (1450 nm) i nešto je slabijeg intenziteta. Točan položaj vrpci ovisi o fizikalnom i kemijskom stanju vode u uzorku. Voda u tekućem agregatnom stanju osim navedenih vrpci sadrži i dva seta vrpci slabijeg intenziteta pri približno 5620 cm^{-1} (1780 nm) i 8310 cm^{-1} (1200 nm) te 11800 cm^{-1} (840 nm) i 13000 cm^{-1} (740 nm).[48]

Dijelovi spektra koji sadrže najintenzivnije vrpce osiguravaju dovoljnu osjetljivost i ponovljivost mjerenja pa ih je poželjno uvrstiti u kalibracijski model. No, vrpce vode mogu interferirati s vrpcama ostalih komponenata uzorka pa je taj dio spektra najbolje izostaviti iz modela ukoliko voda nije predmet istraživanja.

Osim za istovrsne uzorke čija je analiza najčešća, postoji primjer metode kojom je moguće određivati sadržaj vode na cijelim tabletama s različitim djelatnim tvarima. Kod takve metode kulometrijsku Karl-Fischer titraciju zamijenila je NIR spektroskopija u kombinaciji s PLS. Šest latentnih varijabli u dva spektralna područja (5014–5302 cm^{-1} i 6503–7008 cm^{-1}) opisalo je sve važne varijacije. Spektri su snimljeni difuznom refleksijom, a prije uvrštavanja u kalibracijski model obrađeni su postupkom prve derivacije. Metoda je zadovoljila sve kalibracijske i validacijske parametre u rasponu od 2% do 13% (*m*/*m*).[94]

Prva istraživanja u određivanju sadržaja djelatnih tvari primjenom NIR spektroskopije odnosila su se na analize u otopinama.[51] Djelatna tvar iz tableta ili kapsula ekstrahirala se otapalom, a mjerenja su se provodila na jednoj valnoj duljini, karakterističnoj za traženi analit. Dobiveni rezultati bili su zadovoljavajuće točnosti, no teško da bi razvijene metode našle komercijalnu primjenu. Tek kasnije, razvojem NIR instrumenata i računala te uključivanjem kemometrike, otvorila se mogućnost analize na uzorcima kakvim jesu bez pripreme otopina. NIR spektroskopske metode našle su svoju primjenu u određivanju sadržaja i ujednačenosti sadržaja jedne ili više djelatnih tvari u krutim i tekućim gotovim oblicima s visokim i niskim postotnim udjelom u bilo kojoj matrici, kako u laboratoriju, tako i prilikom proizvodnje u realnom vremenu. Razrada metode obično započinje na praškastim uzorcima, a nakon toga se uključuju i cijele tablete. Jedan takav primjer je i analiza sadržaja hidroklortiazida masenog udjela od 17% (*m*/*m*). Ispitana su četiri spektralna područja, a izabrano je jedno u rasponu od 1640 nm do 1780 nm koje odgovara prvom višem tonu istezanja veza C–H hidroklortiazida. Optimizirani PLS model sastojao se od 49 kalibracijskih i 30 validacijskih uzoraka smrvljenih tableta. Spektri su snimani difuznom refleksijom te matematički obrađeni prvom derivacijom uz Savitzky–Golay glačanje u kombinaciji s normalizacijom vektora. Korištene su četiri latentne varijable, a RMSEP vrijednost iznosila je 1,7%. Validirani su sljedeći parametri metode: linearnost, točnost, preciznost i selektivnost. Analiza realnih uzoraka uključivala je tri različita seta: smrvljene tablete iz tri različite serije, cijele tablete iz jedne serije i uzorke izuzete nakon miješanja, a prije tabletiranja iz šest serija u periodu od tri mjeseca. Rezultati dobiveni na temelju NIR spektara cijelih tableta nešto su lošiji od rezultata HPLC metode s pogreškom predviđanja od maksimalno 9% što je i očekivano obzirom da cijele tablete nisu bile uključene u kalibracijski model. Predviđeni rezultati za praškaste uzorke razlikovali su se 1,5%–2,5% od onih dobivenih referentnom tehnikom. Predložena NIR metoda 15 puta je brža od klasične HPLC metode.[95]

Iako je NIR spektroskopija relativno niske osjetljivosti, dokazano je da se može koristiti u kvantitativnoj analizi djelatnih tvari vrlo niskih koncentracija. To je prikazano na primjeru tableta koje sadrže djelatnu tvar irbesartan u dvije forme, pri čemu je maseni udio forme B 3% (*m*/*m*)).[96]

Djelatna tvar u sirupima i oralnim suspenzijama prisutna je u malim količinama, a brojne pomoćne tvari čine vrlo složenu matricu što dodatno otežava analizu uobičajenim postupcima. Opisana NIR metoda određivanja sadržaja paracetamola udjela 2% (*m*/*V*) sadržavala je šest izvora varijabilnosti, kao što su više proizvodnih kampanji (setova serija), različite serije gotovog proizvoda, nekoliko koncentracija paracetamola, promjene u formulaciji, mjerenja pri različitim temperaturama te dva operatera. Temeljem toga, razvijen je robustan PLS kalibracijski model što je dokazano vanjskom validacijom. Spektri su snimani tehnikom difuzno reflektiranog zračenja pomoću optičke sonde koja je bila u direktnom kontaktu sa sirupom. Svaki spektar rezultat je uprosječivanja 32 snimke pri različivanju 8 cm^{-1} u području 12500–3600 cm^{-1}. Spektralno područje koje je sadržavalo najviše informacija o analitu (5955–7212 cm^{-1}) izabrano je za razvoj metode. Osim klasičnih parametara provjere, ispitana je i nesigurnost metode koja je bila manja od 3% kod intervala pouzdanosti od 95%.[97]

Kvantitativne NIR analize djelatnih tvari mogu se određivati refleksijom i transmisijom zračenja, no pri niskim koncentracijama u tabletama prednost ima transmisija. Razlog tomu je što zračenje prolazi kroz cijeli uzorak pa homogenost nije toliko važna kao kod refleksije.[98] Također, tablete koje sadrže dvije djelatne tvari raspoređene u dva sloja moguće je snimati bez potrebe okretanja tablete pa analize nisu ograničene samo na laboratorijsku primjenu.[99]

Kod preparata koji sadrže više djelatnih tvari, razvijaju se posebni kemometrički modeli koji se kod rutinske analize primjenjuju za isti spektar što je dodatna prednost u odnosu na klasične metode.[100]

Sadržaj pomoćnih tvari u gotovom proizvodu nije obavezan parametar kontrole kvalitete gotovog proizvoda, no taj podatak vrlo je koristan prilikom razvoja generičkog lijeka. Na primjeru tableta čije je djelatna tvar ibuprofen, a pomoćne tvari kukuruzni škrob, mikrokristalična celuloza, aerosil i magnezijev stearat dokazana je uspješna primjena NIR spektroskopije bez korištenja referentne tehnike. Za svaku komponentu razvijen je poseban PLS model, a ulogu referentnih vrijednosti imale su njihove mase u smjesi. Set laboratorijskih

uzoraka pripremljen je prema načelu eksperimentalnog dizajna koji je osim kemijskih varijabilnosti sadržavao i one koje potječu od proizvodnog postupka. Rezultati NIR spektroskopske analize svih pet sirovina smatrani su dovoljno točnim s RMSEP < 1%.[101]

2.2.4.2.2 Kvantitativno praćenje fizikalnih parametara

Farmaceutske djelatne tvari mogu postojati u više kristalnih oblika kao što su npr. polimorfi solvati i/ili hidrati, amorfi ili soli. Nedavna znanstvena istraživanja pokazala su da između 80 i 90% organskih tvari postoji u obliku različitih polimorfa. To je značajan podatak jer ista djelatna tvar može imati vrlo različite fizikalno–kemijske osobine koje mogu utjecati na stabilnost djelatne tvari kao sirovine ili u gotovom lijeku, na tehnološki proces te na bioraspoloživost lijeka.[102]

Indometacin postoji u dva polimorfna oblika (α i γ), a njihov postotni udio u krutim oralnim oblicima najčešće se određuje tehnikom difrakcije rentgenskih zraka. Razvijenom NIR spektroskopskom metodom određen je udio pojedinog polimorfa na nepoznatom setu uzoraka, a metoda se pokazala superiornijom od primarne metode zbog bolje linearnosti, točnosti i preciznosti.[103]

Djelatna tvar miokamicin u tabletama može biti prisutna u kristalnom i amorfnom obliku. U svrhu razvoja NIR metode za kvantitativno određivanje ukupnog miokamicina i miokamicina u kristalnom obliku snimljeni su spektri difuznom refleksijom zračenja na 20 kalibracijskih i 19 validacijskih uzoraka. Postavljena su dva kalibracijska PLS modela s četiri latentne varijable. Spektri su obrađeni postupkom prve derivacije. Za određivanje ukupnog miokamicina odabrano je spektralno područje u rasponu 1100–1800 nm, a njegovog kristalnog oblika u rasponu 2000–2200 nm. Oba modela zadovoljila su parametre vanjske validacije: selektivnost, linearnost, točnost, ponovljivost, preciznost i robustnost.[104]

Nadziranjem raspodjele veličine čestica u granulatu prilikom proizvodnje tableta osigurava se efikasnost proizvodnog postupka kao i potrebna kvaliteta gotovog proizvoda. O veličini čestica ovise odgovarajuća tvrdoća, raspadljivost i prosječna masa. Klasičan način analize uključuje korištenje sita različitih veličina pora i određivanje mase zaostale na situ prilikom prosijavanja. U NIR spektrima snimljenim difuznom refleksijom zračenja različita veličina čestica u uzorcima istog kemijskog sastava korelirana je s pomakom bazne linije. Veće čestice uzrokuju baznu liniju viših apsorbancija. Na primjeru granulata koji sadrži paracetamol dokazana je mogućnost određivanja raspodjele veličine čestica NIR

spektroskopijom uz PLS i PLS2 algoritme. Model je razvijen na uzorcima koji su sadržavali granulat u rasponu 200–1000 μm.[105]

Klasične metode ispitivanja tvrdoće tableta destruktivne su i često podložne pogreškama koje potječu od strane operatera. U svrhu određivanja tvrdoće pomoću NIR spektroskopije, spektri se obično snimaju difuznom refleksijom zračenja. Veća tvrdoća uzrokuje pomak bazne linije prema višim apsorbancijama, što je jače izraženo pri višim valnim duljinama. Kod nekih uzoraka moguće je primjetiti i pomak apsorpcijske vrpce kao posljedicu promjene u jačini intermolekulskih veza. Na primjeru cimetidin tableta razvijene su dvije NIR metode, multivarijatna PCA/PCR i tzv. *best–fit* metoda u kojoj su spektri prevedeni u regresijske linije s nagibom i odsječkom kao varijablama. Drugi pristup nešto je jednostavniji i manje osjetljiv na blage promjene u formulaciji (1–10% (*m*/*m*) cimetidin), no rezultati su usporedivi s osjetljivijom PCA/PCR metodom. U razvoju metoda korišteno je sedam različitih formulacija u rasponu tvrdoća 1–7 kp.[106]

2.2.5. Procesna tehnologija kontrolirana NIR spektroskopijom

Farmaceutska industrija vrlo je strogo regulirana. Završni proizvod prije stavljanja na tržište mora odgovarati specifikacijama s vrlo uskim zahtjevima kvalitete, no to svejedno ne znači da su procesi proizvodnje optimizirani i potpuno razumljivi. Uobičajen način proizvodnje lijekova uključuje provjeru kvalitete završnog proizvoda *off–line* laboratorijskim analizama na nasumično prikupljenim uzorcima. Navedeni postupak je dugotrajan, a pogreške u proizvodnji mogu rezultirati velikim gubicima iako je prethodno dokazana ponovljivost procesa na tri uzastopne proizvedene serije. Stoga je prije desetak godina oformljena PAT inicijativa koju podupiru najvažnija svjetska regulatorna tijela poput Administracije za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) i Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA). Procesna analitička tehnologija definirana je kao sustav za dizajniranje, razvoj, analizu i kontrolu sirovog materijala, intermedijera i farmaceutskih proizvodnih procesa u realnom vremenu s krajnjim ciljem boljeg znanstvenog razumijevanja procesa proizvodnje. Praćenjem kritičnih procesnih parametara i fizikalno–kemijskih svojstava sirovog materijala osigurava se željena kvaliteta gotovog proizvoda. Takva tehnologija povećava efikasnost proizvodnog postupka i smanjuje troškove, što u konačnici rezultira nižom cijenom lijekova.[107] Analiza kritičnih parametara provodi se u realnom

vremenu bez razaranja uzoraka. Istraživanje i razvoj lijekova ovakvim pristupom dobiva potpuno novo značenje.

Osnovni PAT instrumenti su procesni analizatori kojima se prikupljaju važne informacije o ključnim dijelovima procesa proizvodnje, kao i samog završnog proizvoda. Ovisno o vrsti analizatora provode se mjerenja pH, temperature i tlaka te određuju složenije fizikalne i kemijske osobine materijala. Mjerenja se mogu provoditi na tri načina: *at–line*, kada su uzorci uklonjeni s linije proizvodnje, a analizatori smješteni u blizini, *on–line*, pri kojemu se uzorci nakon mjerenja mogu vratiti na procesnu liniju, te *in–line*, kada nema uzorkovanja, tj. analiza se provodi na licu mjesta tijekom proizvodnog postupka pomoću optičkih vlakana.[108] Najširu primjenu imaju analizatori bazirani na vibracijskoj spektroskopiji tj. NIR, Raman, NIR kemijsko oslikavanje.[109]

Tijekom procesa proizvodnje krutih oblika, sirovine prolaze nekoliko uzastopnih koraka: sintezu, kristalizaciju, mljevenje, miješanje, granulaciju, sušenje, tabletiranje, oblaganje i pakiranje. Kontinuiranim proizvodnim postupkom izbjegavaju se problemi koji se javljaju na većoj skali, smanjuje se vrijeme pojedinog ciklusa, cijena, varijabilnosti, osigurava brže puštanje u promet, povisuje fleksibilnost i efikasnost te povećava kvaliteta proizvoda.

Brojni primjeri primjene NIR spektroskopije odnose se na miješanje, granuliranje, tabletiranje i oblaganje tableta ovojnicom u obliku filma.[50] Kvantitativnim analizama poput određivanja sadržaja vode ili gubitka sušenjem određuje se završno vrijeme sušenja i/ili granuliranja,[110,111] a testiranjem ujednačenosti sadržaja djelatne ili pomoćnih tvari provjerava homogenost smjese[112] ili tableta.[113,114] Tijekom navedenih postupaka NIR spektroskopijom prati se i raspodjela veličine čestica[115] te mogući prijelaz djelatne ili pomoćnih tvari iz jednog polimorfa u drugi.[77,116] U procesu oblaganja tableta ovojnicom u obliku filma kontrolira se količina i debljina sloja ovojnice.[117,118] Svaki od navedenih postupaka sadrži tzv. otisak prsta svojstven za spektroskopska mjerenja, koji pomaže u njihovom boljem razumijevanju i predviđanju kvalitete gotovog proizvoda.[50] Tvrdoća i raspadljivost te oslobađanje djelatne tvari direktno ovise o navedenim pojedinim koracima proizvodnog postupka.[119] Metode u PAT sustavu ne moraju nužno biti kvantitativne. Primjerice, promjena NIR signala može ukazati na završetak miješanja smjese praha.[120]

Unatoč vrlo velikom broju razvijenih NIR metoda, samo nekolicina je odobrena od strane regulatornih tijela zbog poteškoća u jasnom prezentiranju prilikom prijave metoda kao i njihovih provjera. Jedan od primjera uvođenja PAT kontrolnog sustava uz primjenu NIR

spektroskopije odnosi se na proizvodnju 7–aminocefalosporanske kiseline (7–ACA), molekule koja ima ulogu intermedijera u sintezi cefalosporinskih antibiotika. Završni *conformity* model sastojao se od 96 reprezentativnih uzoraka koji su opisivali varijabilnosti kritičnih parametara proizvodnog postupka kao i osobine proizvoda. Pratilo se pet parametara: sadržaj, boja, voda, glavni sporedni produkt i ostatno otapalo. NIR spektri snimljeni su difuznom refleksijom zračenja te matematički obrađeni postupkom SNV. Sličnost spektara nepoznatih uzoraka sa spektrima referentnog seta provjeravala se *Hotteling* T^2 testom.[121] Za kvalifikaciju sirovina i intermedijera *conformity* pristup općenito se smatra pogodnim jer daje pouzdane kvalitativne informacije bez dodatnih kvantitativnih podataka.[55]

Sljedeći primjer *in–line* analize, praćenje sušenja granulata, uvedena je kao primarna metoda koja je odobrena od strane FDA i EMA. Metoda je razvijena za postojeći proizvod koji se sastoji od 60–70% djelatne tvari, mikrokristalične celuloze, natrijevog škrob glikolata i povidona. Spektri su snimani difuznom refleksijom pomoću optičkih vlakana smještenih u uređaju za sušenje. U razvoju modela korištene su kvantitativne vrijednosti dobivene postupkom gubitka sušenjem. PLS model sastojao se od 24 uzoraka iz 10 različitih serija. Model je testiran vanjskom validacijom s 47 uzoraka iz 29 dodatnih serija proizvedenih tijekom pet kliničkih kampanja. Spektri su obrađeni SNV postupkom u području od 1854 nm do 2075 nm, specifičnim za molekulu vode. Jedna latentna varijabla određena unakrsnom validacijom objasnila je 97,66% varijance. Točnost metode provjeravana je uparenim *t*-testom i *F*-testom na vrijednostima određenim referentnom i NIR metodom. Vrijednosti RMSEC i RMSEP iznosile su 0,10% i 0,17%. Metoda je uspješno primijenjena na spektrometru slične konfiguracije. Procijenjeno je da je metoda četiri puta preciznija od referentne metode te da se prelaskom na NIR metodu štedi oko 10% energije i vremena za taj dio proizvodnog postupka.[110]

2.2.6. NIR spektroskopija i oslobađanje

Uvođenje NIR metode za rutinsku analizu predviđanja oslobađanja djelatne tvari iz gotovog ljekovitog oblika značilo bi značajnu uštedu vremena, kemikalija, standarda, instrumenata i osoblja, koje se inače utroše klasičnim postupcima analize. Jedna analiza oslobađanja oblika s trenutnim oslobađanjem s jednim vremenom uzorkovanja traje minimalno četiri sata. Za tablete s prilagođenim oslobađanjem to vrijeme se produžuje i na dva dana. Iako su razvoj NIR metode, validacija prema propisanim smjernicama te kasnije periodička provjera i

održavanje nešto složeniji od klasičnog postupka odrade navedenog parametra, u konačnici izostavilo bi se testiranje gotovog proizvoda u uređaju za oslobađanje, kao i određivanje koncentracije djelatne tvari spektrofotometrijskom ili kromatografskom tehnikom. Time bi se izbjegle varijabilnosti u rezultatima koje potječu od svojstava medija, uzorkovanja ili uređaja za oslobađanja, a koje nije moguće stalno držati pod kontrolom i smatrati konstantnim. Zamjena klasične analize s NIR metodom možda nije isplativa za proizvode koji se proizvode jednom godišnje ili rjeđe, no idealna je za one koji se proizvode vrlo često, kao i za one koje su na početku razvoja. Razvoj NIR metode kojom bi se kvantitativno predviđale količine oslobođene djelatne tvari u zadanom vremenu mnogo je složeniji od metoda ostalih kvantitativnih parametara. Tu je potrebno istovremeno uključiti više različitih kemijskih i fizikalnih osobina uzoraka uz dodatan oprez kako se neke ne bi prenaglasile, a neke zanemarile. Potreban je velik broj različitih uzoraka od kojih se kasnije odabiru oni koji su značajni za razvoj NIR modela. No, razvoj novog gotovog proizvoda i bez korištenja NIR tehnike zahtjeva dobru pripremljenost temeljenu na znanstvenom pristupu, kao i velik broj različitih probi od kojih se kasnije odabire ona najpogodnija koja će dobiti status završne formulacije, a kasnije i samog završnog proizvoda. Na većini tih uzoraka, ako ne i na svima, provode se analize profila oslobađanja. Dodatan korak bilo bi samo prethodno snimanje NIR spektara, a odabir pogodnih uvjeta snimanja iziskuje gotovo zanemarivu angažiranost analitičara u odnosu na sveukupno utrošeno vrijeme, ako je NIR tehnika jedan od alata u razvoju proizvoda. Isti NIR spektar moguće je koristiti za određivanje svih parametara koji se prate. Broj znanstvenih istraživanja koja se bave tom tematikom mnogo je manji u odnosu na ostale parametre koji prate kvalitetu gotovog ljekovitog oblika, no prikazana razvijena metodologija osim krajnjeg cilja zamjene klasičnog načina analize oslobađanja nudi i dodatne korisne informacije o trenutnom stanju proizvoda. Važnost primjene multivarijatnih analiza kao i mogućnost ispitivanja oslobađanja korištenjem kemometrike prepoznala je i Američka farmakopeja uvođenjem nove opće monografije <1039> *Chemometrics*.

Na primjeru tableta s produljenim oslobađanjem čija je djelatna tvar teofilin dokazana je uspješna primjena NIR spektroskopije u predviđanju količine oslobođene djelatne tvari za četiri vremena uzorkovanja (1., 2., 3. i 4. sat). U izradi kalibracijskog modela korišteno je 117 tableta iz pet različitih serija. Uzorci su bili podijeljeni na kalibracijski, validacijski i predikcijski set. Serije su se razlikovale u količini dodanog vezivnog sredstva (Eudragit NE 30D) u iznosu od 0, 5, 10, 15 i 20%. U sastavu tableta bile su još četiri pomoćne tvari.

Prosječna masa tableta iznosila je 600 mg, a svaka tableta sadržavala je 200 mg teofilina. Variranje masenog udjela vezivnog sredstva nadomješteno je laktoza monohidratom, a količina ostalih sastojaka bila je jednaka u svim analiziranim uzorcim. Za seriju s masenim udjelom vezivnog sastojka od 5% izmjerene su nešto niže vrijednosti tvrdoće od ostalih. Ostali tehnološki parametri nisu varirali. Direktan utjecaj na brzinu oslobađanja teofilina imala je količina Eudragit NE 30D. Tablete koje nisu sadržavale navedenu pomoćnu tvar najbrže su otpustile teofilin. Prije analize oslobađanja, uzorcima tableta snimljeni su NIR spektri difuznom refleksijom zračenja. Postupak analize oslobađanja uključivao je 900 mL fosfatnog pufera pH 3,95±0,05, u uređaju 2 (lopatice) pri 50 okr./min tijekom 4 sata. Otopine su mjerene na UV/Vis spektrofotometru pri valnoj duljini od 270 nm. Za svako od četiri vremena uzorkovanja razvijen je poseban PLS kemometrički model s četiri latentne varijable. Spektri su matematički obrađeni postupkom SNV i drugom derivacijom, a za razvoj modela odabrano je spektralno područje od 1150 do 2200 nm. Za PLS (1 h) SEC je iznosio 2,8%, a SEP 3,4%, za PLS (2 h) SEC je iznosio 2,7%, a SEP 3,5%, za PLS (3 h) SEC je iznosio 2,6%, a SEP 3,5% dok je za PLS (4 h) SEC iznosio 3,0%, a SEP 3,5%. Vrijednosti koeficijenata korelacije bile su između 0,96 i 0,99. Uparenim *t*–testom (α = 0,05) dokazano je da ne postoje značajne razlike u rezultatima između klasične i predložene metode ($P > 0,073$ za 1. sat; 0,13 za 2. sat; 0,2 za 3 sat i 0,96 za 4. sat).[1]

Klasične načine analize oslobađanja nije moguće primijeniti *in–line*, no sljedeći primjer dokazuje da je taj parametar moguće pratiti u realnom vremenu. Produljeno otpuštanje djelatne tvari iz tableta postiže se ugradnjom polimera ili kombinacije polimera u tabletnu jezgru ili ovojnicu. Homogenost i debljina ovojnice kritični su parametri koji utječu na brzinu oslobađanja djelatne tvari pa je vrlo važno odrediti završno vrijeme oblaganja tableta. Razvijenom NIR metodom omogućeno je kvantitativno praćenje otpuštanja djelatne tvari u 4., 8. i 12. satu uzorkovanja, kao i završetak oblaganja tableta u realnom vremenu. Optičko NIR vlakno bilo je smješteno u uređaju za oblaganje i nije imalo utjecaja na sam postupak. U razvoju modela korištena su 330 NIR spektra snimljena refleksijom zračenja. Uzorci tableta izuzeti su iz tri različite serije tableta koje su se razlikovale u količini smjese polimera u ovojnici. Maseni udio smjese polimera iznosio je 5, 10 i 15% (*m*/*m*) od ukupne mase tabletnih jezgri. Navedena razlika u količini smjese polimera znatno je utjecala na brzinu otpuštanja djelatne tvari. Za svako vrijeme uzorkovanja razvijen je poseban PLS model s 4 latentne varijable za prvo i drugo uzorkovanje te 3 latentne varijable za treće uzorkovanje. Izabrana su

dva spektralna područja, najosjetljivija na promjene u masi ovojnice. Prije primjene PLS regresije spektri su obrađeni postupcima SNV i druge derivacije. Na izgled NIR spektara najviše je utjecala etilceluloza, koja je i glavni sastojak suspenzije za oblaganje. Vrpce između 1150 nm i 1210 nm odgovarale su drugom višem tonu veze C–H funkcionalnih skupina etilceluloze, a vrpce između 1360 nm i 1440 nm istezanju i deformaciji skupina CH te prvom višem tonu istezanja veze O–H. Pouzdan kalibracijski model potvrđen je niskim pogreškama predviđanja tj. RMSEP od 1,7% za prvi interval uzorkovanja te 1,9% i 1,5% za drugi i treći. Provjera modela provedena je na tri nasumično odabrana uzorka sa 7%, 10% i 11% udjela polimera izuzetih iz drugog, neovisnog postupka oblaganja. Razlike u rezultatima srednjih vrijednosti šest tableta dobivenih klasičnom metodom oslobađanja i NIR metodom iznosile su oko 1%, a pojedinačne vrijednosti ne više od 3%. Oblaganje tableta zaustavljeno je kada je maseni udio smjese polimera iznosio 10% ukupne mase tabletnih jezgri tj. kada je pet uzastopno snimljenih NIR spektara dalo vrijednosti oslobađanja unutar propisanog limita za sva tri vremena uzorkovanja. Metoda je provjerena s druge dvije serije tableta koje nisu bile sastavni dio njenog razvoja.[6]

Primjena NIR spektroskopije opisana je i u analizi profila oslobađanja klonazepama s masenim udjelom od 1,25%. Tablete s trenutnim oslobađanjem nisu imale ovojnicu u obliku filma, a osim vrlo niske količine djelatne tvari dodatni izazov predstavljala je vrlo složena matrica od sedam pomoćnih tvari. U svrhu razvoja metode korišteno je deset različitih serija s istom količinom klonazepama, ali manjim promjenama u masenom udjelu pomoćnih tvari. Tabletama su snimljeni NIR spektri difuznom refleksijom zračenja u rasponu 4000–10000 cm^{-1} (32 snimaka, razlučivanje 8 cm^{-1}), a nakon toga su odrađene analize oslobađanja u tri različita medija (acetatni pufer pH 3,0 i 4,5, fosfatni pufer pH 6,8) i sedam vremena uzorkovanja (3–45 min) uz primjenu HPLC metode. Razvijen je 21 PLS algoritam, posebno za svako vrijeme uzorkovanja u svaka od tri medija. Iz svake serije tableta uzete su po tri tablete tako da se kalibracijski set sastojao od 30 uzoraka. Kalibracijski model validiran je postupkom unakrsne validacije (engl. *leave-one-out*). Korišteno je deset latentnih varijabli, a spektri prije uvrštavanja u model nisu bili matematički obrađeni. Standardne pogreške validacije iznosile su od 2,75 do 4,96 za pH 3,0, od 2,89 do 7,88 za pH 4,5 te od 2,96 do 6,34 za pH 6,8. Vanjska validacija provedena je postupkom izostavljanja jedne serije uzoraka iz kalibracijskog seta i predviđanjem postotka oslobođenog klonazepama na tom istom setu nakon rekalibracije modela. Za serije koje nisu sadržavale neku od pomoćnih tvari u znatno

većim količinama koeficijent korelacije iznosio je 0,98. Najveće prednosti u primjeni razvijene metode su brzina dobivanja pouzdanih rezultata te izostavljanje analize profila oslobađanja.[3]

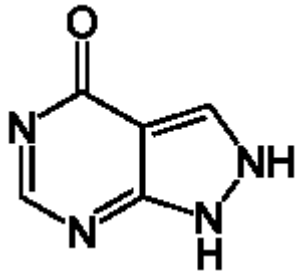
Tablete mogu sadržavati i više od jedne djelatne tvari u svom sastavu. Povećanjem broja djelatnih tvari, povećavaju se i moguće varijabilnosti koje se odnose na proces oslobađanja u određenom mediju, a samim time metoda evaluacije rezultata postaje zahtjevnija. Na primjeru lijeka koji se sastoji od četiri djelatne tvari prikazana je moguća primjena NIR spektroskopije. Formulacija se sastojala od 7,9% izoniazida, 15,8% rifampicina, 42,2% pirazinamida i 29,0% etambutola kao djelatnih tvari te još četiri pomoćne tvari. Oslobađanje djelatnih tvari provedeno je u fosfatnom puferu pH 6,8, a evaluacija rezultata HPLC metodom. Sveukupno je korišteno 38 uzoraka: 24 za kalibraciju, 7 za validaciju i 7 za analizu NIR spektroskopijom s vrijednostima oslobođene djelatne tvari od 5% do 90% u 45 minuta. U multivarijatnoj analizi korišten je PLS algoritam (4 LV za izoniazid i rifampicin, te 3 LV za pirazinamid i etambutol). Spektri su snimljeni difuznom refleksijom zračenja u području od 1100 nm do 2500 nm, a zatim glačani Savitzky–Golay algoritmom, derivirani i korigirani MSC postupkom. Koeficijent korelacije rezultata određenih HPLC metodom i rezultata određenih NIR spektroskopijom bio je između 0,88 i 0,98, a vrijednosti RMSEP izoniazida, rifampicina, etambutola i pirazinamida redom 9,99%, 8,63%, 8,57% i 9,97%. Na temelju dobivenih rezultata te kompleksnosti kvalitativnog sastava, razvijena NIR spektroskopska metoda smatrala se zadovoljavajućom.[2]

Profil oslobađanja djelatne tvari, osim o sastavu gotovog oblika, ovisi o nekim fizikalnim svojstvima, kao što su tvrdoća te oblik i površina tableta. Variranjem tvrdoće tableta može se postići optimalna brzina otpuštanja djelatne tvari. Uvrštavanjem uzoraka u kalibracijski model koji se razlikuju samo u tvrdoći često nije moguće dobiti zadovoljavajući kalibracijski raspon, pogotovo kada se radi o tabletama s trenutnim oslobađanjem. Budući da je prema specifikaciji kontrole kvalitete proizvoda potrebno zadovoljiti samo zahtjev za minimalnom količinom oslobođene djelatne tvari, moguće je upotrijebiti diskriminantni model umjesto kvanitativnog modela. Za primjenu takvog algoritma potrebno je odabrati dva različita seta uzoraka, tj. one koji zadovoljavaju propisanu donju granicu u navedenom vremenu uzrokovanja i one koji ju ne zadovoljavaju, te snimiti NIR spektre. Korištenjem binarnog koda (1 i 0) uzorci se klasificiraju u dvije grupe, a predviđanje rezultata je u skladu s referentnom metodom.[119]

U slučaju profila oslobađanja postoji mogućnost razvoja jedinstvenog PLS modela za sve točke uzorkovanja umjesto više pojedinačnih modela za svaku točku uzorkovanja.[122] Takav pristup razvoju metode ovisi o tipu modela oslobađanja i namjeni NIR metode.[63]

2.3. Djelatna tvar alopurinol

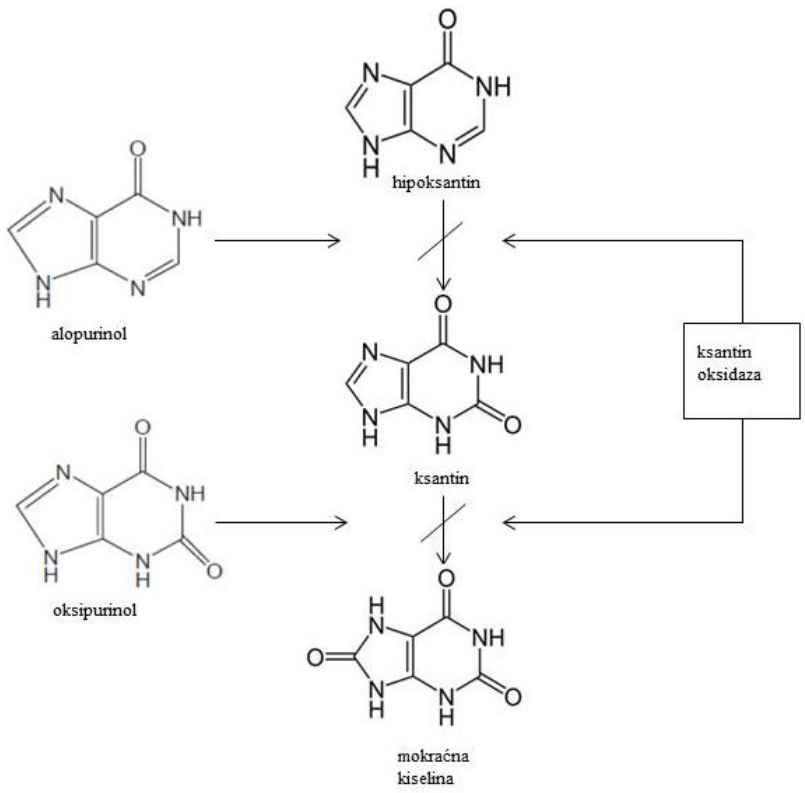
Čista sirovina alopurinola postoji u obliku bijelog praška koji je vrlo slabo topljiv u vodi i 96%–tnom etanolu, a otapa se u razrijeđenim otopinama alkalijevih hidroksida. Naziv prema IUPAC–ovoj nomenklaturi je 1,5–dihidro–4–*H*–pirazol[3,4–*d*]pirimidin–4–on.[123] Temperatura tališta čistog alopurinola iznosi 381 °C.[124]



Slika 6. Molekulska struktura alopurinola.[123]

U kliničku medicinu uveden je 1962. godine kao strukturni izomer hipoksantina. Primarna terapeutska primjena alopurinola provodi se u svrhu smanjenja razine mokraćne kiseline u plazmi i urinu, odnosno liječenja gihta. Svoju aktivnost postiže oralnom primjenom i brzom apsorpcijom u gornjem dijelu probavnog sustava. Procijenjena bioraspoloživost je između 67% i 90% s najvećom koncentracijom u plazmi nakon otprilike sat vremena po uzimanju. Molekula alopurinola je polarna s jakim intramolekulskim vodikovim vezama, a tvar limitirane topljivosti u polarnim i nepolarnim otapalima.[125] Lijek je na tržištu prisutan u obliku tableta s trenutnim oslobađanjem doze 100, 200 i 300 mg.[126]

Alopurinol i njegov glavni metabolit oksipurinol inhibiraju ksantin oksidazu, enzim koji katalizira oksidaciju hipoksantina u ksantin i ksantina u mokraćnu kiselinu (slika 7). Oksipurinol je produkt djelovanja aldehid oksidaze na alopurinol i slabiji je inhibitor ksantin oksidaze od alopurinola. Njegova najveća koncentracija u plazmi postiže se između 3 do 5 sati nakon primjene lijeka.[127]



Slika 7. Proces inhibicije ksantin oksidaze.[128]

Vrlo slaba topljivost alopurinola u vodi (0,42 mg mL^{-1} pri 37°C) znači i njegovu slabiju bioraspoloživost. Povećana topljivost značila bi bolju apsorpciju u organizmu te manje količine dnevnih doza lijeka. Procesima mljevenja i taljenja s različitim hidrofilnim nosačima postiže se bolja topljivost i brže oslobađanje djelatne tvari. Postupkom disperzije alopurinola u talinu pomoćne tvari Kollicoat (polivinil alkohol – polietilen glikol graft kopolimer) u omjeru 1:7 postignuto je oslobađanje od 70% nakon 60 minuta pri relativno blagim uvjetima oslobađanja (košarice, 75 okr./min). Izlaganje navedenog pripravka vodenom mediju dovodi do otapanja pomoćne tvari i stvaranja finih koloidnih čestica alopurinola. Veća površina pospješuje otapanje i omogućuje brže djelovanje lijeka. Sama smjesa alopurinola i pomoćne tvari Kollicoat bez postupka krute disperzije ne bi imala isti učinak. Ugradnjom takvog ili sličnog postupka u proces proizvodnje gotovog ljekovitog oblika može značajno ubrzati otpuštanje vrlo slabo topljive djelatne tvari.[129]

Kompleksi koji se sastoje od metala i djelatne tvari poboljšavaju terapeutsko djelovanje lijeka uz istovremeno smanjenje toksičnog utjecaja. Alopurinol u takvoj kombinaciji ima ulogu neutralnog liganda, a Mn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Cd(II) i

Hg(II) središnjeg iona. Stvaranje kompleksnog spoja alopurinola sa svim metalima osim žive moguće je preko atoma N i skupine NH na prstenu pirazola te skupina C=O i NH na prstenu pirimidina. Živa i alopurinol stvaraju kompleksni spoj preko pirimidinskog prstena.[130]

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Uzorci sirovina i tableta

- Alopurinol (krupnije čestice, engl. *coarse grade*), SCI Pharmtech Inc.
- Alopurinol (sitnije čestice, engl. *fine grade*), SCI Pharmtech Inc.
- Alopurinol, Egis Pharmaceuticals PLC
- Laktoza monohidrat, DFE Pharma
- Celuloza, mikrokristalična, FMC
- Povidon, BASF
- Kukuruzni škrob, Roquette
- Karmeloza natrij, umrežena, FMC
- Talk, Imerys
- Magnezijev stearat, Merck
- Smjesa pomoćnih tvari formulacije I
- Smjesa pomoćnih tvari formulacije II
- Alopurinol 100 mg tablete, Belupo: 4 laboratorijske probe (A), 5 pilotskih optimizacijskih serija (B), 4 pilotske stabilitetne serije (C, CST), 5 komercijalnih proizvodnih serija (D)
- Alopurinol 200 mg tablete, Belupo: 18 laboratorijskih probi (A), 13 pilotskih optimizacijskih serija (B), 4 pilotske stabilitetne serije (C, CST), 1 komercijalna proizvodna serija (D)
- Alopurinol 100 mg tablete, drugi proizvođač: 2 komercijalne proizvodne serije (E)
- Alopurinol 200 mg tablete, drugi proizvođač: 2 komercijalne proizvodne serije (E)

3.2. Kemikalije za analizu oslobađanja

- Natrijev hidroksid, p.a., Merck
- Klorovodična kiselina, koncentrirana, Merck
- Voda, pročišćena
- Alopurinol, kućni radni standard RS–27320112 (Belupo prema Ph.Eur.), S = 99,89%

3.3. Mjerni uređaji

3.3.1. Snimanje NIR spektara

Spektri uzoraka tableta i sirovina snimljeni su pomoću FT-NIR spektrometra Multi Purpose Analyzer (MPA) tvrtke Bruker. NIR spektri tableta snimljeni su transmisijom zračenja (spektralno područje 12500–5800 cm^{-1}; razlučivanje 16 cm^{-1}; 64 snimaka; detektor InGaAs) i difuznom refleksijom zračenja (spektralno područje 12500–3600 cm^{-1}; razlučivanje 8 cm^{-1}; 64 snimaka; detektor PbS), dok su spektri sirovina snimljeni samo difuznom refleksijom zračenja. Iz svake serije tableta nasumično je odabrano 3–6 tableta. Tablete su izvagane, snimljen im je NIR spektar s jedne, nasumično odabrane strane, nakon čega je provedena analiza oslobađanja djelatne tvari klasičnom metodom. Praškastim uzorcima u kvarcnim kivetama snimljeni su NIR spektri.

3.3.2. Obrada NIR spektara i multivarijatna analiza podataka

Za snimanje i obradu NIR spektara te razvoj kemometričkih modela metodama PCA i PLS korišten je program OPUS 7.0 (Quant 2).

3.3.3. Analiza oslobađanja djelatne tvari

Za analizu oslobađanja djelatne tvari korištena su četiri različita instrumenta: Erweka DT6, Erweka DT600, Varian VK 7010 i Vankel VK 7000. Za mjerenje temperature medija korišten je termometar broj 148/14. Uzorci tableta i standarda alopurinola vagani su na analitičkim vagama Sartorius CPA225D–OCE i Mettler Toledo AX205DR/A.

Apsorbancija otopina alopurinola pri 250 nm izmjerena je pomoću UV/Vis spektrofotometra Varian Cary 100 (Varian).

3.3.4. Mjerenje promjera, debljine i tvrdoće tableta

Tabletama obiju doza snimljeni su NIR spektri transmisijom i difuznom refleksijom zračenja, nakon čega im je izmjeren promjer i debljina pomičnom mjerkom Mitutoyo 11499747. Mjernim uzorcima određena je tvrdoća na instrumentu Erweka TBH30.

3.4. Referentna metoda oslobađanja djelatne tvari

Za analizu oslobađanja alopurinola iz tableta primijenjen je postupak preuzet iz Američke farmakopeje, iz monografije za alopurinol tablete, prema kojem se kao medij za otapanje koristi 900 mL 0,01 mol L^{-1} klorovodične kiseline u uređaju 2 (lopatice) pri brzini rotacije od 75 okr./min i temperaturi 37±0,5 °C.[131] Vremena uzorkovanja bila su 5., 10., 15., 20., 30. i 45. minuta. Pipetirano je po 10,0 mL otopine iz svake posude, a uzorkovana količina otopine nadomještena je istom količinom svježeg medija zagrijanog na propisanu temperaturu. Otopina je odmah nakon uzorkovanja profiltrirana kroz 0,45 μm RC membranski filter. Prije mjerenja, otopine je bilo potrebno razrijediti medijem: 10 puta za dozu od 100 mg te 20 puta za dozu od 200 mg. Ispitivane otopine mjerene su uz dvije poredbene otopine pripremljene otapanjem 22,0 mg alopurinol RS u 5 mL 0,05 mol L^{-1} natrijevog hidroksida i nadopunjavanjem do 200,0 mL medijem. Zatim su te otopine razrijeđene 10 puta medijem kako bi se dobila koncentracija od 0,011 mg mL^{-1}, što odgovara koncentraciji alopurinola od 100% u ispitivanoj otopini. Izmjerene su apsorbancije poredbenih i ispitivanih otopina pri valnoj duljini 250 nm u kvarcnoj kiveti duljine puta zračenja 1 cm uz medij za otapanje kao slijepu otopinu. Na temelju izmjerenih vrijednosti izračunan je postotak oslobođenog alopurinola u odnosu na deklariranu količinu alopurinola po tableti prema izrazima:

$$\%\ (5\ \text{min}) = \frac{A_{\text{uz5}} \times RF_{\text{av}} \times V_{\text{uz}} \times S}{\text{D}} \tag{3}$$

$$RF_{\text{av}} = \frac{RF_1 + RF_2}{2} \tag{4}$$

$$RF_1 = \frac{W_{\text{st1}}}{A_{\text{st1}} \times V_{\text{st}}} \tag{5}$$

$$RF_2 = \frac{W_{\text{st2}}}{A_{\text{st2}} \times V_{\text{st}}} \tag{6}$$

$$\%\ (10\ \text{min}) = \frac{A_{\text{uz10}} \times RF_{\text{av}} \times V_{\text{uz}} \times S}{\text{D}} + K_5 \tag{7}$$

$$\%\ (15\ \text{min}) = \frac{A_{\text{uz15}} \times RF_{\text{av}} \times V_{\text{uz}} \times S}{\text{D}} + K_5 + K_{10} \tag{8}$$

$$\%\ (20\ \text{min}) = \frac{A_{\text{uz20}} \times RF_{\text{av}} \times V_{\text{uz}} \times S}{\text{D}} + K_5 + K_{10} + K_{15} \quad (9)$$

$$\%\ (30\ \text{min}) = \frac{A_{\text{uz30}} \times RF_{\text{av}} \times V_{\text{uz}} \times S}{\text{D}} + K_5 + K_{10} + K_{15} + K_{20} \quad (10)$$

$$\%\ (45\ \text{min}) = \frac{A_{\text{uz45}} \times RF_{\text{av}} \times V_{\text{uz}} \times S}{\text{D}} + K_5 + K_{10} + K_{15} + K_{20} + K_{30} \quad (11)$$

$$K_{\text{n}} = \frac{A_{\text{uzn}}}{900} \times 10;\ \text{n} = 5\ \text{min}, 10\ \text{min}, 15\ \text{min}, 20\ \text{min}, 30\ \text{min} \quad (12)$$

gdje je:

A_{uzn} = apsorbancija ispitivane otopine u propisanom vremenu uzorkovanja

A_{st1} = apsorbancije poredbene otopine 1

A_{st2} = apsorbancije poredbene otopine 2

W_{st1} = masa alopurinol RS 1 (mg)

W_{st2} = masa alopurinol RS 2 (mg)

RF_1 = faktor odgovora za alopurinol RS 1

RF_2 = faktor odgovora za alopurinol RS 2

RF_{av} = srednja vrijednost faktora odgovora

V_{st} = faktor razrjeđenja poredbene otopine (2000)

V_{uz} = faktor razrjeđenja ispitivane otopine (9000 za 100 mg; 18000 za 200 mg)

S = sadržaj alopurinola u alopurinol RS (%)

D = deklarirani sadržaj alopurinola po tableti

K_{n} = korekcija zbog gubitka alopurinola u 10,0 mL otopine u zadanom vremenu uzorkovanja (%)

Opisana metoda je validirana i koristi se u rutinskim analizama.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Opis uzoraka tableta

Tablete Alopurinol 100 i 200 mg istog su kvalitativnog i kvantitativnog sastava. Proizvedene su postupkom vlažne granulacije i nemaju ovojnicu u obliku filma. Maseni udio alopurinola iznosi 55,6% (*m*/*m*). Sadrže četiri pomoćne tvari: laktozu monohidrat, kukuruzni škrob, povidon i magnezijev stearat. Laktoza monohidrat je pomoćna tvar prisutna u najvećem postotku. Navedeni sastav čini formulaciju I, a količina pojedinih pomoćnih tvari prikazana je u tablici 1 kao literaturno preporučeni raspon. Pojedinačne serije uzoraka formulacije I opisane su u tablici 2 i 3, a maseni udio pomoćnih tvari u svakoj od njih u preporučenim je granicama. Tablete komercijalne serije doze 200 mg su bijele, okrugle, bikonveksne, promjera 9,5 mm, debljine oko 4,6 mm i prosječne mase 360 mg. Tablete doze 100 mg su bijele, okrugle, ravne, ukošenih rubova, promjera 7,0 mm, debljine oko 3,4 mm i prosječne mase 180 mg. Dvije serije doze 100 mg (B12S i D2S) razlikuju se od ostalih. Njihova formulacija označena je kao formulacija II. Sadrže 50,0% (*m*/*m*) alopurinola i sedam pomoćnih tvari: laktozu monohidrat, celulozu mikrokristaličnu, povidon, kukuruzni škorb, umreženu natrij karmelozu, talk i magnezijev stearat. Uloga pojedinih pomoćnih tvari u formulaciji opisana je u tablici 1 Prosječna masa iznosi 200 mg, većeg su promjera i manje debljine od tableta formulacije I (tablica 3).

Istraživani uzorci razlikuju se u debljini i promjeru, tvrdoći, količinama pomoćnih tvari, tj. manjim varijacijama u formulaciji I, serijama djelatne tvari, proizvođačima djelatne tvari, proizvodnim postupcima, veličini proizvedene serije, proizvođaču tableta, starosti i uvjetima skladištenja, dok je maseni udio alopurinola konstantan. Uzorci laboratorijskih probi označeni su slovom A, pilotskih optimizacijskih serija slovom B, pilotskih stabilitetnih serija slovom C, a komercijalnih proizvodnih serija slovom D. Također, u istraživanju su korišteni uzorci obiju doza drugog proizvođača oznake E. Njihov kvalitativni sastav odgovara sastavu tableta formulacije I. Izgled im je nešto drugačiji, tablete doze 200 mg su bikonveksne s oznakama na jednoj strani, dok su tablete doze 100 mg blago bikonveksne s oznakama i crtom između njih na istoj strani tablete. Uzorci oznaka C4ST, C5ST, C8ST i C9ST izuzeti su iz serija C4, C5, C8, C9 i skladišteni šest mjeseci na temperaturi od 40±2 °C i relativnoj

vlažnosti zraka od 75±5% zapakirani u originalnu ambalažu te su nakon toga analizirani. Ostali uzorci skladišteni su u laboratoriju pri temperaturi 20–25 °C. Analiza oslobađanja alopurinola provedena je na ukupno 61 različitom uzorku (57 serija) i 192 tablete. Pojedinačne i srednje vrijednosti oslobađanja alopurinola te standardna devijacija (SD) i relativna standardna devijacija (RSD) prikazane su tablici P1 i P2 u Prilogu (poglavlje 8). Srednje vrijednosti izmjerenih tvrdoća za tri tablete navedene su u tablici P3.

Uzorci odabrani za ovo istraživanje oznake A, B i C izuzeti su iz skupine uzoraka korištene u razvoju proizvoda doze 100 i 200 mg formulacije I. Provedene su analize profila oslobađanja za šest ili dvanaest tableta pri spomenutim uvjetima odmah nakon što su proizvedene. Inicijalni rezultati ne odstupaju od rezultata dobivenih u ovom istraživanju. Time je dokazana stabilnost proizvoda kao i mogućnost korištenja manjeg broja tableta po seriji uz osiguranu pouzdanost dobivenih rezultata.

Tablica 1. Uloga pomoćnih tvari u tabletama alopurinola.

Pomoćna tvar	**Uloga**	**Literaturno preporučeni maseni udio[40] % (*m*/*m*)**
Laktoza monohidrat	punilo	0–100
Kukuruzni škrob	sredstvo za raspadanje	3–25
Povidon	vezivno sredstvo	0,5–5
Magnezijev stearat (Mg-St)	lubrikant	0,25–5
Celuloza, mikrokristalična	punilo	5–15
Natrij karmeloza, umrežena	sredstvo za raspadanje	0,5–5
Talk	klizno sredstvo	1–10

Tablica 2. Opis pojedinačnih serija tableta Alopurinol 200 mg.

Serija	Izgled tableta		Formulacija – razlike	Proizvođač djelatne tvari / serija	Starost/ mjeseci
	Promjer / mm	Debljina / mm			
A1	10,5–10,6	4,3–4,5	I – 16,5% više povidona, dodan kao otopina	SCI / i	46
A2			I – 50% više Mg-St		46
A3			I – 15% manje škroba ukupno, omjer 2,2:1, 50% više povidona	SCI / ii	46
A4			I – 60% više škroba nakon granulacije		46
A5			I – 50% više povidona		45
A6			I – 22% manje škroba ukupno		45
A7			I – 30 % manje škroba ukupno, omjer 1,7:1		44
A8			I – 25% manje povidona, škrob kao i kod A6		44
A10	9,2–9,3	4,4–4,6	I – 15% više škroba tijekom granulacije	SCI / iii	36
A12			I – manja količina laktoze monohidrata dodana nakon granulacije i 40% više škroba dodano nakon granulacije	SCI / iv	36
A14			I – 25% više povidona, 15% više škroba tijekom granulacije	SCI / iii	34
A15			I – 25% više povidona, 15% više škroba tijekom granulacije		34
A16			I – 25% više povidona, ukupan škrob samo nakon granulacije	SCI / vi	34
A18			I – 75% škroba manje tijekom granulacije, 100% škroba više nakon granulacije, ukupna količina škroba smanjena za 8%, lubrikacija 3 minute		33
A19			I – isto kao A18, lubrikacija 5 minuta		33
A21			I		27
A22			I		24
A23			I		24
B4	9,5–9,6		I	SCI / vi	32
B5			I		31
B6			I		27
B7			I		27
B8			I		26
B9			I	SCI / vi	23
B9N		4,7–4,8	I		23
B9V		4,5–4,6	I		23
B9P			I		23
B9U			I – veća brzina kompresije		23
B10			I	Egis / i	14
B10N		4,7	I		14
B10V		4,4	I		14

Serija	Izgled tableta		Formulacija – razlike	Proizvođač djelatne tvari / serija	Starost/ mjeseci
	Promjer / mm	Debljina / mm			
C1	9,5–9,6	4,5–4,6	I	SCI / vi	20
C3			I		19
C4			I	Egis / ii	8
C4ST		4,6–4,7	I		2
C5		4,5–4,6	I		8
C5ST		4,6–4,7	I		2
D1		4,5–4,6	I	Egis / iii	4
E1			kvalitativan sastav isti kao formulacija I	/	>55
E2					>30

Tablica 3. Opis pojedinačnih serija tableta Alopurinol 100 mg.

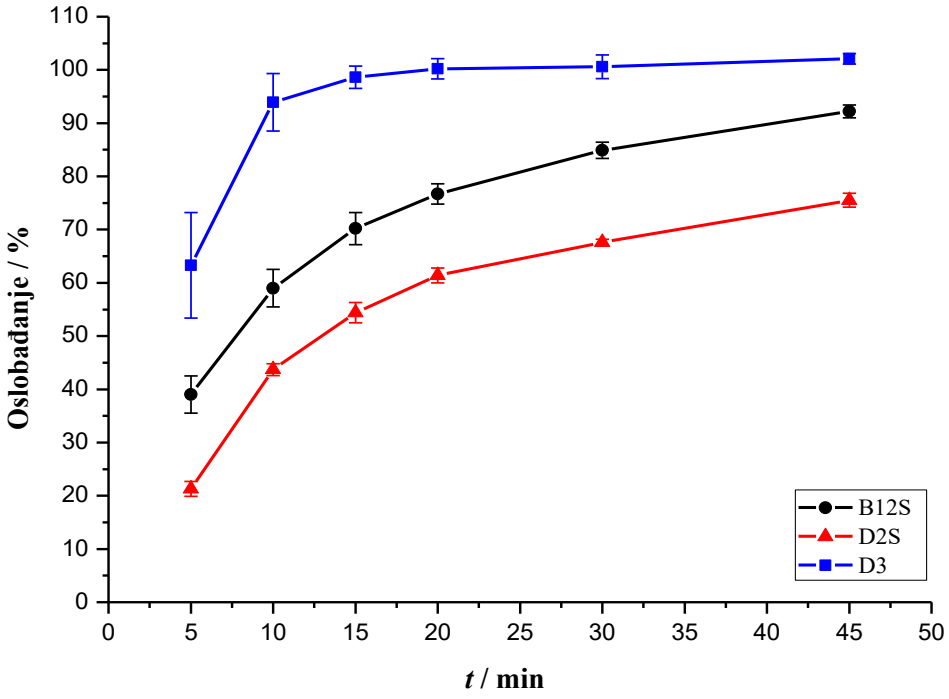
Serija	Izgled tableta		Formulacija – razlike	Proizvođač djelatne tvari / serija	Starost
	Promjer / mm	Debljina / mm			
A25	8,0–8,1 bikonveksne	3,8–3,9	I	SCI / vi	24
A26	7,0	3,2	I		24
A27	7,0	3,2	I		23
A28	7,0	3,2	I – veće tvrdoće od A27		23
B11	7,0	3,4	I		22
B11N	7,0	3,7	I		22
B11V	7,0	3,3	I		22
B11U	7,0	3,3	I – veća brzina kompresije (tvrdoća ~ 70 N)		22
B12S	8,1	2,8	II	Egis / iv	14
C6	7,0	3,4	I	SCI / ii	19
C7	7,0	3,4	I	Egis / i	10
C8	7,0	3,4	I	Egis / ii	8
C8ST	7,0	3,5	I		2
C9	7,0	3,4	I		6
C9ST	7,0	3,5	I		2
D2S	8,06	2,7	II	/	46
D3	7,0	3,4	I	Egis / v	2
D4	7,0	3,4	I	Egis / vi	3
D5	7,0	3,4	I	Egis / vii	6
D6	7,0	3,4	I	Egis / viii	1
E3	7,9	3,2	kvalitativan sastav isti kao formulacija I	/	>61
E4					>36

4.2. Analiza oslobađanja alopurinola referentnom metodom

4.2.1. Utjecaj sastava tableta

Tablete alopurinola formulacije I oslobode više od 85% djelatne tvari u 15 minuta pa pripadaju kategoriji oralnih oblika s vrlo brzim oslobađanjem.[17] Topljivost alopurinola u 0,01 mol L^{-1} klorovodične kiseline pri temperaturi od 37 °C iznosi 0,65 mg mL^{-1}, tj. 585 mg u 900 mL čime nisu zadovoljeni *sink* uvjeti za dozu od 200 mg. Postizanje *sink* uvjeta (minimalno 600 mg u 900 mL) osigurava kompletno otpuštanje deklarirane količine djelatne tvari prije zasićenja otopine analitom. U literaturi nije zabilježeno postojanje različitih kristalnih oblika alopurinola, stoga je razlika u veličini čestica jedino fizikalno svojstvo koje može imati utjecaj na brzinu oslobađanja. Uzorci tableta obiju doza formulacije I proizvedeni u Belupu sadrže 13 serija alopurinola dva različita proizvođača (SCI i Egis) krupnijih čestica (engl. *coarse grade*). Analizom tableta koje su sadržavale različite serije, različitih proizvođača alopurinola provjerena su i potvrđena njegova postojana fizikalno–kemijska svojstva. Rezultati oslobađanja djelatne tvari za uzorke definirane formulacije i proizvodnog postupka (B, C i D) u 45. minuti uzorkovanja viši su od 97%, čime je dokazano da vrlo slaba topljivost alopurinola nije bila limitirajući faktor. Uzorci formulacije II, B12S i D2S doze 100 mg razlikuju se prema proizvođaču alopurinola, veličini čestica alopurinola, veličini proizvedene serije i starosti. Tablete serije B12S sadrže krupnije čestice alopurinola, a D2S sitnije čestice (engl. *fine grade*). Znatne razlike u rezultatima oslobađanja (slika 8) posljedica su različitih veličina čestica djelatne tvari. Tablete sa sitnijim česticama alopurinola imaju niže oslobađanje od onih koje sadrže alopurinol krupnijih čestica. Razlog tome je proizvodni postupak vlažne granulacije zbog kojeg se sitnije čestice čvršće vežu međusobno i s pojedinim pomoćnim tvarima pa je otpuštanje alopurinola u otopinu pri uvjetima oslobađanja sporije.

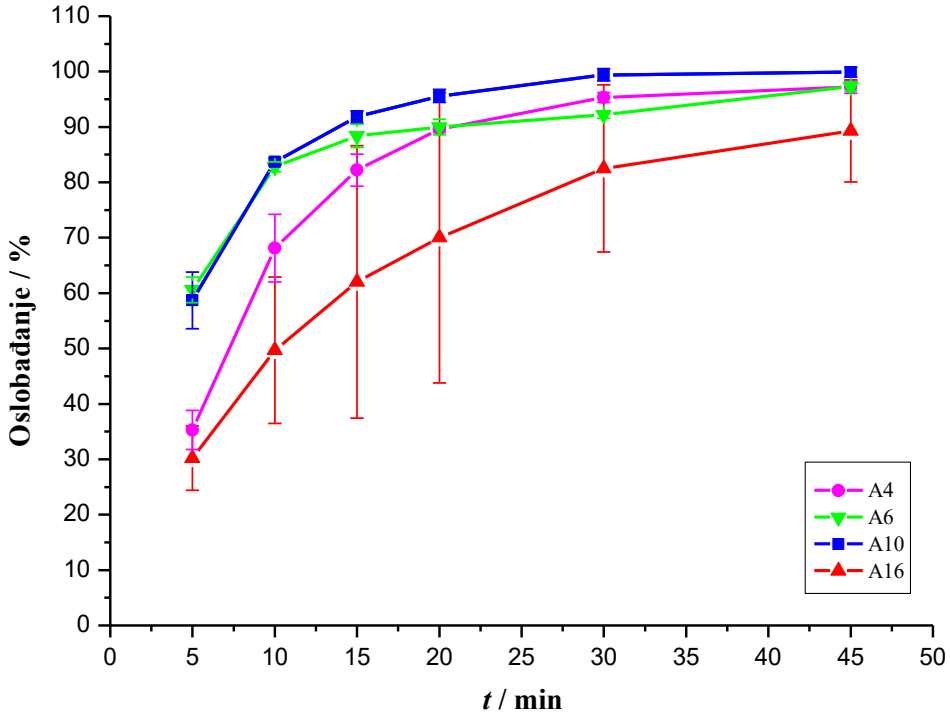
Najveći utjecaj na brzinu oslobađanja alopurinola ima formulacija. Tablete doze 100 mg formulacije I imaju viši profil oslobađanja od tableta formulacije II (slika 8). Osim što formulacija II sadrži tri dodatne pomoćne tvari, najveća razlika je u količini sredstava za raspadanje kojeg u odnosu na formulaciju I ima otprilike tri puta manje, a vezivnog sredstva 1,5 puta više. Vrsta i količina pojedinih pomoćnih tvari ubrzavaju ili usporavaju otpuštanje alopurinola u otopinu. Razlika u postotku otpuštenog alopurinola u 15. minuti uzorkovanja između serija B12S i D3 koje sadrže alopurinol istog proizvođača iznosi oko tridesetak posto.



Slika 8. Profili oslobađanja alopurinola iz tableta Alopurinol 100 mg formulacije I (D3) i formulacije II (B12S i D2S). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost postotka otpuštenog alopurinola i stupca pogreške sa standardnom devijacijom za svako vrijeme uzorkovanja.

Variranje količina sastojaka koji imaju ulogu vezivnog sredstva, sredstva za raspadanje, lubrikanta ili punila provedeno je na laboratorijskim probama formulacije I doze 200 mg. Prosječna masa tableta zadržana je konstantnom pa je svako variranje u masi pomoćnih tvari nadomješteno laktoza monohidratom (punilo). Maseni udio alopurinola također je zadržan konstantnim. Uvođenjem uzoraka s većim masenim udjelom vrlo slabo topljivog alopurinola za 200 mg dozu uvela bi se dodatna varijacija koja se ne bi uklopila u stvarno stanje gotovog proizvoda. Također, veća količina djelatne tvari mogla bi značajno promijeniti tvrdoću tableta čime bi se direktno utjecalo na brzinu njenog otpuštanja. Isti slučaj bio bi i s manjom količinom djelatne tvari od deklarirane. Koncentracija u slučaju kompletnog otpuštanja alopurinola kod doze od 100 mg iznosi 0,11 mg mL^{-1}, a kod doze od 200 mg 0,22 mg mL^{-1}. Manje promjene u količini škroba, povidona i magnezijevog stearata utjecale su na profil oslobađanja alopurinola.

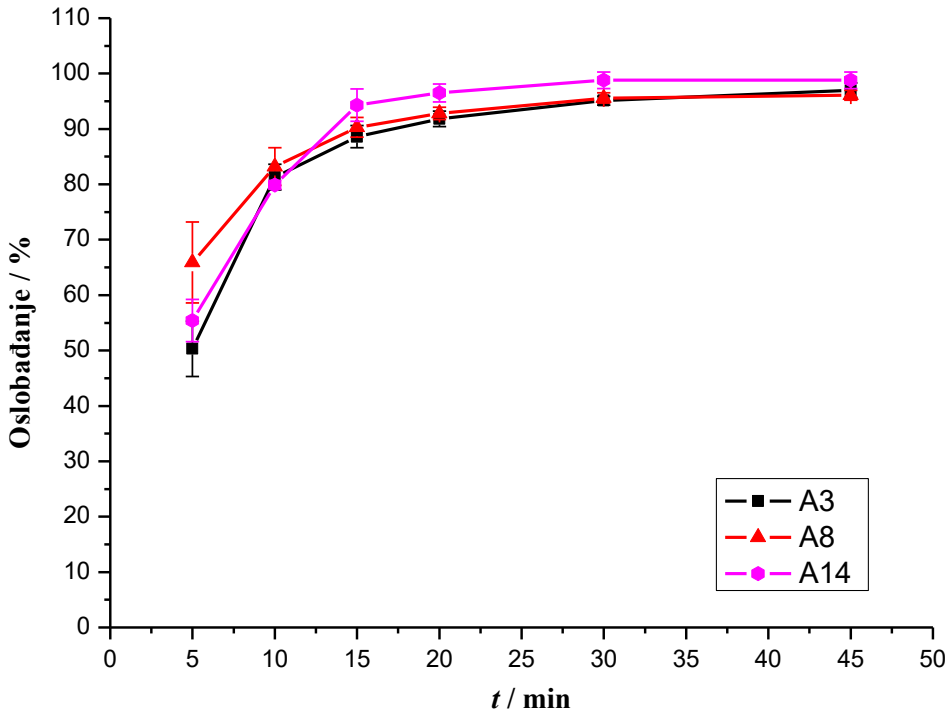
Postupak oslobađanja alopurinola započinje procesom raspadanja tablete pri čemu ključnu ulogu ima sredstvo za raspadanje odnosno kukuruzni škrob. U vodenoj otopini škrob bubri i potiče raspadanje tablete. U postupku proizvodnje tableta kukuruzni škrob dodaje se dva puta, tijekom granulacije i nakon granulacije u omjeru 1,8:1. Variranjem tog omjera i ukupne količine škroba u odnosu na završnu formulaciju utjecalo se na profil oslobađanja što dokazuju vrijednosti u tablici P1 i grafički prikaz na slici 9, gdje su uspoređivane laboratorijske probe A4, A6, A10 i A16. U laboratorijsku probu A16 cjelokupna količina kukuruznog škroba dodana je nakon granulacije. Vrijednosti postotka oslobođenog alopurinola u svim vremenima uzorkovanja su najniže, a RSD vrlo visok (10,3–39,7%) zbog sporog i nejednolikog raspadanja tableta. Količina oslobođenog alopurinola u 15. minuti iznosi 62% čime nije zadovoljen zahtjev za vrlo brzo otpuštanje. Najviši profil oslobađanja imaju uzorci probe A10, u koje je dodano oko 15% više škroba tijekom procesa granulacije. Niže vrijednosti oslobađanja izmjerene su za probu A6, koja sadrži oko 22% manje ukupnog škroba, a što je izraženo tek u 15. minuti i kasnijim vremenima uzorkovanja. Veća količina škroba dodana nakon granulacije u probu A4 rezultirala je sporijim profilom oslobađanja.



Slika 9. Profili oslobađanja alopurinola iz tableta Alopurinol 200 mg laboratorijskih probi A4, A6, A10 i A16 – variranje masenog udjela kukuruznog škroba. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost postotka otpuštenog alopurinola i stupca pogreške sa standardnom devijacijom za svako vrijeme uzorkovanja.

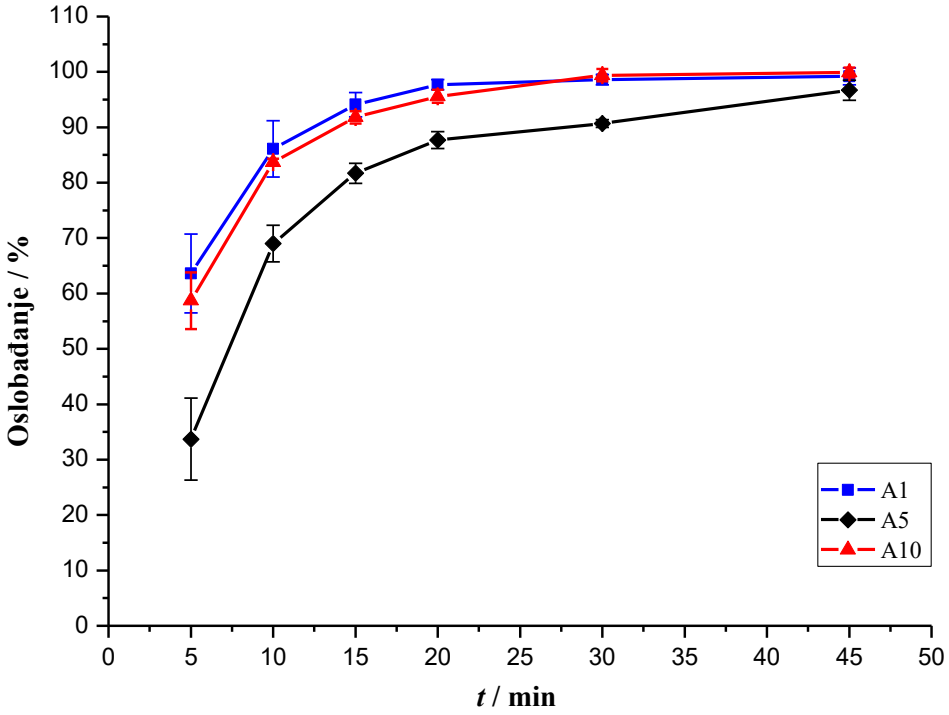
Promjena u postupku dodavanja laktoze monohidrata, također je utjecala na otpuštanje alopurinola. U laboratorijsku probu A12 dodavana je dva puta, tijekom i nakon granulacije, pa je već u 15. minuti oslobođeno oko 98% djelatne tvari.

Usporedbom serija kojima su varirane mase škroba i povidona (slika 10), vidljivo je da su tablete s najmanje škroba i najviše povidona (A3) imale najniži profil oslobađanja. Povidon ima ulogu vezivnog sredstva i dodaje se u krutom obliku tijekom granulacije. Zatim slijedi serija A8 koja je sadržavala 22% manje ukupnog škroba i 25% manje povidona, a značajniji utjecaj manje količine vezivnog sredstva vidljiv je samo za 5. minutu uzorkovanja. Veća količina dodanog škroba, za 15% tijekom granulacije u probi A14, došla je do izražaja u 15. minuti oslobađanja, a 25% više povidona u odnosu na završnu formulaciju usporilo je otpuštanje u 5. i 10. minuti uzorkovanja.



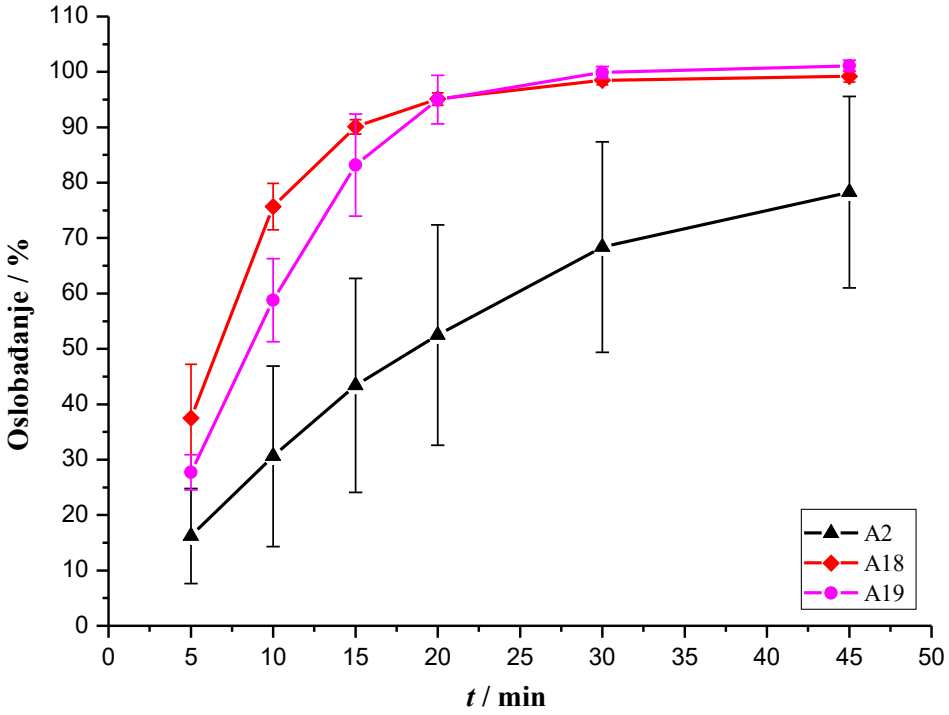
Slika 10. Profili oslobađanja alopurinola iz tableta Alopurinol 200 mg laboratorijskih probi A3, A8 i A14 – variranje masenog udjela kukuruznog škroba i povidona. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost postotka otpuštenog alopurinola i stupca pogreške sa standardnom devijacijom za svako vrijeme uzorkovanja.

Na slici 11 prikazani su profili oslobađanja laboratorijskih probi A1, A5 i A10. Uzorci serije A5 sadrže najveći maseni udio povidona i imaju najniži profil oslobađanja. Zatim slijedi serija A10 s 50% manjim udjelom vezivnog sredstva, tj. količinom kao u završnoj formulaciji. Najviši profil oslobađanja određen je za uzorke laboratorijske probe A1 koja sadrži 16,5% više povidona u odnosu na završnu formulaciju. Za tu laboratorijsku probe vezivno sredstvo je prije granulacije otopljeno i kao otopina dodano u smjesu. Povidon koji je dodan u krutom obliku bolje djeluje kao vezivno sredstvo pa je otpuštanje alopurinola sporije.



Slika 11. Profili oslobađanja alopurinola iz tableta Alopurinol 200 mg laboratorijskih probi A1, A5 i A10 – variranje masenog udjela povidona. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost postotka otpuštenog alopurinola i stupca pogreške sa standardnom devijacijom za svako vrijeme uzorkovanja.

Magnezijev stearat ima ulogu lubrikanta, no zbog svog hidrofobnog svojstva i ovisno o prisutnoj količini može usporiti otpuštanje alopurinola. Laboratorijska proba A2 ima 50% veći maseni udio magnezijevog stearata od ostalih probi što je rezultiralo vrlo niskim profilom oslobađanja i neujednačenim rezultatima u svim vremenima uzorkovanja (slika 12). Osim količine, na otpuštanje alopurinola utječe i trajanje lubrikacije. Uzorci serija A18 i A19 sadrže jednaku količinu lubrikanta, no vrijeme lubrikacije je u slučaju probe A19 dvije minute dulje. Dulje vrijeme lubrikacije usporilo je otpuštanje alopurinola do 20. minute. Fine čestice magnezijevog stearata tijekom miješanja oblažu ostatak čestica smjese kako bi se olakšao protok tijekom proizvodnje, no dulje miješanje može stvoriti deblji površinski sloj pa je raspadljivost tablete otežana, a time i oslobađanje alopurinola.[132]

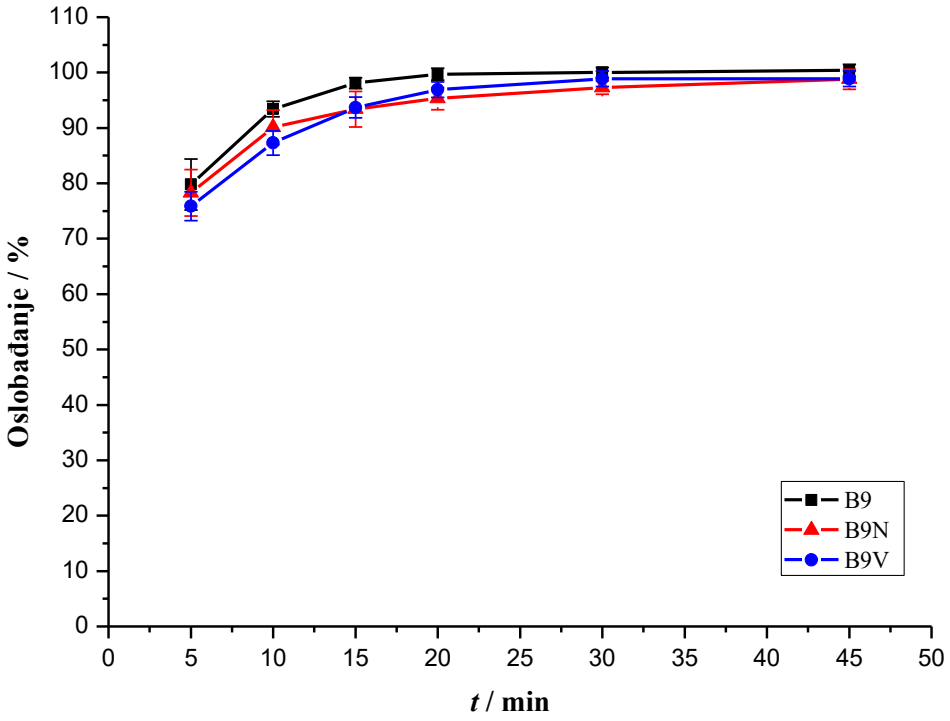


Slika 12. Profili oslobađanja alopurinola iz tableta Alopurinol 200 mg laboratorijskih probi A2, A18 i A19 – variranje masenog udjela magnezijevog stearata i vremena lubrikacije. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost postotka otpuštenog alopurinola i stupca pogreške sa standardnom devijacijom za svako vrijeme uzorkovanja.

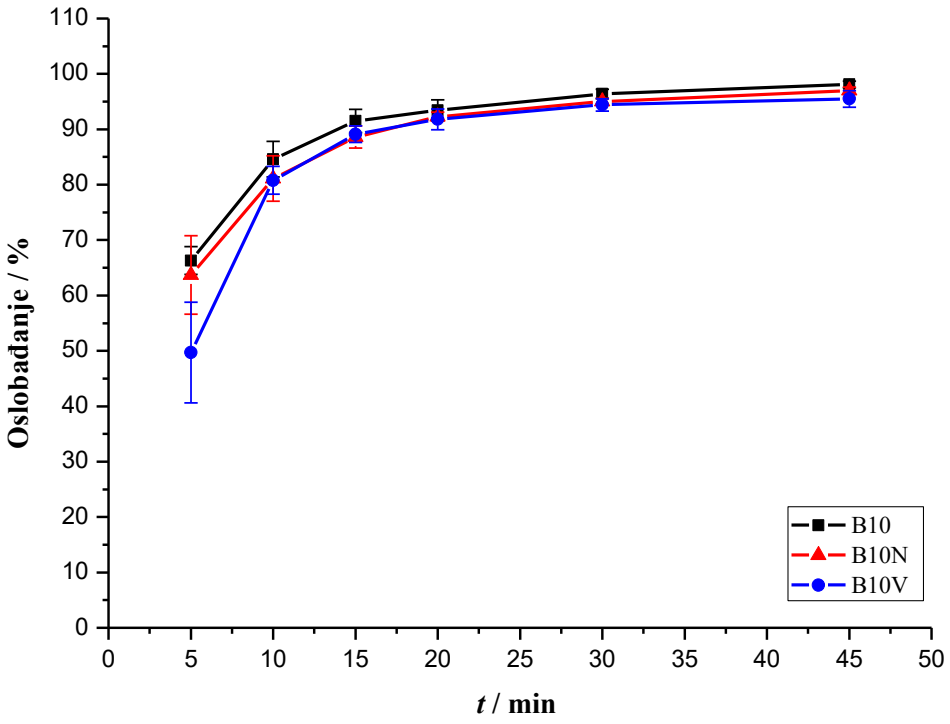
4.2.2. Utjecaj fizikalnih parametara tableta

Osim razlika u formulaciji na profil oslobađanja djelatne tvari iz gotovog oblika mogu imati i neki fizikalni parametri kao što su tvrdoća, debljina ovojnice te veličina i oblik tableta. Tvrdoća tablete rezultat je vodikovih veza između unutarnjih površina čestica pomoćnih tvari laktoze, škroba i celuloze koje nastaju uslijed pritiska tijekom tabletiranja. Optimalna tvrdoća tableta koja osigurava kvalitetu proizvoda postiže se dodavanjem dovoljne količine lubrikanta, u ovom slučaju magnezijevog stearata i pogodnim trajanjem procesa lubrikacije.[133] Iako je fizikalni parametar, tvrdoća tableta ovisi o vrsti i količini komponenata. Tvrdoća alopurinol tableta obiju doza formulacije I iznosi oko 70 N. Utjecaj tvrdoće na profil oslobađanja alopurinola promatran je na uzorcima B9 i B10 doze 200 mg te B11 doze 100 mg.

Izmjerena tvrdoća tableta optimizacijske serije B9N iznosi 54 N, B9 82 N, a B9V 100 N. Razlika u tvrdoći od gotovo 50 N između serija B9N i B9V nije imala značajan utjecaj na profil oslobađanja alopurinola (slika 13). Uzorci tableta B10 razlikuju se od uzoraka B9 u proizvođaču djelatne tvari. Tvrdoće su im podjednake, no profili oslobađanja uzoraka B10 niži su za oko desetak posto u prve tri točke uzorkovanja (slika 14). Značajnija razlika u oslobađanju alopurinola između uzoraka B10, B10N i B10V zabilježena je jedino u 5. minuti, kada tablete veće tvrdoće imaju oko 15% niže vrijednosti otpuštenog alopurinola, ali i visok RSD (18,3%). U oba slučaja, uzorci više i niže tvrdoće ne pokazuju razlike u vrijednostima oslobođenog alopurinola, dok su vrijednosti kod uzoraka optimalne tvrdoće viši i ujednačeniji čak i u prvom intervalu uzorkovanja (slike 13 i 14).

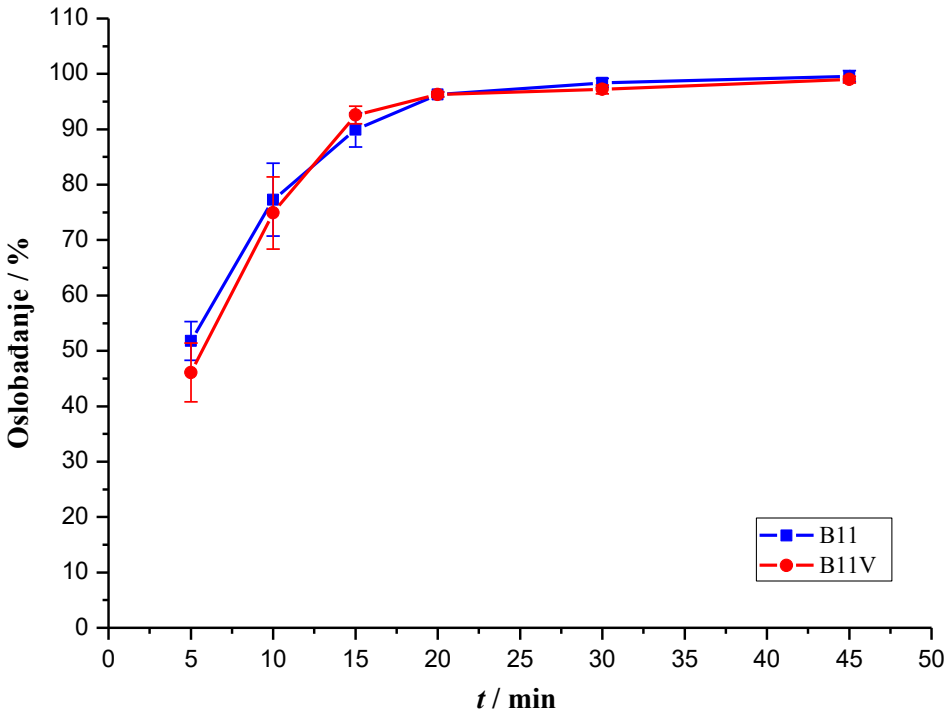


Slika 13. Profili oslobađanja alopurinola iz tableta Alopurinol 200 mg optimizacijskih serija B9, B9N i B9V – razlike u tvrdoći. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost postotka otpuštenog alopurinola i stupca pogreške sa standardnom devijacijom za svako vrijeme uzorkovanja.



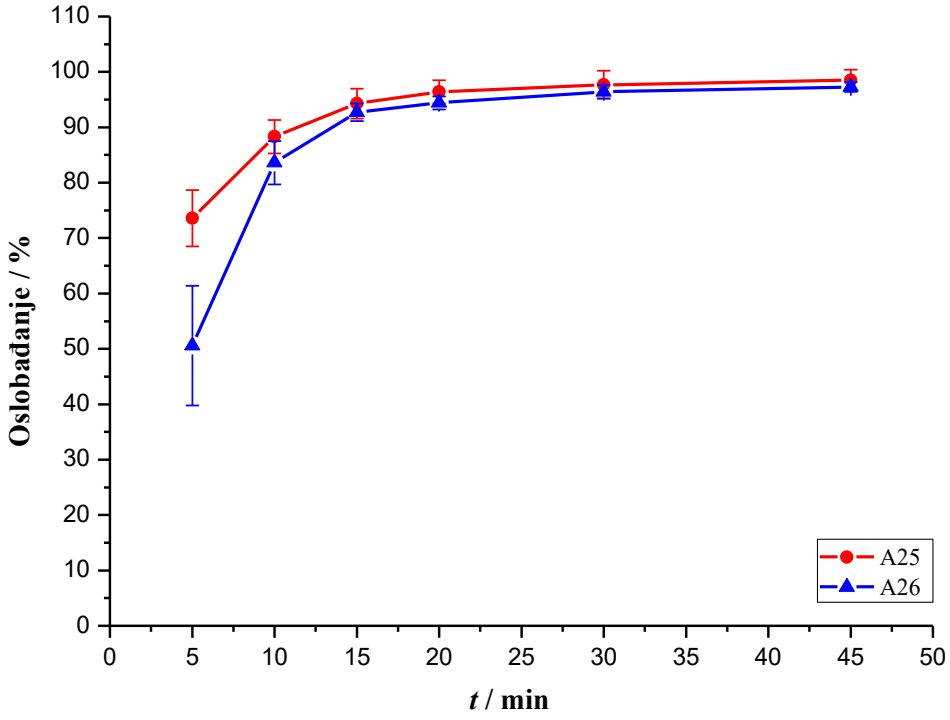
Slika 14. Profili oslobađanja alopurinola iz tableta Alopurinol 200 mg optimizacijskih serija B10, B10N i B10V – razlike u tvrdoći. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost postotka otpuštenog alopurinola i stupca pogreške sa standardnom devijacijom za svako vrijeme uzorkovanja.

Kod 100 mg doze, razlika u tvrdoći još je manje utjecala na profil oslobađanja zbog dvostruko manje količine alopurinola i manjih dimenzija tableta (slika 15).



Slika 15. Profili oslobađanja alopurinola iz tableta Alopurinol 100 mg optimizacijskih serija B11 i B11V – razlike u tvrdoći. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost postotka otpuštenog alopurinola i stupca pogreške sa standardnom devijacijom za svako vrijeme uzorkovanja.

Osim tvrdoće, oblik i dimenzije tableta fizikalni su parametri koji mogu imati utjecaj na brzinu otpuštanja djelatne tvari u otopinu. Uzorci laboratorijskih probi A25 i A26 doze 100 mg iste su formulacije i proizvodnog postupka, a razlikuju se po obliku. Tablete probe A25 su bikonveksne te većeg promjera i debljine (tablica 2) u odnosu na tablete probe A26 koje izgledom odgovaraju proizvodnim serijama. Veća površina i niža tvrdoća za oko 30 N tableta serije A25 imale su za posljedicu više vrijednosti oslobađanja u 5. i 10. minuti uzorkovanja (slika 16).



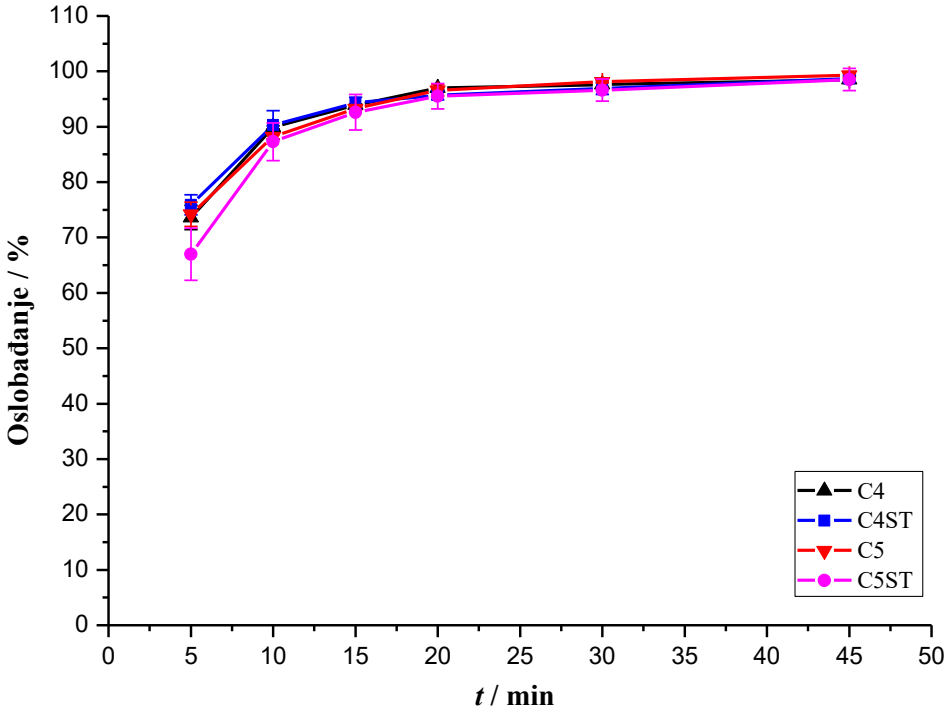
Slika 16. Profili oslobađanja alopurinola iz tableta Alopurinol 100 mg laboratorijskih probi A25 i A26 – razlike u obliku tableta. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost postotka otpuštenog alopurinola i stupca pogreške sa standardnom devijacijom za svako vrijeme uzorkovanja.

4.2.3. Utjecaj uvjeta skladištenja tableta

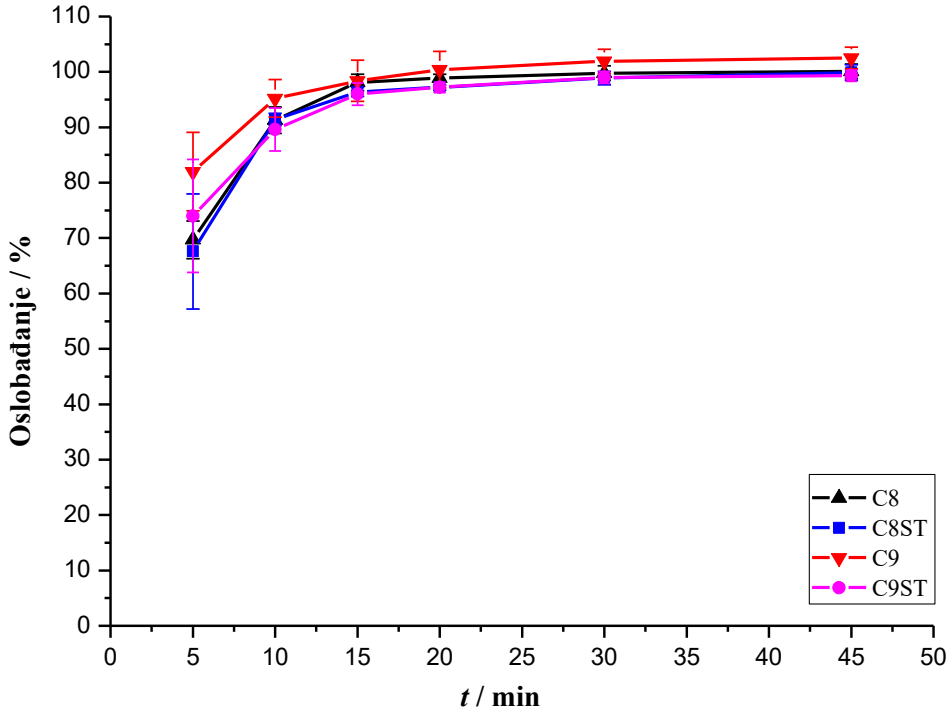
Dvije serije tableta doze 100 i 200 mg, osim pri standardnim uvjetima temperature i vlage, skladištene su i pri temperaturi 40±2°C i relativnoj vlažnosti 75±5% tijekom 6 mjeseci. Analiza oslobađanja provedena je za obje skupine uzoraka.

Profili oslobađanja alopurinola iz uzoraka doze 200 mg C4 (20–25 °C) i C4ST (40±2°C i 75±5% RV) ne razlikuju se, dok se vrijednosti oslobađanja za uzorke C5 i C5ST razlikuju samo u prvom intervalu uzorkovanja za 7% (slika 17). Također, rezultati profila oslobađanja svih četiriju serija vrlo su ujednačeni. Zanemarive razlike u rezultatima primjećene su za uzorke C8 i C8ST doze 100 mg, dok serija C9 ima nešto viši profil od C9ST. Osim toga, profili su manje međusobno ujednačeni nego što je to slučaj za uzorke doze

200 mg (slika 18). Svi uzorci su i nakon izlaganja stres testu zadržali svojstva vrlo brzog oslobađanja te se obje doze smatraju stabilnim.



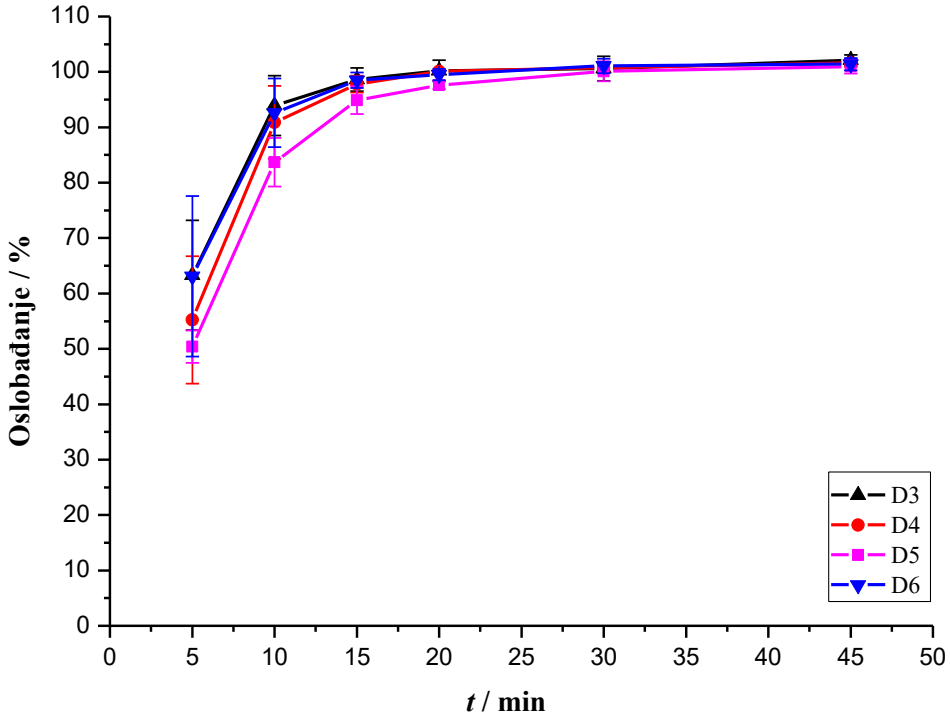
Slika 17. Profili oslobađanja alopurinola iz tableta Alopurinol 200 mg stabilitetnih serija C4, C4ST, C5 i C5ST – različiti uvjeti skladištenja. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost postotka otpuštenog alopurinola i stupca pogreške sa standardnom devijacijom za svako vrijeme uzorkovanja.



Slika 18. Profili oslobađanja alopurinola iz tableta Alopurinol 100 mg stabilitetnih serija C8, C8ST, C9 i C9ST – različiti uvjeti skladištenja. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost postotka otpuštenog alopurinola i stupca pogreške sa standardnom devijacijom za svako vrijeme uzorkovanja.

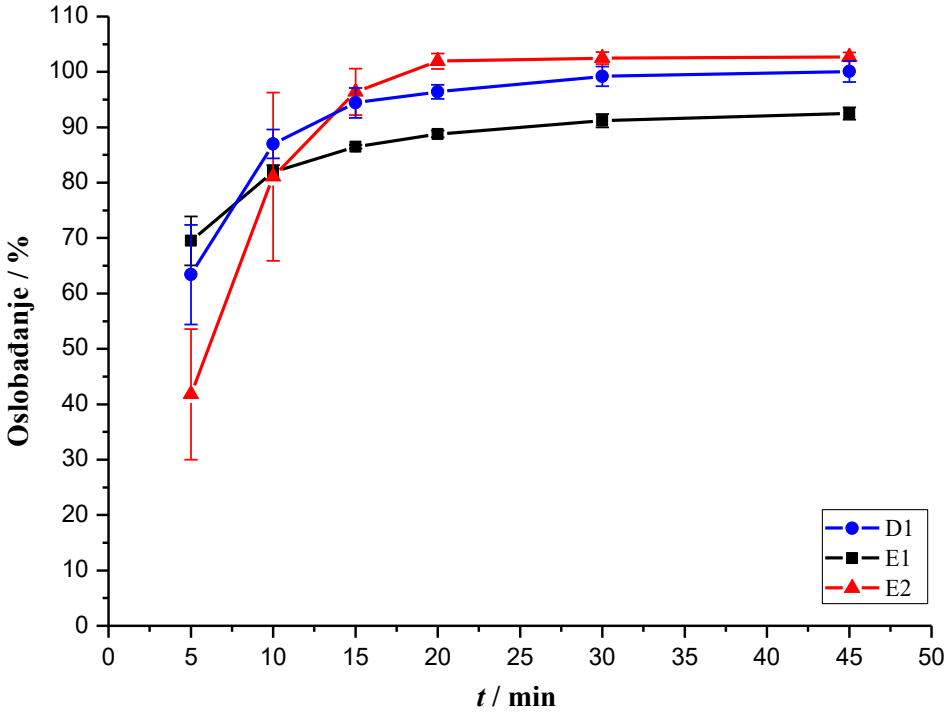
4.2.4. Usporedba komercijalnih serija

Analizirane proizvodne serije doze 100 mg D3, D4, D5 i D6 sadrže različite serije djelatne tvari istog proizvođača. Slika 19 pokazuje usporedive rezultate profila oslobađanja analiziranih uzoraka. Različite serije alopurinola istog proizvođača nemaju značajniji utjecaj na postupak otpuštanja djelatne tvari iz tableta, što je dokaz postojanih fizikalnih svojstava alopurinola, kao i stabilnog te ponovljivog postupka proizvodnje gotovog ljekovitog oblika.



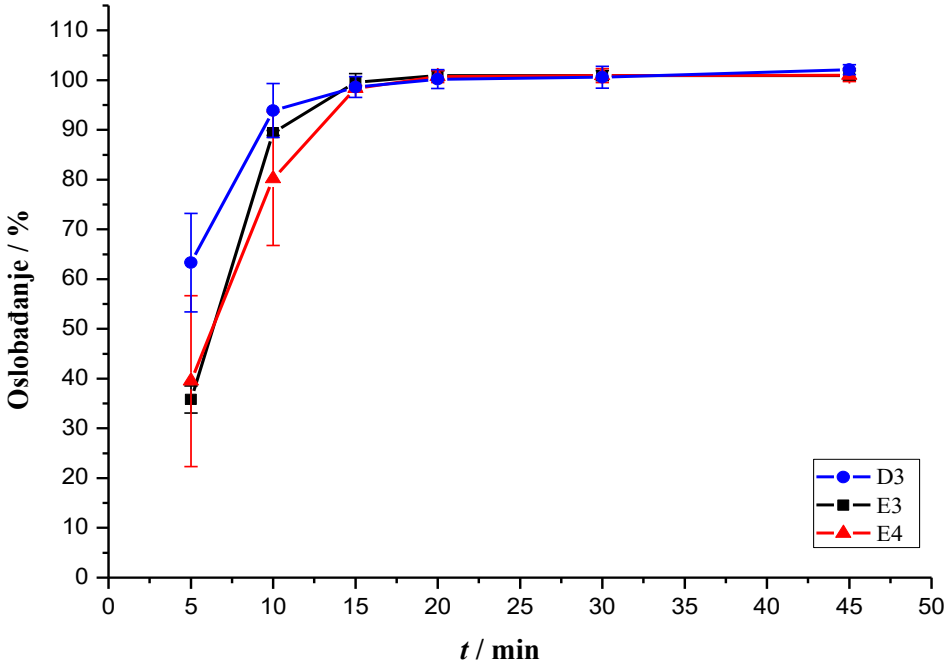
Slika 19. Profili oslobađanja alopurinola iz tableta Alopurinol 100 mg proizvodnih serija. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost postotka otpuštenog alopurinola i stupca pogreške sa standardnom devijacijom za svako vrijeme uzorkovanja.

Usporedbom uzoraka doze 200 mg koji nisu proizvedeni u Belupu (serije E1 i E2) primijećene su razlike od 10% otpuštenog alopurinola u 15. minuti uzorkovanja. Iako kvantitativan sastav proizvoda nije poznat, razlika između njih ne bi smjelo biti. Razlike u rezultatima najvjerojatnije su posljedica drugačijih fizikalnih svojstava djelatne tvari, kao što je npr. veličina čestica, zatim različitih fizikalnih svojstava pomoćnih tvari ili manjih razlika u proizvodnom postupku. Belupova proizvodna serija D1 po rezultatima je sličnija seriji E2, koja je otpustila više alopurinola u zadanim vremenima uzorkovanja (slika 20).



Slika 20. Profili oslobađanja alopurinola iz tableta Alopurinol 200 mg proizvodnih serija D (Belupo) i E (drugi proizvođač). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost postotka otpuštenog alopurinola i stupca pogreške sa standardnom devijacijom za svako vrijeme uzorkovanja.

Profili oslobađanja alopurinola iz uzoraka serija E3 i E4 doze 100 mg značajno se ne razlikuju nakon 15. minute, no u prvoj točki uzorkovanja (5. minuta) postotak oslobođenog alopurinola je oko 20% niži u odnosu na Belupove komercijalne serije (slika 21).



Slika 21. Profili oslobađanja alopurinola iz tableta Alopurinol 100 mg proizvodnih serija D (Belupo) i E (drugi proizvođač). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost postotka otpuštenog alopurinola i stupca pogreške sa standardnom devijacijom za svako vrijeme uzorkovanja.

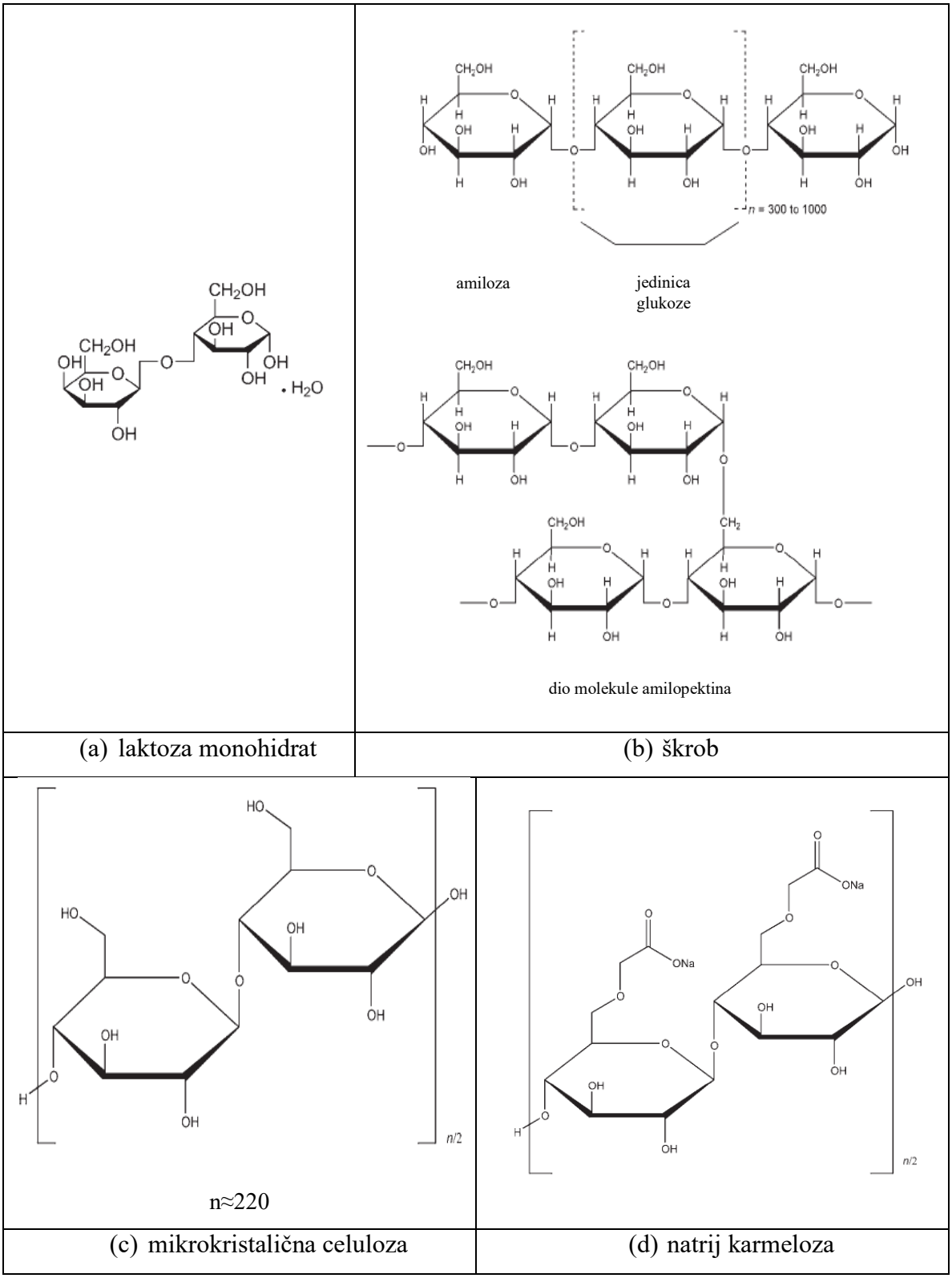
Prikazani rezultati profila oslobađanja dokazuju da poznavanje samo kvalitativnog sastava proizvoda s vrlo brzim oslobađanjem vrlo jednostavne formulacije od samo pet sastojaka nije dovoljno kako bi se proizveo generički lijek usporediv s referentnim ljekovitim oblikom. Već i vrlo male varijacije u omjerima pomoćnih tvari mogu znatno ubrzati ili usporiti otpuštanje djelatne tvari. Također, različita raspodjela veličine čestica djelatne tvari kao i pomoćne tvari istog kemijskog sastava, ali drugačijih fizikalnih osobina mogu utjecati na izgled profila oslobađanja. Svemu tome pridonosi i mjesto proizvodnje samog proizvoda. Vrlo slična tehnologija ipak nije identična te može imati utjecaj na završni proizvod iako su zadovoljeni svi propisani parametri kontrole kvalitete. No, valja naglasiti da se svi profili oslobađanja smatraju podudarnim ako je u 15. minuti uzorkovanja otpušteno više od 85% alopurinola. Također, profili oslobađanja komercijalnih serija, iako su međusobno podudarni, mogu pokazivati veće razlike u rezultatima u odnosu na serije proizvedene u manjim količinama (laboratorijske probe, optimizacijska skala).

4.3. NIR spektroskopija

4.3.1. NIR spektri pojedinačnih sastojaka tableta

Svaki pojedini sastojak tablete alopurinola ima svoj karakterističan NIR spektar. U molekulskoj strukturi nalaze se veze C–H, N–H i O–H, čije vibracije imaju za posljedicu vrlo intenzivne vrpce viših tonova ili kombinacijske vrpce. Na slikama 22 i 23 prikazane su strukturne formule svake pojedinačne pomoćne tvari koje čine sadržaj tableta. Laktoza monohidrat, kukuruzni škrob, celuloza i umrežena natrij karmeloza u svom sastavu sadrže molekule glukoze. Njihovi NIR spektri vrlo su slični, no karakteristične vrpce moguće je opaziti bez dodatne obrade snimljenih spektara. Strukturne formule povidona, magnezijevog stearata, talka i alopurinola razlikuju se u cijelosti, što je i potvrđeno karakterističnim NIR spektrima snimljenim difuznom refleksijom zračenja u rasponu 12500–3600 cm^{-1} (slika 24). Sastavni dio laktoze monohidrata je voda prisutna u količini 4,5–5,5% (*m*/*m*), stoga je jedna od vrlo intenzivnih vrpci kombinacijska vrpca asimetričnog istezanja veza O–H i svijanja molekule vode pri 5170 cm^{-1}. Navedena vrpca se, osim vodi, pripisuje i skupinama OH u strukturi ugljikohidrata. U spektrima alopurinola i talka ne opaža se karakteristična NIR vrpca vode, dok je u spektrima ostalih pomoćnih tvari vrlo intenzivna. Pomak vrpce vode u odnosu na odgovarajuću vrpcu u spektru laktoze monohidrata posljedica je razlike u strukturi molekula i činjenice da je voda adsorbirana. Moguća prisutnost vlage u pojedinim sirovinama propisana je limitom navedenim u farmakopejskim monografijama, a u slučaju pomoćnih tvari dozvoljena je i do nekoliko postotaka.

U spektrima kukuruznog škroba, mikrokristalične celuloze i umrežene natrij karmeloze opaža se nešto manji broj vrpci u odnosu na spektre ostalih sastojaka. NIR vrpce navedenih polisaharida vrlo su široke i većinom se preklapaju. Spektralno područje iznad 9200 cm^{-1} sadrži šum i vrpce vrlo slabog intenziteta te je izostavljeno iz daljnjih analiza.



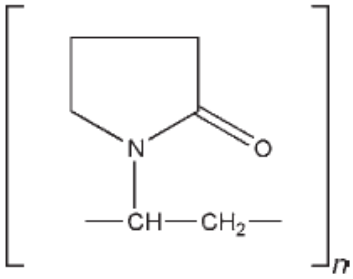
(a) laktoza monohidrat

(b) škrob

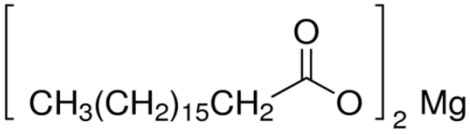
(c) mikrokristalična celuloza

(d) natrij karmeloza

Slika 22. Strukturne formule laktoze monohidrata (a), škroba (b), mikrokristalične celuloze (c) i natrij karmeloze (d).[40]



(a) povidon

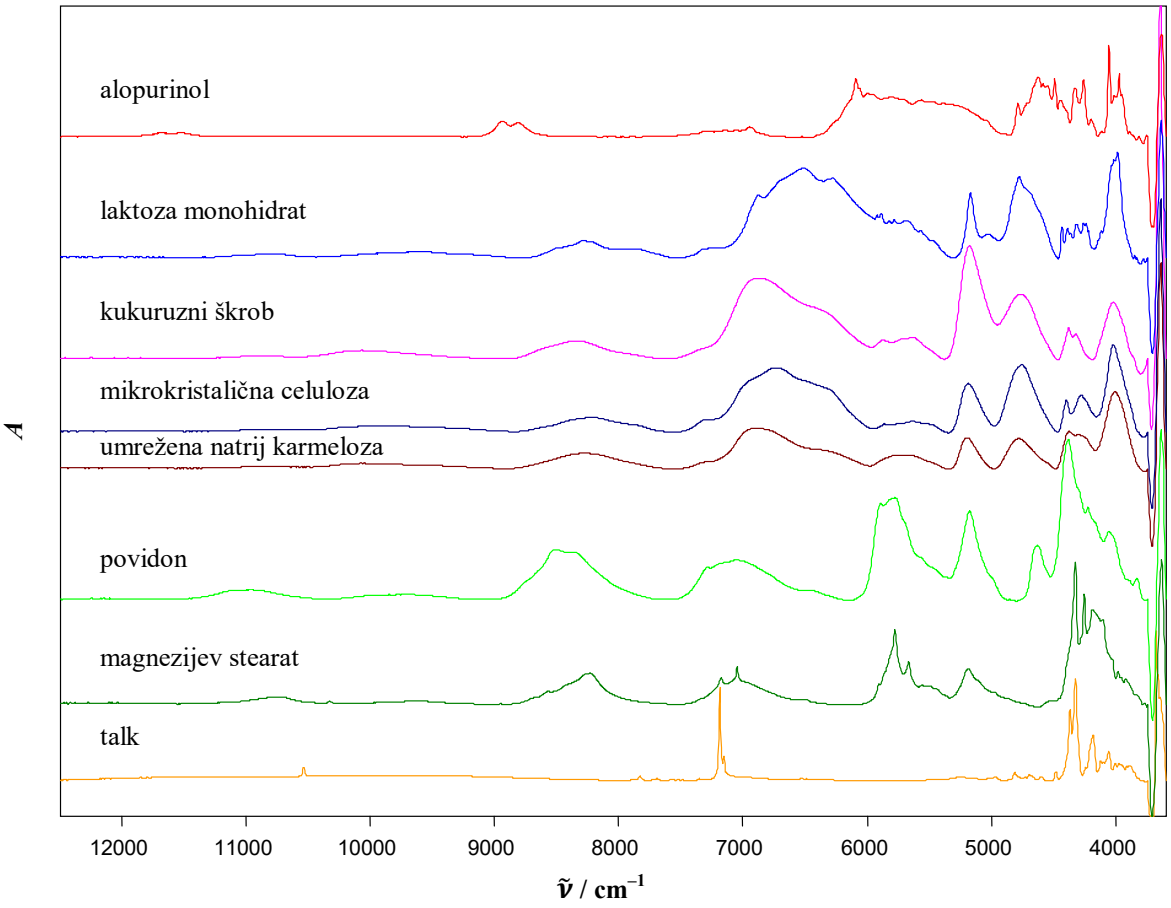


(b) magnezijev stearat

$Mg_6(Si_2O_5)_4(OH)_4$

(c) talk

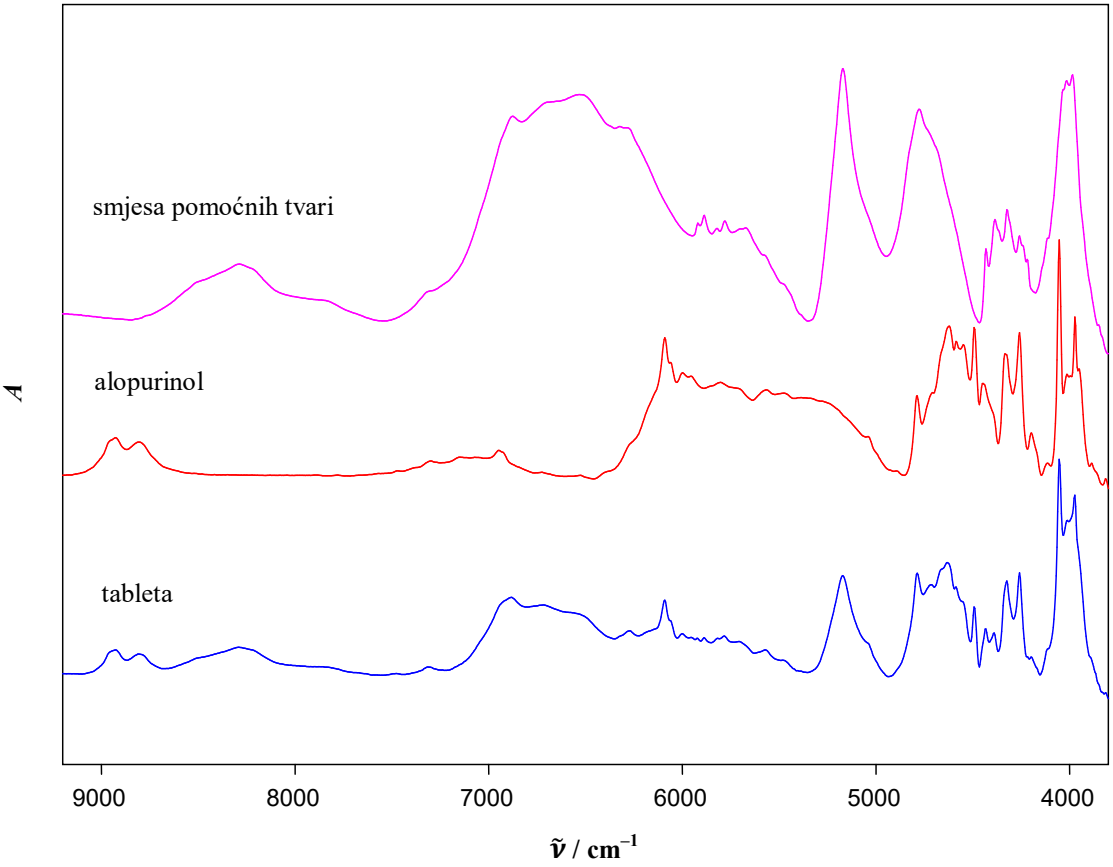
Slika 23. Strukturne formule povidona (a) i magnezijevog stearata (b) te empirijska formula talka (c).[40]



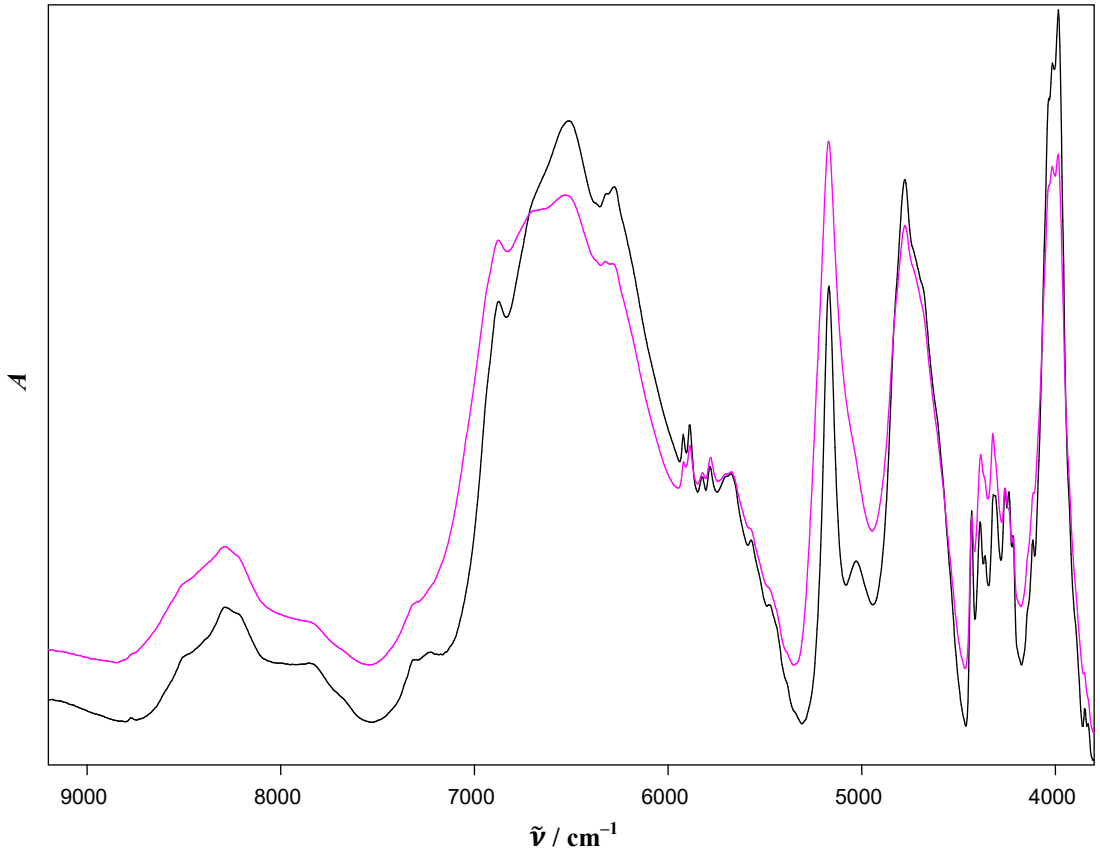
Slika 24. NIR spektri alopurinola, laktoze monohidrata, kukuruznog škroba, mikrokristalične celuloze, umrežene natrij karmeloze, povidona, magnezijevog stearata i talka snimljeni difuznom refleksijom zračenja u rasponu od 12500 do 3600 cm^{-1} uz korekciju bazne linije. Spektri su pomaknuti duž ordinate zbog bolje preglednosti.

Usporedbom NIR spektara smrvljenih tableta formulacije I sa spektrima alopurinola i smjese pomoćnih tvari mogu se u spektru tablete alopurinola sa vrlo visokom sigurnošću razlikovati vrpce koje pripadaju alopurinolu od onih koje pripadaju smjesi pomoćnih tvari (slika 25). Veliki maseni udio alopurinola u formulaciji (55,6% (*m*/*m*)) u kombinaciji s vibracijama veza u prstenima pirazola i pirimidina koji su sastavni dio samo molekule djelatne tvari, čini asignaciju spektra mogućom i bez prethodne matematičke obrade spektara. Kombinacijske vrpce i viši tonovi u području ispod 5000 cm^{-1}, kao i vrpce pri 8927 cm^{-1} i 8808 cm^{-1} potječu od alopurinola. Smjesa pomoćnih tvari čini 44,4% (*m*/*m*) tablete, a glavni sastojak je laktoza monohidrat. Slijede ga kukuruzni škrob, povidon i magnezijev stearat u mnogo manjim količinama. Vrpce u spektru smjese pomoćnih tvari gotovo u cijelosti odgovaraju vrpcama

laktoze monohidrata koje su zbog svog intenziteta prekrile vrpce ostalih pomoćnih tvari (slika 26). Tijekom postupka proizvodnje tableta dodaje se voda koja se kasnije uklanja sušenjem do količine od oko 2% (*m*/*m*). Intenzitet vrpce vode može varirati ovisno o stupnju sušenja granulata tijekom proizvodnje ili količini vode koja se dodatno adsorbira stajanjem i starenjem gotovog proizvoda, te je prisutna u ukupnoj količini od 2–3% (*m*/*m*). Asignacija karakterističnih NIR vrpci pojedinačnih sastojaka, kao i gotovog proizvoda formulacije I navedena je u tablici 4.



Slika 25. NIR spektri tablete, alopurinola i smjese pomoćnih tvari formulacije I u spektralnom području 9200–3800 cm^{-1} nakon korekcije bazne linije. Spektri su pomaknuti duž ordinate zbog bolje preglednosti.

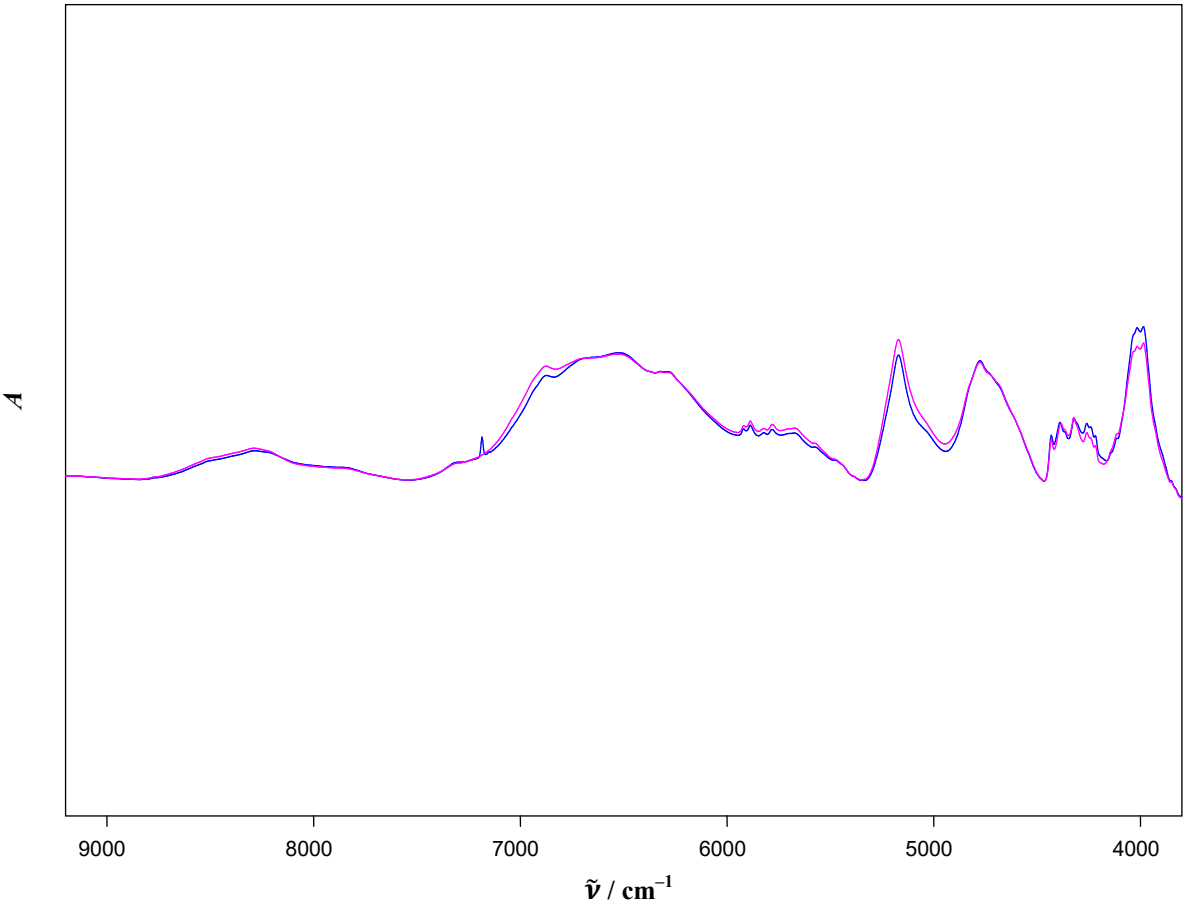


Slika 26. NIR spektri smjese pomoćnih tvari formulacije I (rozo) i laktoze monohidrata (crno) u spektralnom području 9200–3800 cm^{-1} nakon korekcije bazne linije. Spektri su pomaknuti duž ordinate zbog bolje preglednosti.

Tablica 4. Asignacija NIR vrpci tablete formulacije I i pojedinačnih sastojaka formulacije I i II u spektralnom području 9200–5000 cm^{-1}.[134]

Valni broj / cm^{-1}									Vibracija
Tableta	**Alopurinol**	**Laktoza monohidrat**	**Kukuruzni škrob**	**Magnezijev stearat**	**Povidon**	**Celuloza, mikrokristalična**	**Natrij karmeloza, umrežena**	**Talk**	
8927	8926								3ν CH
8808	8807								3ν CH
8290		8287							3ν CH_2
								7185	2ν OH (Mg_3OH)
								7154	2ν OH (Mg_2FeOH)
				7176					2ν_{as} CH_2 + δ CH_2
				7046	7037				2ν_s CH_2 + δ CH_2
	6947								2ν NH
6872		6872							ν_a OH + ν_s OH (H_2O)
			6830			6721	6805		2ν OH
6493		6502							2ν OH
6265		6273							2ν OH
6092	6090								2ν =CH
6060	6060								2ν =CH
				5777	5891				2ν_{as} CH_2
				5667	5770				2ν_s CH_2
		5673	5624				5626		2ν CH_2
				5185	5175		5188		3ν C=O
5170		5169	5173			5178		5243	ν OH + δ OH
	5037								ν NH + δ NH

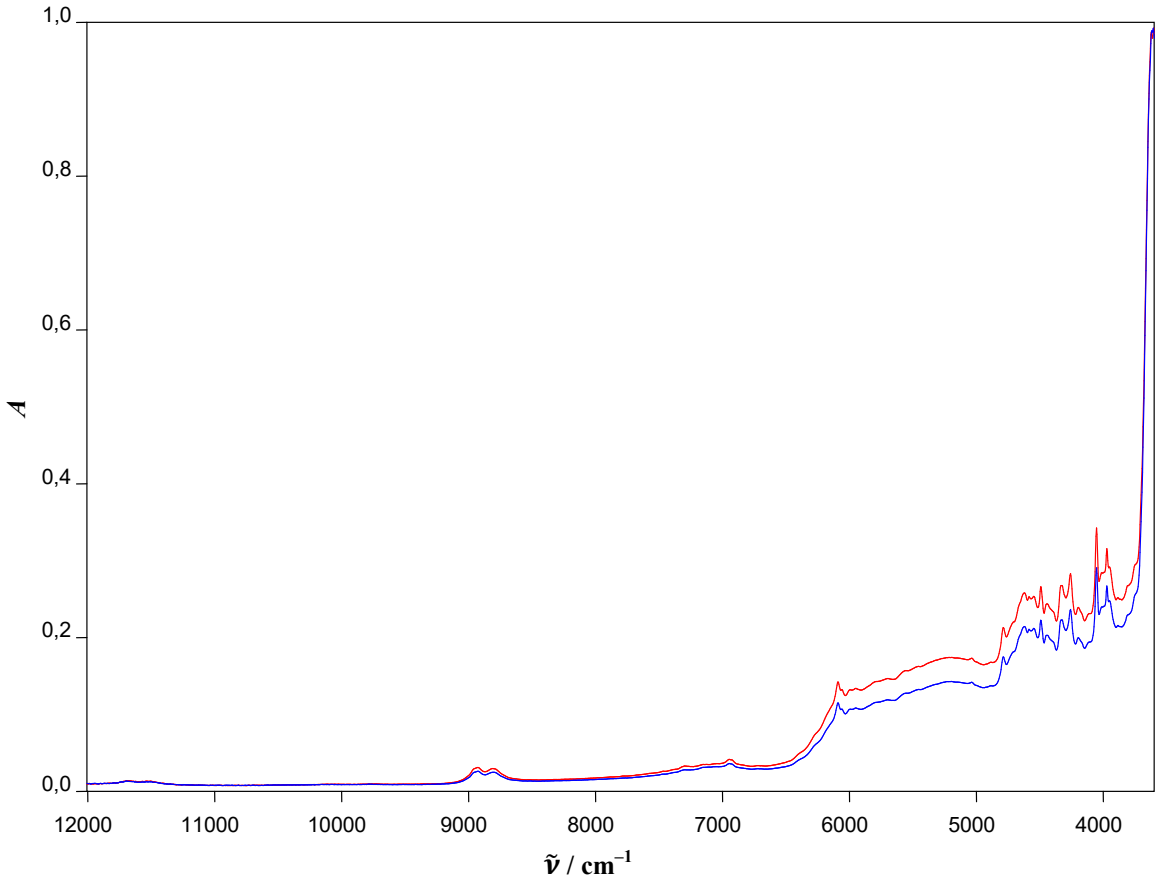
Formulacija II u svom sastavu sadrži još dodatno mikrokristaličnu celulozu, umreženu natrij karmelozu i talk. Na slici 27 prikazani su NIR spektri smjese pomoćnih tvari formulacije I i II. Spektri su gotovo identični u cijelom spektralnom području, osim što se u spektru formulacije II opaža oštra vrpca slabog intenziteta pri 7185 cm^{-1} koja potječe od talka, a pripisuje se prvom višem tonu istezanja skupina O–H. Oblik vrpce posljedica je utjecaja magnezijevog atoma.[80,135]



Slika 27. NIR spektri smjese pomoćnih tvari formulacije I (rozo) i formulacije II (plavo) u spektralnom području 9200–3800 cm^{-1} nakon korekcije bazne linije. Spektri su pomaknuti duž ordinate zbog bolje preglednosti.

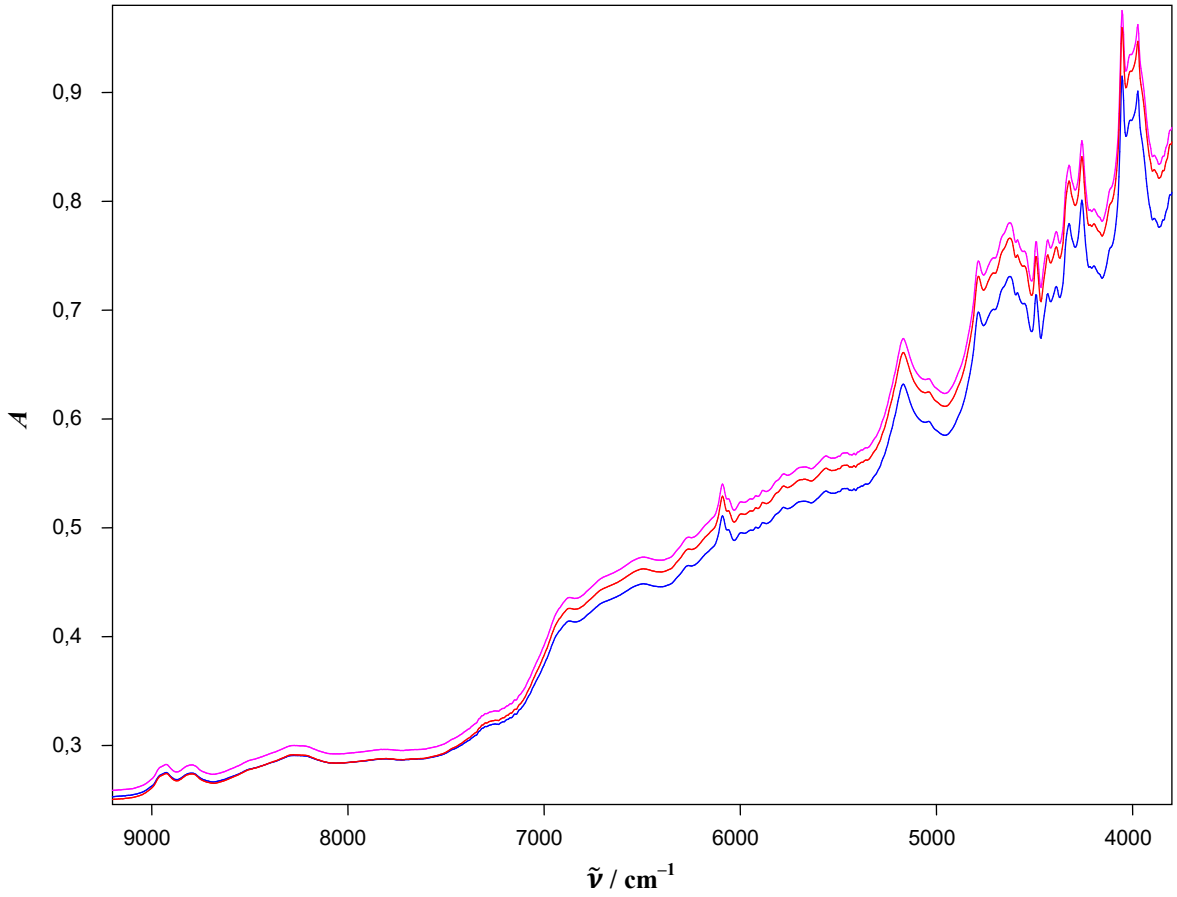
4.3.2. Utjecaj fizikalnih svojstava na izgled NIR spektara

Na profil oslobađanja alopurinola iz tableta, osim formulacije, utječu i fizikalna svojstva, poput veličine čestica djelatne tvari, tvrdoće i oblika tableta, te svojstva ovisna o promjeni kritičnih procesnih parametara. S obzirom da tablete alopurinola pripadaju skupini gotovih proizvoda s vrlo brzim oslobađanjem djelatne tvari, utjecaj navedenih svojstava vrlo je teško pratiti klasičnim načinom analize oslobađanja. Unutar 15 minuta sve tablete, neovisno o dozi, razlici u tvrdoći ili obliku oslobode više od 85% alopurinola i kao takve odgovaraju postavljenom limitu o međusobnoj usporedbi. Vrijednosti oslobađanja u ranijem vremenu uzorkovanja, poput 5. i 10. minute, mogu ukazati na određene informacije o procesu proizvodnje, no dopuštene varijacije u masi i tvrdoći tablete ili provođenje analize može uzrokovati veće razlike između vrijednosti oslobađanja iz uzoraka iste serije pa je ponekad vrlo teško povezati izmjereni postotak oslobođenog alopurinola s fizikalnim promjenama. NIR spektroskopija osjetljivija je na takve promjene, a razlike u uzorcima očituju se u pomaku bazne linije, promjeni intenziteta vibracijskih vrpci ili manjim pomacima apsorpcijskih maksimuma. Na slici 28 prikazani su NIR spektri sirovine alopurinola sitnijih čestica i krupnijih čestica snimljeni difuznom refleksijom zračenja u spektralnom području 12500–3600 cm^{-1}. Vrpce u spektrima oba uzorka identične su oblikom i položajem, dok se spektri razlikuju prema pomaku bazne linije i intenzitetu. Vrpce u spektru alopurinola krupnijih čestica intenzivnije su od vrpci u spektru alopurinola sitnijih čestica, posebice u području između 7700 cm^{-1} i 3800 cm^{-1}. Iako navedeno svojstvo nalazi praktičnu primjenu u kvalifikaciji sirovine alopurinola, vizualnim pregledom NIR spektara tableta nije moguće sa sigurnošću razlikovati koja se od te dvije sirovine nalazi u gotovom proizvodu.



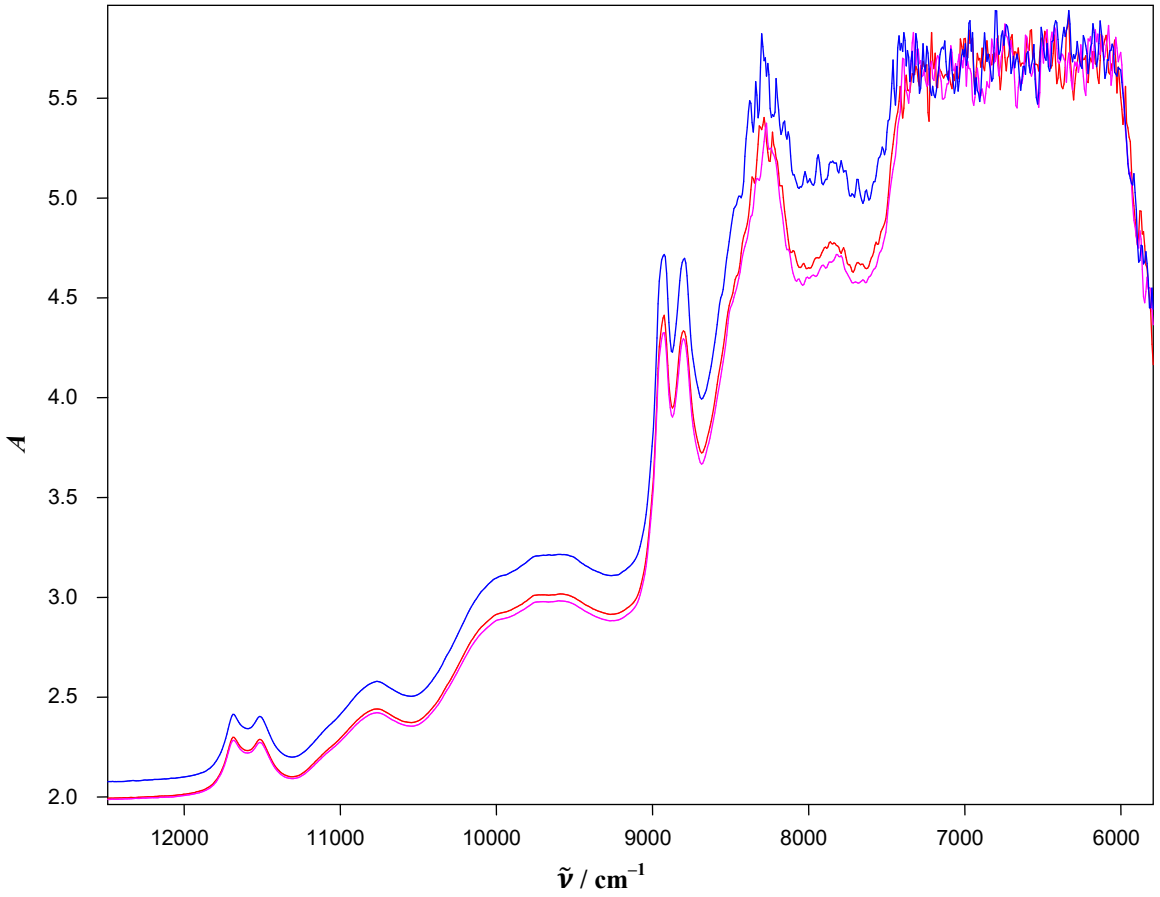
Slika 28. NIR spektri sirovine alopurinola krupnijih čestica (crveno) i sitnijih čestica (plavo) snimljeni difuznom refleksijom zračenja u spektralnom području 12500–3600 cm^{-1}.

Na slici 29 prikazani su NIR spektri tableta alopurinola doze 200 mg (B9, B9N, B9V) snimljeni difuznom refleksijom zračenja u području 9200–3800 cm^{-1}. Tablete su iste formulacije i oblika, a razlikuju se prema tvrdoći. Razlika u tvrdoći očituje se u pomaku bazne linije NIR spektara. Tablete veće tvrdoće imaju veću gustoću pakiranja čestica od kojih su sastavljene i glađu površinu, uslijed čega je difuzna refleksija zračenja manja, a apsorpcija zračenja veća. Najveći pomak bazne linije opažen je u spektrima tableta najveće tvrdoće, B9V (100 N), zatim slijede spektri B9 (82 N) i B9N (54 N). Razlike u položaju bazne linije između uzoraka različite tvrdoće nisu jednake u cijelom spektralnom području, a najizraženije su u području viših valnih duljina, odnosno nižih valnih brojeva, zbog efekta višestruko raspršenog zračenja. Korelacija tvrdoće tableta s izgledom NIR spektara najuočljivija je u području 6150–3800 cm^{-1}.



Slika 29. NIR spektri tableta alopurinola doze 200 mg različite tvrdoće serija B9N (54 N, plavo), B9 (82 N, crveno) i B9V (100 N, rozo) snimljeni difuznom refleksijom zračenja u spektralnom području 9200–3800 cm^{-1}. Svaki prikazani spektar srednja je vrijednost spektara tri tablete iste serije.

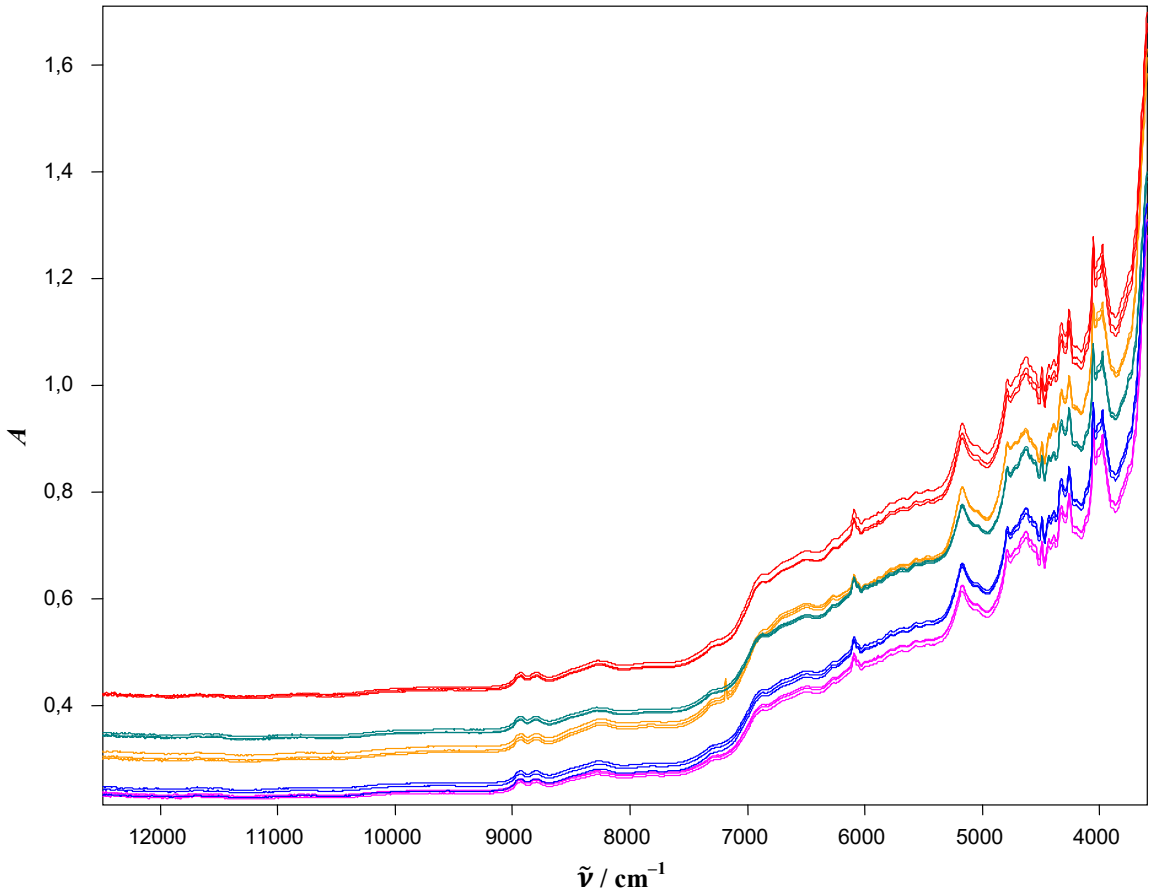
Snimanjem spektara tih istih uzoraka transmisijom zračenja u području 12500–5800 cm^{-1} pomak bazne linije, odnosno intenzitet cjelokupnog spektra, ovisan je o debljini tableta više nego o njihovoj tvrdoći. Tablete serije B9N deblje su za oko 0,1 mm od tableta B9 i B9V. S obzirom da je pri snimanju transmisijskih spektara duljina puta zračenja kroz uzorak određena debljinom tableta, deblju tabletu karakterizira intenzivniji spektar (slika 30).



Slika 30. NIR spektri tableta alopurinola doze 200 mg različite tvrdoće i debljine serija B9N (plavo, 54 N), B9 (crveno, 82 N) i B9V (rozo, 100 N) snimljeni transmisijom zračenja u području 12500–5800 cm^{-1}. Svaki prikazani spektar srednja je vrijednost spektara tri tablete iste serije.

Pri snimanju difuznom refleksijom zračenja na izgled NIR spektara, osim tvrdoće uzoraka, ima utjecaj i površina tableta izložena upadnom zračenju. Na slici 31 prikazani su spektri proizvodnih uzoraka koji se razlikuju prema veličini površine i debljini tablete. Uzorci doze 200 mg serije E1 i D1 imaju isti promjer, ali tablete oznake D1 nešto su jače zakrivljene, samim time imaju manju dodirnu površinu s upadnim zračenjem, što rezultira pomakom bazne linije prema višim vrijednostima apsorbancije. Tablete 100 mg doze manjeg su promjera od tableta veće doze te su bazne linije u njihovim spektrima pomaknute prema višim apsorbancijama i to redom od većeg promjera prema manjem. Tako su spektri uzoraka serije D2S promjera 8,06 mm niže položeni od spektara uzoraka oznake E3 promjera 7,9 mm, dok su najviše pomaknuti spektri tableta oznake D3 promjera 7,0 mm. Izmjerena tvrdoća tableta

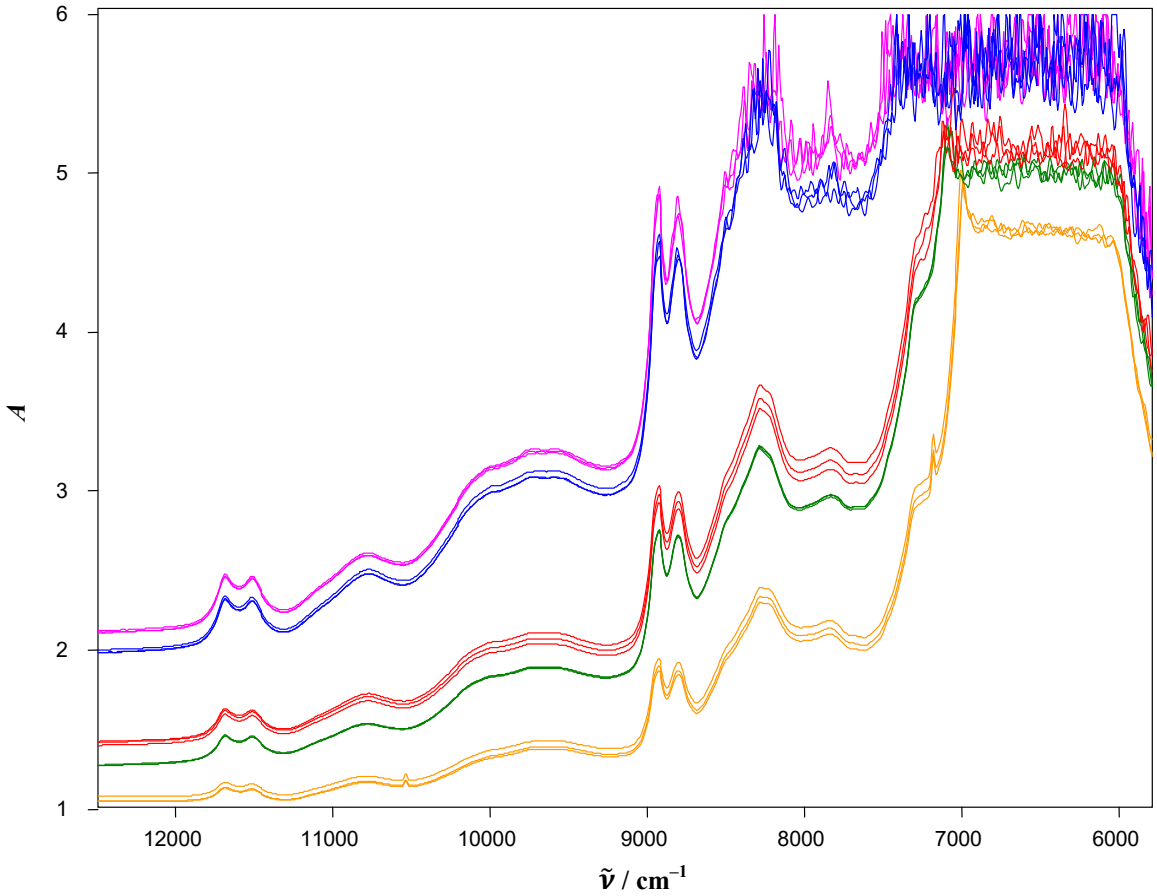
(68–78 N) vrlo je slična za sve uzorke osim za D2S (43 N) koja je niža, što znači da veći utjecaj na izgled NIR spektara ima veličina površine koja je izložena zračenju od tvrdoće.



Slika 31. NIR spektri tableta alopurinola serije D1 (200 mg – plavo, promjera 9,5 mm), D3 (100 mg – crveno, promjera 7,0 mm), E1 (200 mg – rozo, promjera 9,5 mm), E3 (100 mg – zeleno, promjera 7,9 mm), D2S (100 mg – narančasto, promjera 8,06 mm) snimljeni difuznom refleksijom zračenja u području 12500–3600 cm^{-1}.

Duljina optičkog puta, tj. debljina tablete limitirajući je faktor pri snimanju NIR spektara transmisijom zračenja. Spektri debljih tableta postaju neupotrebljivi u području manjih valnih brojeva, jer do detektora ne dolazi dovoljna količina zračenja i signal prelazi u šum. Na slici 32 prikazani su transmisijski NIR spektri istih onih uzoraka čiji su spektri snimljeni difuznom refleksijom prikazani na slici 31. Apsorpcija zračenja za uzorke doze 100 mg povećava se redom od tanjih prema debljim tabletama: D2S (2,7 mm), E3 (3,2 mm) i D3 (3,4 mm). Zatim slijede uzorci doze 200 mg D1 i E1 debljine 4,5–4,6 mm. Pri snimanju difuznom refleksijom zračenja spektar iznad 9200 cm^{-1} postaje neupotrebljiv zbog prevelikog

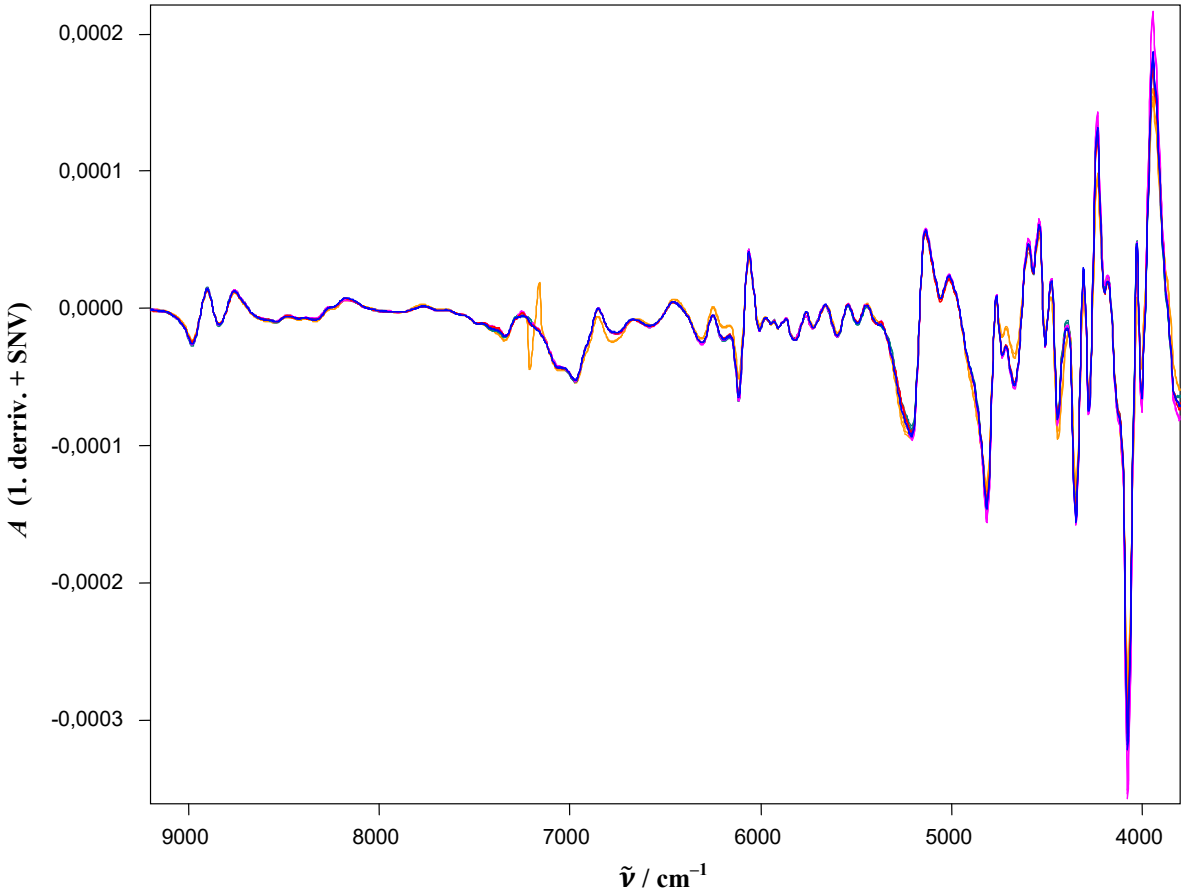
šuma, no zato u transmisijskim spektrima vrpce koje odgovaraju trećim višim tonovima istezanja veza C–H (pri 11684 cm^{-1} i 11517 cm^{-1}) vrlo su intenzivne i taj dio spektra moguće je iskoristiti za kvalitativnu i kvantitativnu analizu djelatne tvari u obje doze. Tablete doze 100 mg imaju za oko 1000 cm^{-1} veće područje upotrebljivog spektra zahvaljujući manjoj debljini.



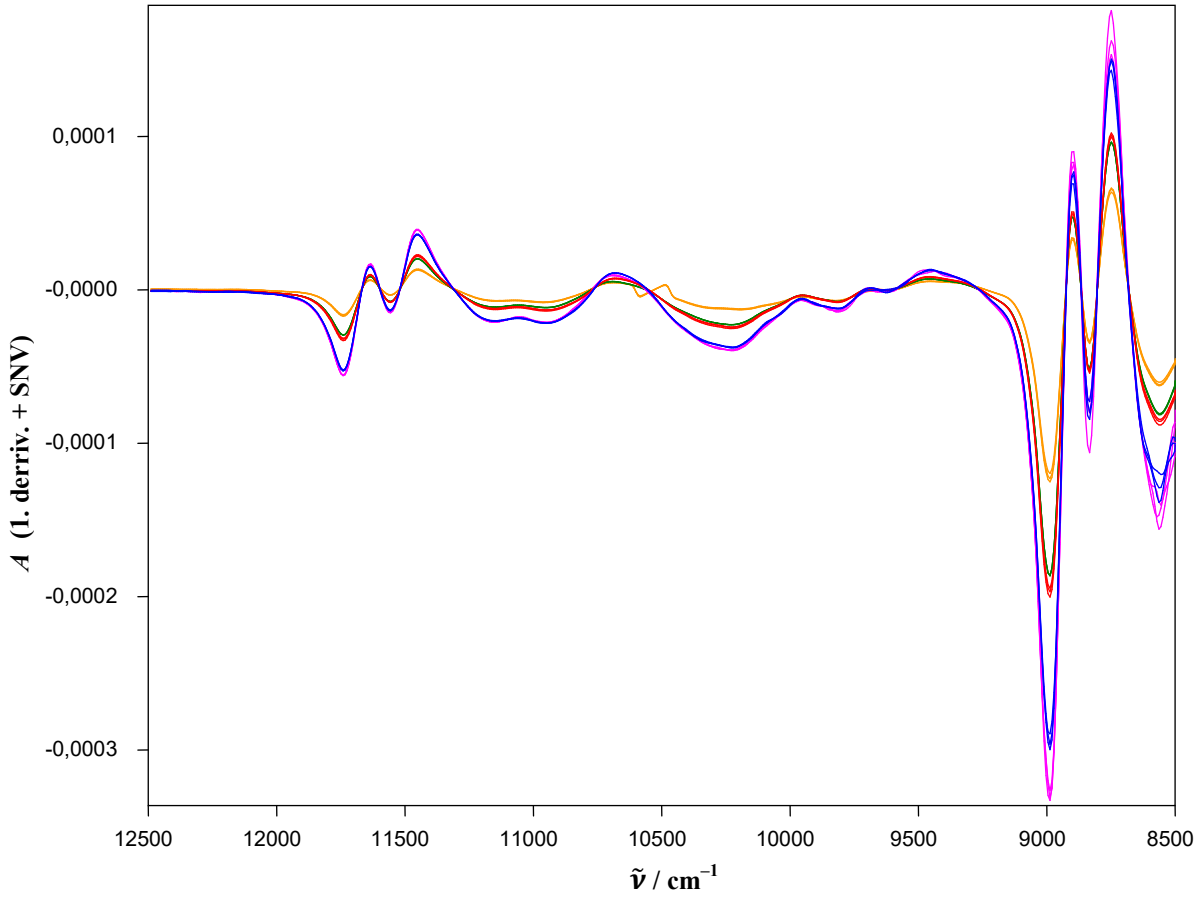
Slika 32. NIR spektri tableta alopurinola serije D1 (200 mg – plavo, debljine 4,5 mm), D3 (100 mg – crveno, debljine 3,4 mm), E1 (200 mg – rozo, debljine 4,6 mm), E3 (100 mg – zeleno, debljine 3,2 mm), D2S (100 mg – narančasto, debljine 2,7 mm) snimljeni transmisijom zračenja u spektralnom području 12500–5800 cm^{-1}.

Razlike u prikazanim spektrima, kao posljedicu različitih fizikalnih svojstava, moguće je ublažiti postupcima matematičke obrade poput normalizacije, glačanja ili derivacije, no ne i u potpunosti ukloniti. U pojedinim spektralnim područjima i refleksijskih i transmisijskih spektara opažene su razlike u intenzitetu i/ili položaju vrpci koje je moguće

analizirati multivarijatnim metodama. Na slikama 33 i 34 prikazani su spektri matematički obrađeni postupcima prve derivacije uz 17 točaka glačanja i normalizacije vektora, u kojima je osim razlika u formulaciji i dozi koje su još dodatno istaknute, moguće zapaziti i već spomenute fizikalne promjene.



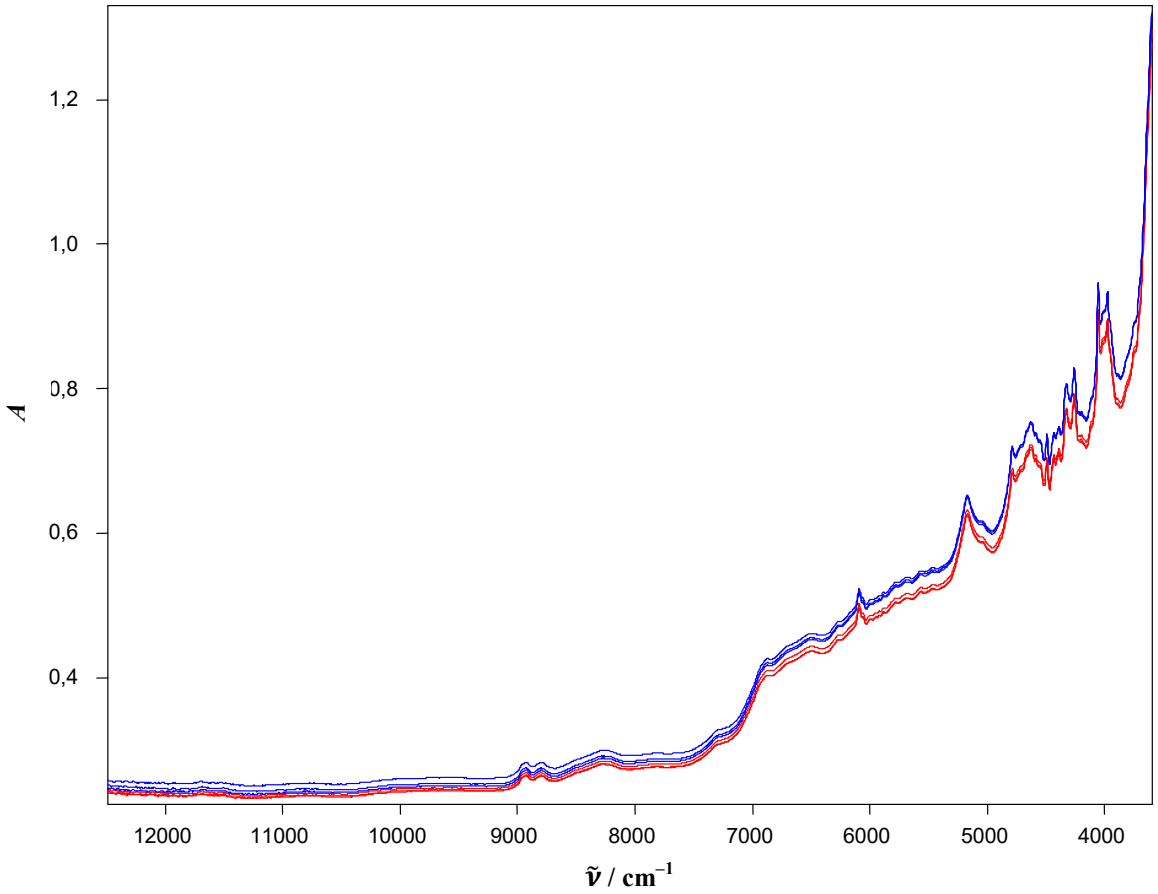
Slika 33. Matematički obrađeni (prva derivacija i normalizacija vektora) NIR spektri tableta alopurinola serije D1 (200 mg – plavo, promjera 9,5 mm), D3 (100 mg – crveno, promjera 7,0 mm), E1 (200 mg – rozo, promjera 9,5 mm), E3 (100 mg – zeleno, promjera 7,9 mm), D2S (100 mg – narančasto, promjera 8,06 mm) snimljeni difuznom refleksijom zračenja u području 12500–3800 cm^{-1}.



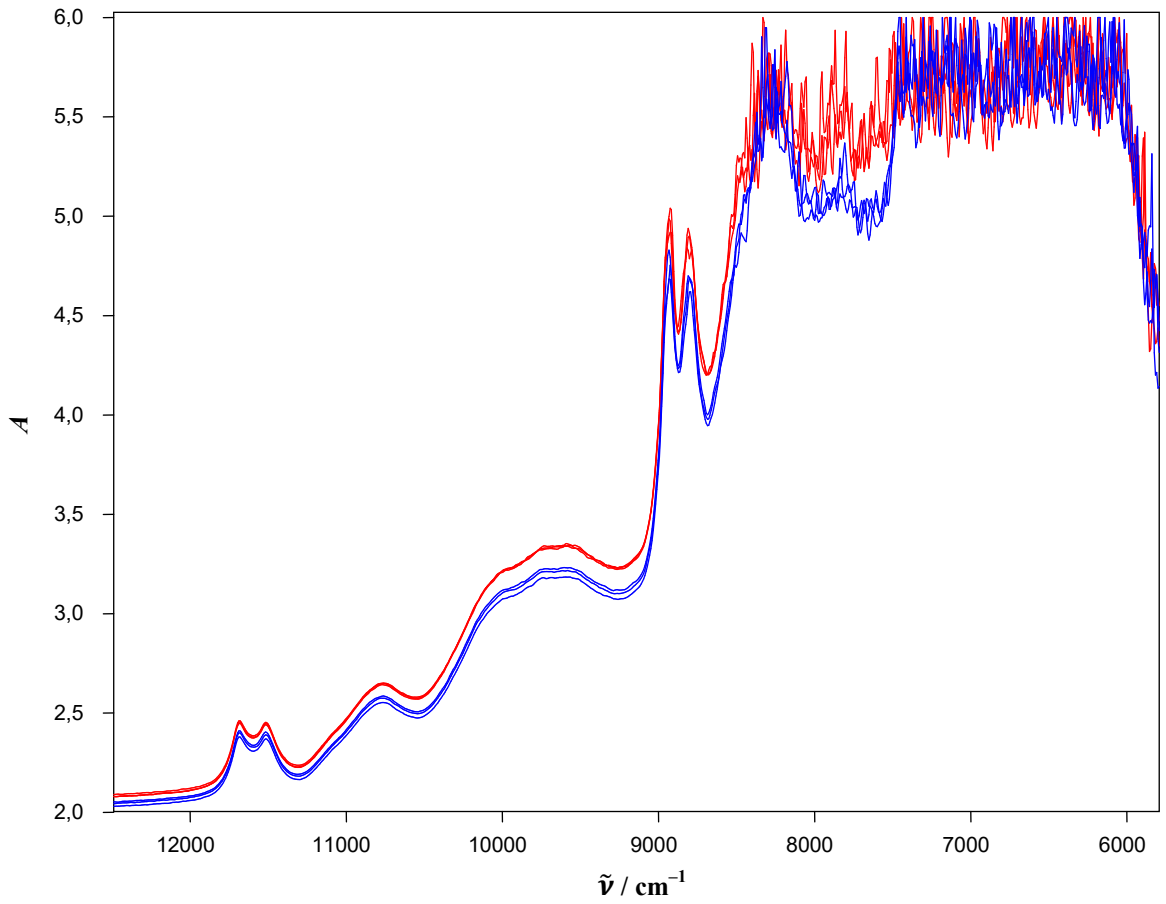
Slika 34. Matematički obrađeni (prva derivacija i normalizacija vektora) NIR spektri tableta alopurinola serije D1 (200 mg – plavo, debljine 4,5 mm), D3 (100 mg – crveno, debljine 3,4 mm), E1 (200 mg – rozo, debljine 4,6 mm), E3 (100 mg – zeleno, debljine 3,2 mm), D2S (100 mg – narančasto, debljine 2,7 mm) snimljeni transmisijom zračenja u spektralnom području 12500–8500 cm^{-1}.

U NIR spektrima tableta alopurinola iste serije, ali skladištene pri različitim uvjetima, također su opažene razlike. Na slikama 35 i 36 prikazani su spektri uzoraka doze 200 mg serije C4 snimljeni difuznom refleksijom, odnosno transmisijom zračenja, skladištenih pri normalnim uvjetima u laboratoriju (20–25 °C) i uzoraka oznake C4ST koji su šest mjeseci bili izloženi povišenoj temperaturi (40±2 °C) i relativnoj vlažnosti (75±5%). Razlika je očita u pomaku bazne linije, koji se može pripisati promjenama tvrdoće i površine tablete u slučaju spektara snimljenih difuznom refleksijom zračenja, odnosno debljine tablete u slučaju transmisijskih spektara. Vizualnim pregledom spektara matematički obrađenih postupcima normalizacije vektora i prve derivacije može se zaključiti da je uzrok spektralnih razlika

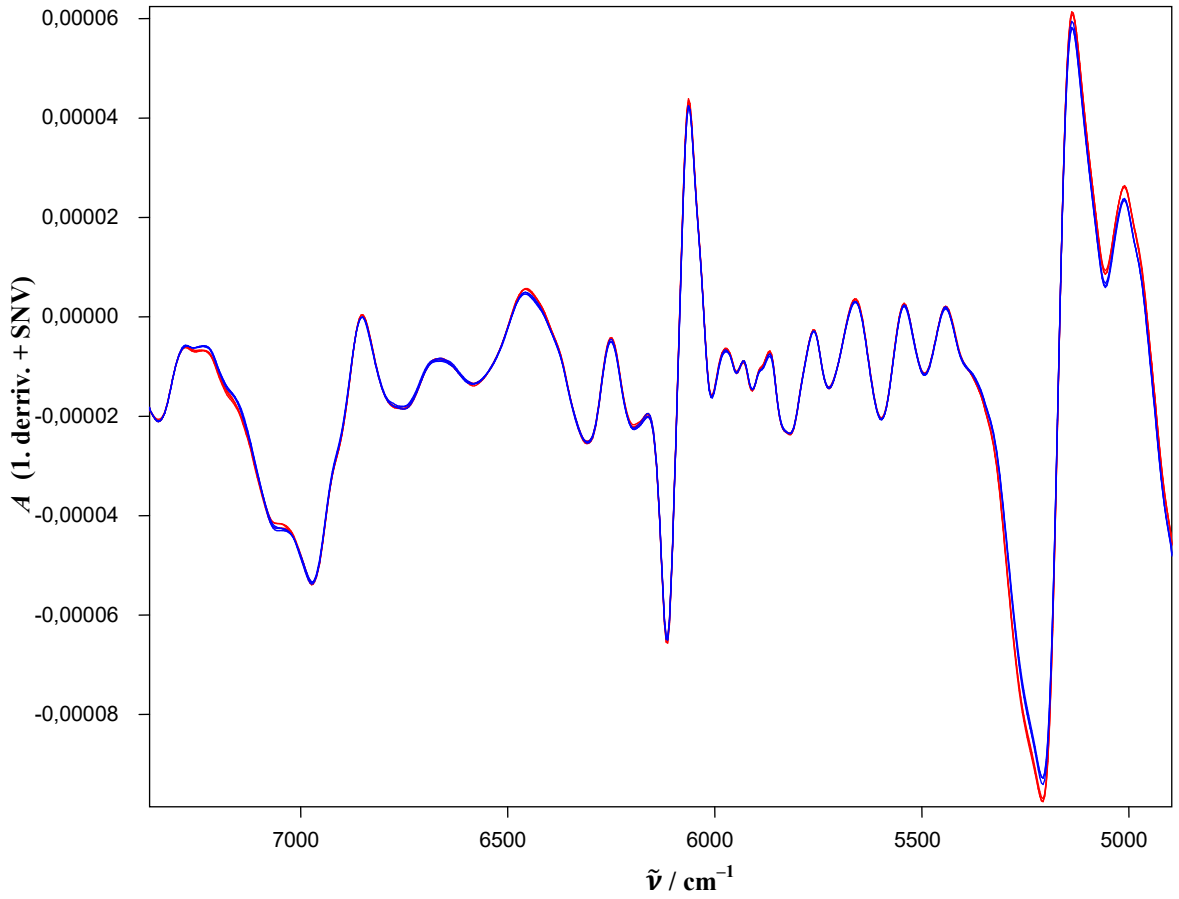
povećana adsorpcija vode u slučaju uzoraka C4ST. Karakteristična vrpca vode pri 5170 cm^{-1} intenzivnija je u spektrima uzoraka izloženih većoj vlažnosti, a opažene su i razlike u spektralnom području koje odgovara smjesi pomoćnih tvari. Alopurinol je stabilan i njegove se vrpce značajnije ne mijenjaju (slike 37 i 38).



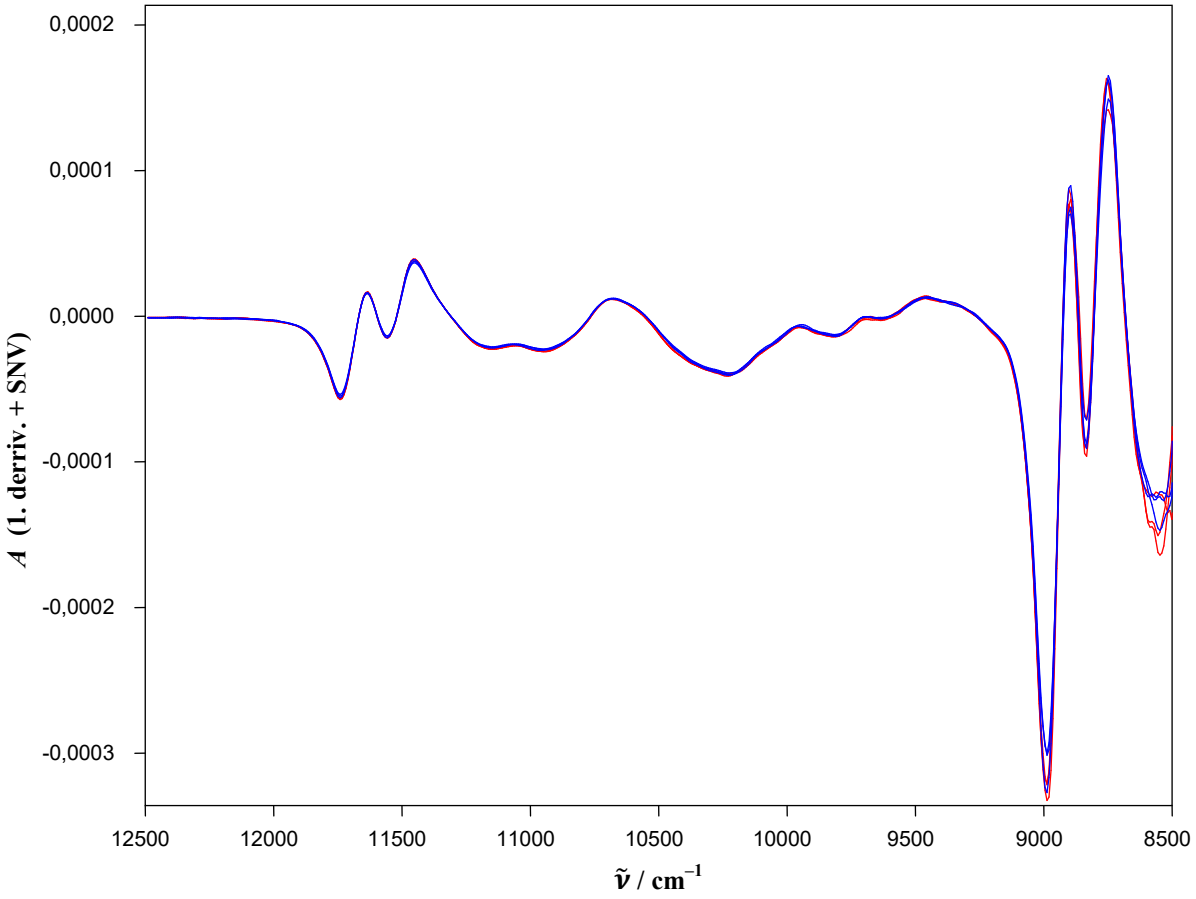
Slika 35. NIR spektri tableta alopurinola doze 200 mg serije C4 (20–25 °C, plavo) i C4ST (40±2 °C i 75±5% RV, crveno) snimljeni difuznom refleksijom zračenja u spektralnom području 12500–3600 cm^{-1}.



Slika 36. NIR spektri tableta alopurinola doze 200 mg serije C4 (20–25 °C, plavo) i C4ST (40±2 °C i 75±5% RV, crveno) snimljeni transmisijom zračenja u spektralnom području 12500–5800 cm^{-1}



Slika 37. Matematički obrađeni (prva derivacija i normalizacija vektora) NIR spektri tableta alopurinola doze 200 mg serije C4 (20–25 °C, plavo) i C4ST (40±2 °C i 75±5% RV, crveno) snimljeni difuznom refleksijom zračenja u spektralnom području 7200–4950 cm^{-1}.



Slika 38. Matematički obrađeni (prva derivacija i normalizacija vektora) NIR spektri tableta alopurinola doze 200 mg serije C4 (20–25 °C, plavo) i C4ST (40±2 °C i 75±5% RV, crveno) snimljeni transmisijom zračenja u spektralnom području 12500–8500 cm^{-1}.

4.3.3. Kvantitativna analiza oslobađanja alopurinola

U izradi kvantitativnog modela namijenjenog predviđanju količine otpuštenog alopurinola iz tableta za obje doze formulacije I korišteni su spektri snimljeni difuznom refleksijom zračenja. Za svako vrijeme uzorkovanja (5., 10., 15., 20., 30. i 45. minuta) razvijen je poseban PLS model. U spektrima snimljenim transmisijom zračenja opažene su vrlo intenzivne vrpce, no vrijednosti apsorbancija prelaze 2,5 u velikom dijelu spektralnog područja uzoraka doze 200 mg (slika 32), tako da transimisijski spektri nisu korišteni za razvoj kalibracijskog modela.

Razvoj metode sastojao se od tri faze. U prvoj fazi odabran je set uzoraka za izradu kalibracijskog modela prema referentnim vrijednostima oslobođenog alopurinola određenima klasičnom metodom za svako vrijeme uzorkovanja, a za vizualni pregled podataka koji proizlaze iz NIR spektara primijenjena je PCA metoda. Drugu fazu činio je razvoj PLS kvantitativnog kalibracijskog modela, a treću fazu testiranje modela na uzorcima završne formulacije I (B, C) te onima izuzetima iz rutinske proizvodnje (D). Multivarijatna analiza podataka provedena je pomoću programa OPUS 7.0 (Quant 2). Ispitana je mogućnost upotrebe NIR spektroskopske metode za sva vremena uzorkovanja, tj. 5., 10., 15., 20., 30. i 45. minutu.

4.3.3.1. Oslobađanje alopurinola u 15. minuti

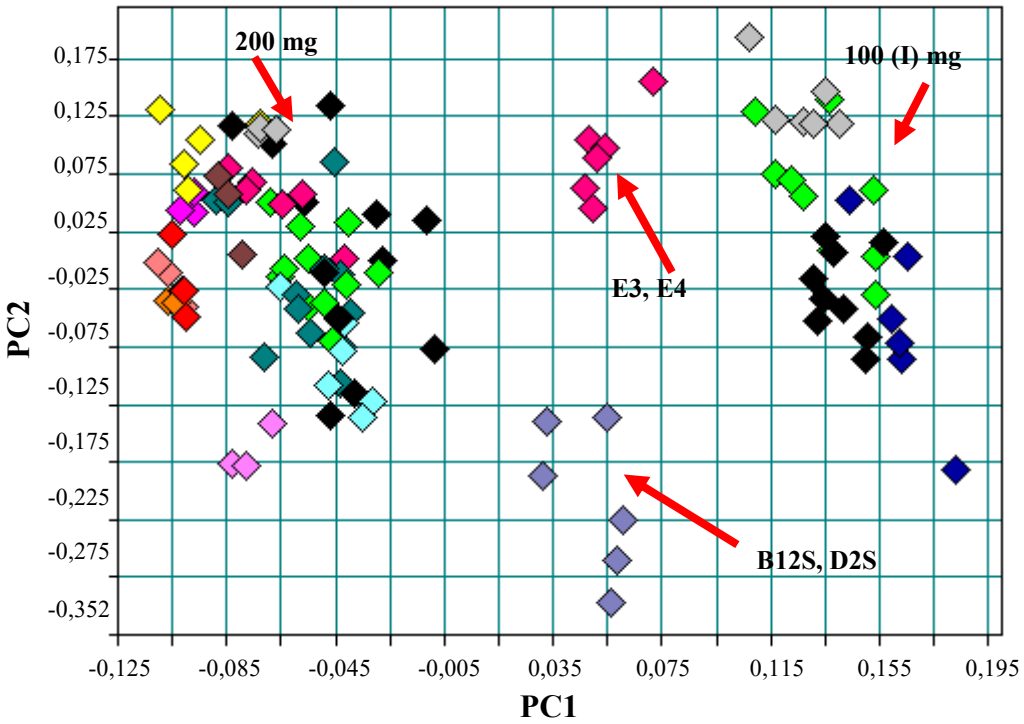
Tablete alopurinola otpuste više od 85% djelatne tvari u 15 minuta pa se navedeno vrijeme uzorkovanja smatra primarnim. Referentne vrijednosti navedene u tablicama u prilogu (tablice P1 i P2) ujednačene su za gotovo sve serije, što znači da su se tablete do tog vremena ravnomjerno raspale i jednoliko otpustile alopurinol. Ujednačenim referentnim vrijednostima smanjuje se unos nepoželjnih varijacija koje potječu iz postupka provođenja analize oslobađanja. U izradi i razvoju PLS modela uključeno je 115 tableta iz sljedećih serija: A1, A2, A4, A5, A6, A8, A10, A12, A18, A19, A21, A22, A23, B9N, B9V, B10, B10V, B11, B11V, B11U, B12S, C1, C3, C5, C5ST, C7, C8, C8ST, C9, C9ST, D2S, D6, E1, E2, E3, E4. Uzorci su odabrani prema rezultatima referentnih vrijednosti otpuštenog alopurinola u 15. minuti uzorkovanja, a izuzeti su iz laboratorijskih probi (A), optimizacijskih (B), pilotskih stabilitetnih (C) te proizvodnih (D, E) serija. Manje promjene u masenim udjelima pomoćnih tvari uvedene su u laboratorijske probe doze 200 mg. U model su uključene one laboratorijske

probe čiji je sastav značajnije utjecao na proces oslobađanja alopurinola. Iako je pomoću laboratorijskih proba postignut dovoljno širok kalibracijski raspon referentnih vrijednosti, dimenzije tableta nisu u skladu s proizvodnim serijama, nisu uvršteni uzorci doze 100 mg, a postupak proizvodnje tableta u laboratoriju nije jednak procesu u rutinskoj proizvodnji. Obzirom da se ispituje mogućnost primjene razvijene NIR metode za određivanje otpuštenog alopurinola iz komercijalnih uzoraka, u model su uključeni uzorci optimizacijskih serija s varijacijama u tvrdoći na obje doze, pilotske stabilitetne serije koje čine 10% količine prave proizvodne serije, kao i uzroci komercijalnih serija. Stabilitetne serije razlikuju se prema proizvođaču i seriji djelatne tvari ugrađene u gotov proizvod, čime se dodatno osigurala robustnost metode, dok uzorci skladišteni pri uvjetima povišene temperature i vlage (40±2°C, 75±5% RV) unose varijabilnosti povezane s količinom prisutne vode. Uzorci doze 100 mg formulacije II oznake B12S i D2S uvedeni su u model zbog nižih vrijednosti oslobođenog alopurinola, što je posljedica većih razlika u sastavu u odnosu na formulaciju I, kao i zbog utjecaja veličine čestica na oslobađanje. Tablete drugog proizvođača (E) uključene su u model zbog nepoznatog kvantitativnog sastava pomoćnih tvari, drugog mjesta proizvodnje te dodatnog naglašavanja razlika u fizikalnim osobinama gotovog proizvoda.

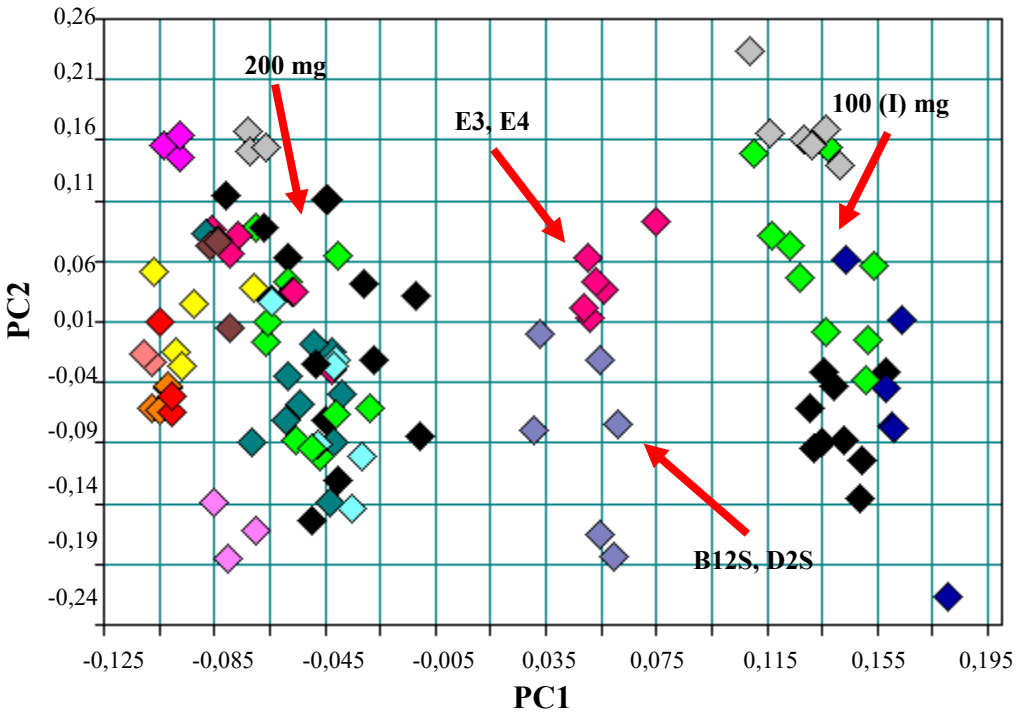
Manje od 85% oslobođenog alopurinola u 15. minuti uzorkovanja određeno je za četiri laboratorijske probe (A2, A4, A5, A19) i tablete formulacije II. Laboratorijska proba A2 sadrži najveću količinu magnezijevog stearata, koji osim što je usporio otpuštanje alopurinola do oko 30%, još je dodatno smanjio već i onako nehomogeni proces oslobađanja djelatne tvari. To potvrđuje RSD vrijednost od 44,4% (n = 6). Tableta, iz koje je oslobođeno 79,2% alopurniola, najviše je pridonijela visokoj relativnoj standardnoj devijaciji pa je izostavljena iz kalibracijskog modela. Proba A4 sadrži 60% više škroba dodanog nakon granulacije, što je uzrokovalo sporije oslobađanja alopurinola (80,2–85,5%), kao i veća koncentracija povidona za 50% za uzorke probe A5 (79,8–83,3%). Niže vrijednosti oslobođenog alopurinola iz uzoraka probe A19 posljedica su dužeg vremena procesa lubrikacije. Uzorcima optimizacijskih serija, koji su se razlikovali samo u tvrdoći, određene su gotovo jednake vrijednosti oslobađanja (B9N i B9V, B10 i B10V, B11 i B11V). Oblik, promjer i debljina tableta, također nisu utjecali na oslobađanje u 15. minuti uzorkovanja. Oslobađanje alopurinola iz stabilitetnih serija nije ovisilo o uvjetima skladištenja (C5 i C5ST, C8 i C8ST, C9 i C9ST). Rezultati proizvodne serije doze 100 mg slični su rezultatima stabilitetnih serija. Tablete oznake E2, E3 i E4 oslobodile su gotovo cjelokupnu količinu alopurinola, kao i

tablete oznake C i D. Odstupanje u vrijednostima nižim za desetak posto uočeno je za seriju E1, najvjerojatnije zbog razlike u fizikalnim osobinama pojedinih sastojaka.

Prije primjene PLS algoritma spektri odabranih uzoraka podvrgnuti su postupku PCA, kako bi se dobio pregled snimljenih spektara, mogući *outlieri*, odabralo spektralno područje i pogodna matematička obrada. Na slici 39 prikazani su bodovi prve i druge glavne komponente u području 9200–3800 cm^{-1} NIR spektara koji nisu matematički obrađeni. Prema tim podacima PC1 opisuje varijabilnosti povezane s izgledom tableta. Tablete doze 200 mg sličnog su izgleda i kao takve čine jednu skupinu odvojenu od 100 mg doze. Uzorci doze 100 mg formulacije I odvojeni su od uzoraka formulacije II, kao i tableta drugog proizvođača. No, uzorci formulacije II i drugog proizvođača odvojeni su tek duž PC2 što znači da je matematička obrada spektara prije primjene PLS modela poželjna, kao i pogodan odabir spektralnog područja značajnog za potrebe kvantitativne analize. Time se smanjuje utjecaj šuma i pogrešaka koje proizlaze iz samog postupka mjerenja kao što je npr. raspršeno zračenje te se olakšava povezivanje traženih osobina uzoraka s NIR signalima. Važno je napomenuti da nije moguće izolirati dio spektra koji potječe samo od djelatne ili pomoćnih tvari, budući da cijeli sustav koji čine formulacija, fizikalni parametri komponenti te proizvodni postupak imaju utjecaj na otpuštanje alopurinola. Usporedbom PCA bodova prve i druge glavne komponente na slikama 39 i 40 može se zaključiti da odabir pogodne matematičke obrade spektara ima veće značenje od spektralnog područja, obzirom da najveća varijanca opisuje izgled tableta u oba slučaja.

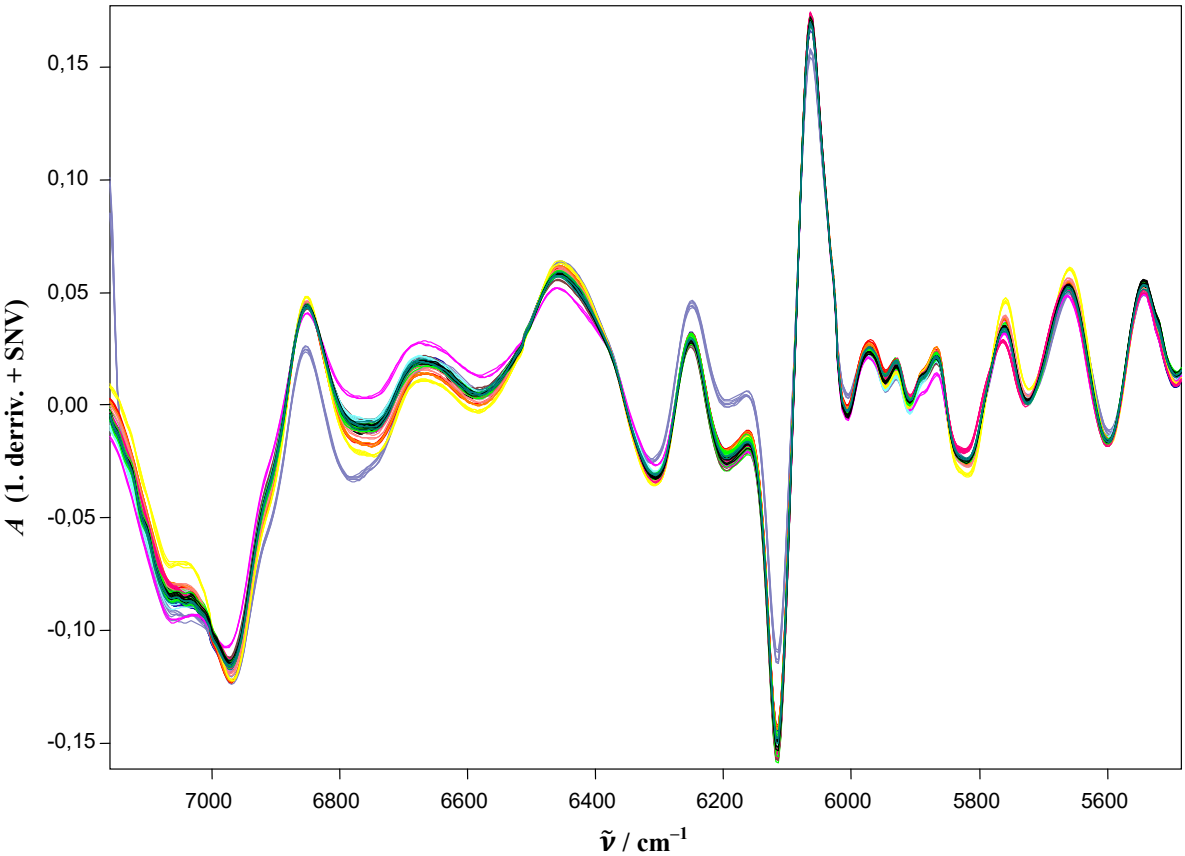


Slika 39. Raspodjela faktorskih bodova PC1 i PC2 matematički neobrađenih NIR spektara u području 9200–3800 cm^{-1}.



Slika 40. Raspodjela faktorskih bodova PC1 i PC2 matematički neobrađenih NIR spektara u području 7158,9–5484,9 cm^{-1}.

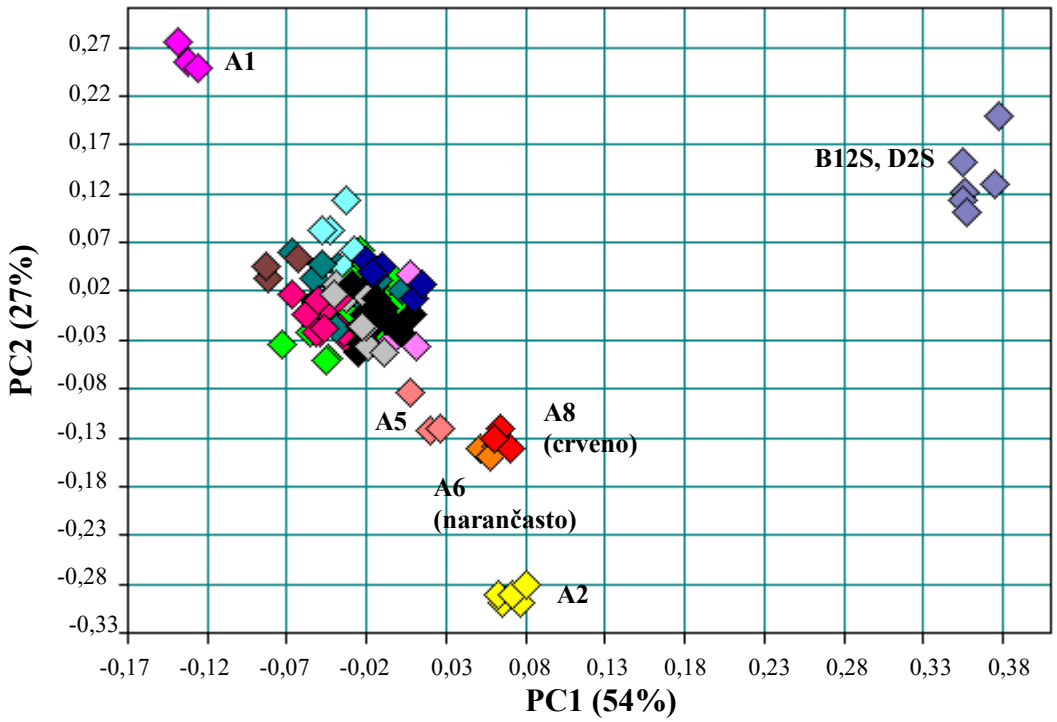
Kako bi se smanjio utjecaj fizikalnih osobina uzoraka na spektar, koje imaju gotovo zanemariv utjecaj na oslobađanje alopurinola, i istovremeno istaknule kemijske informacije pohranjene u vibracijskim vrpcama koje se prekrivaju, snimljeni NIR spektri obrađeni su postupcima prve derivacije, uz 17 točaka glačanja, i SNV (slika 41). Navedena matematička obrada spektara, kao i spektralno područje od 7158,9 cm^{-1} do 5484,9 cm^{-1}, odabrani su za završni kalibracijski kvantitativni model. Prilikom njihovog odabira u obzir je uzeta složenost sustava te različite kemijske i fizikalne osobine uzoraka koje imaju utjecaj na otpuštanje alopurinola.



Slika 41. Matematički obrađeni NIR spektri uzoraka u području 7158,9–5484,9 cm^{-1}, koji su sastavni dio kalibracijskog modela za 15. minutu oslobađanja.

Na slici 42 bodovi PC2 u ovisnosti o PC1 pokazuju razdvojene uzorke ovisno o razlikama u formulaciji, koje se mogu povezati s otpuštanjem alopurinola. Uzorci formulacije II (B12S, D2S) odvojeni su od uzoraka formulacije I. Najveći klaster čine uzorci obiju doza formulacije I s manjim varijacijama u proizvodnom postupku i referentnim vrijednostima

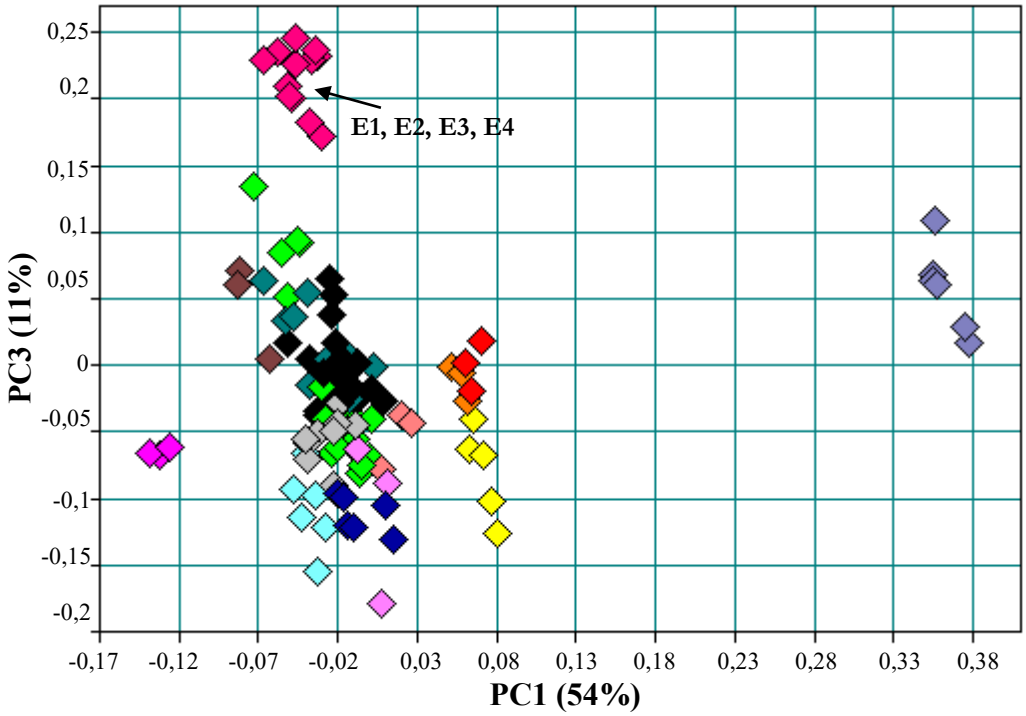
višim od 85%. Promjene u masenim udjelima uzoraka formulacije I vidljive su duž PC2. Uzorci većeg (A5) i manjeg (A8) masenog udjela povidona, veće koncentracije magnezijevog stearata (A2), kao i povidona dodanog u obliku granulacijske otopine (A1) odvojeni su od glavnog klastera. Iako se razlikuju u količini dodanog povidona, uzorci A6 i A8 klasificirani su u istu skupinu, što je posljedica jednakog (manjeg) masenog udjela ukupnog škroba. Uzorci koji se razlikuju u omjeru škroba dodanog tijekom i nakon granulacije (A4, A10, A12) nisu odvojeni od glavnog klastera unatoč dokazanom utjecaju na oslobađanje alopurinola. Također, promjena u masi ukupnog škroba u uzorcima laboratorijske probe A18 (manje od 1% u odnosu na ukupnu masu tablete) nije bila dovoljna za odvajanje od uzoraka završne formulacije. Stoga, iako PCA opisuje dobru korelaciju između razlika u formulaciji i oslobađanja djelatne tvari, primijenila se kao dodatna pomoć u razvoju kvantitativnih regresijskih metoda, a ne kao samostalan postupak.



Slika 42. Raspodjela faktorskih bodova PC1 i PC2 obrađenih NIR spektara (1. derivacija + SNV) u spektralnom području 7158,9–5484,9 cm^{-1}.

Na prisutnost proizvoda drugog proizvođača ukazano je pomoću PC3 (slika 43). Sve četiri serije obiju doza (E1, E2, E3, E4) formirale su poseban klaster. Prema grupiranju uzoraka duž PC1 te odvajanju duž PC3, može se zaključiti da je formulacija drugog

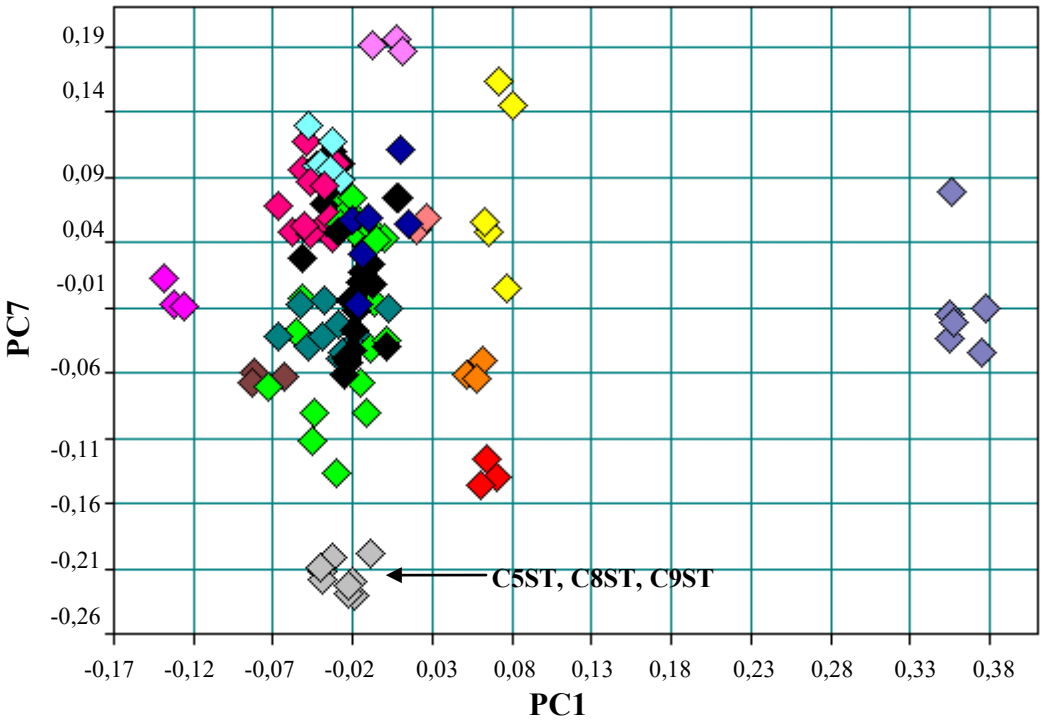
proizvođača vrlo slična Belupovoj završnoj formulaciji s mogućim razlikama u fizikalnim osobinama sastojaka.



Slika 43. Raspodjela faktorskih bodova PC1 i PC3 obrađenih NIR spektara (1. derivacija + SNV) u spektralnom području 7158,9–5484,9 cm^{-1}.

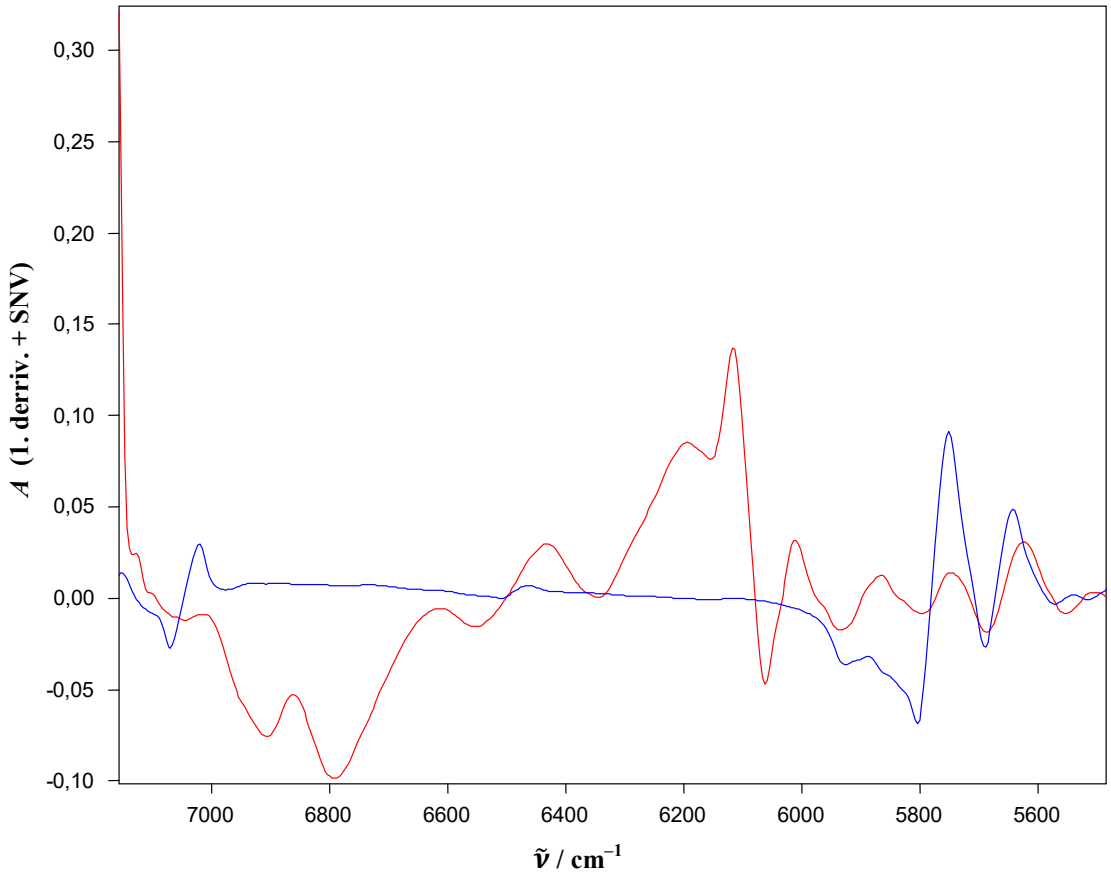
Uzorci skladišteni pri povišenoj temperaturi i vlazi (C5ST, C8ST, C9ST) odvojeni su od ostalih serija duž PC7 (slika 44).

Prva glavna komponenta (PC1) opisala je 54% varijabilnosti u setu uzoraka, PC2: 27%, PC3: 11%, PC4: 2%, PC5: 2%, PC6: 1%, PC7: 1% (navedeni postoci izračunati su u programu Unscrambler X 10.4.1).



Slika 44. Raspodjela faktorskih bodova PC1 i PC7 obrađenih NIR spektara (1. derivacija + SNV) u spektralnom području 7158,9–5484,9 cm^{-1}.

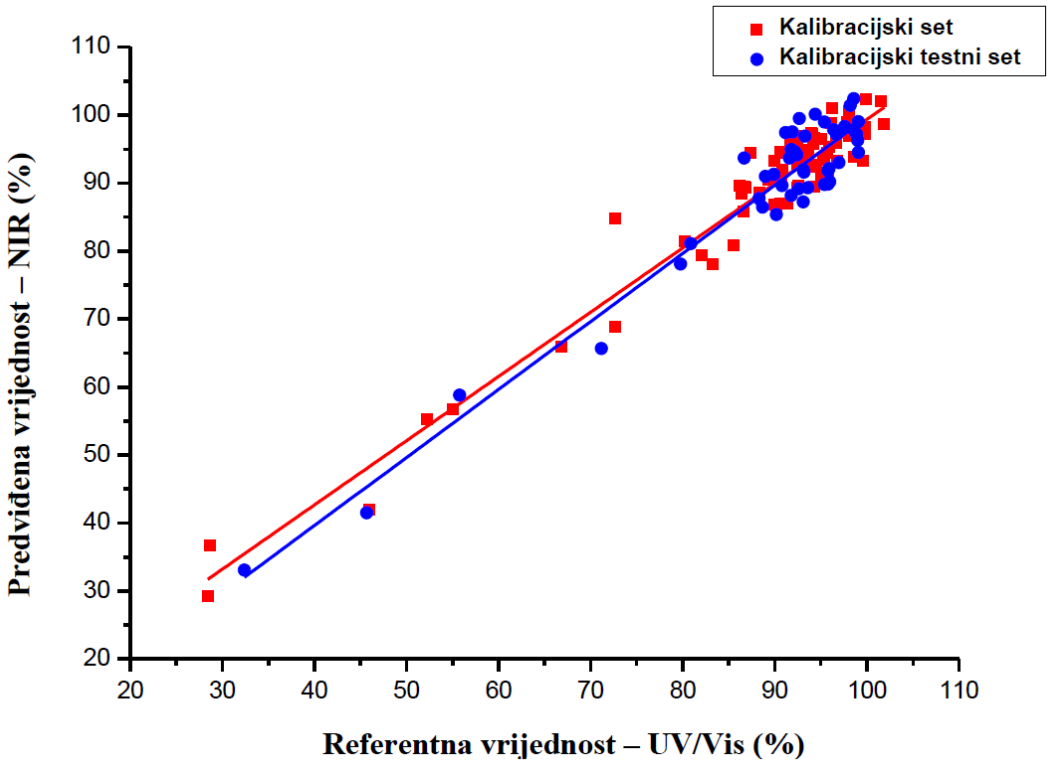
Sve prikazane osobine uzoraka koje nisu kemijske prirode, a opisane su pomoću PCA nije moguće objasniti referentnim vrijednostima otpuštenog alopurinola. Iako prikazi opterećenja (engl. *loading plots*) nisu u mogućnosti opisati i zasebno odvojiti uzorke prema svakoj pojedinom kemijskom i fizikalnom svojstvu, vrpce pri 5749 cm^{-1} i 5624 cm^{-1} opterećenja PC1 mogu se pripisati magnezijevom stearatu (slika 45), što potvrđuje značajan utjecaj te pomoćne tvari na otpuštanje alopurinola unatoč niskom masenom udjelu u odnosu na druge sastojke. Navedenim pristupom, potrebne informacije o stanju proizvoda tijekom faza njegovog razvoja dobivaju se vrlo brzo, bez potrebe provođenja analize oslobađanja na svakoj probi. Time se skraćuje vrijeme i troškovi razvoja proizvoda, te omogućuje pravovremena reakcija na moguće poteškoće.



Slika 45. Opterećenje za PC1 (crveno) i obrađeni spektar magnezijevog stearata (plavo).

Za razvoj, unutarnju validaciju i optimiranje kalibracijskog modela namijenjenog predviđanju otpuštanja alopurinola korištena je regresijska tehnika PLS. Odabrani uzorci iz 33 različite serije osigurali su cjelokupni raspon mogućih varijabilnosti u formulaciji, proizvođačima djelatne tvari, proizvodnom postupku i uvjetima skladištenja. Ukupno 115 tableta podijeljeno je u dva seta. Kalibracijski set sastojao se od 70 tableta, a kalibracijski testni set (za unutranju validacija) od preostalih 45 tableta. Završni kalibracijski model baziran je prema podacima iz PCA, a uključuje kombinaciju postupaka *mean centering*, prve derivacije (17 točaka glačanja) i SNV u spektralnom području 7158,9–5484,9 cm^{-1}. Navedenom matematičkom obradom spektara utjecaj fizikalnih osobina tableta na spektar većinom je uklonjen, a svojstva koja imaju utjecaj na otpuštanje alopurinola su zadržane. Model je uključivao osam latentnih varijabli što je rezultiralo RPD vrijednošću višom od 3 te RMSEP, koeficijentom korelacije, pristranosti predviđanja i nagibom od 3,75%, 0,9632, 0,328% i 1,001. Broj latentnih varijabli odabran je prema najnižim vrijednostima srednje

kvadratne pogreške te brojnim kemijskim i fizikalnim osobinama uključenim u model. U tablici 9 sumirani su statistički podaci o modelu, a na slici 46 prikazana je korelacija između vrijednosti oslobođenog alopurinola iz tableta predviđenih NIR spektroskopijom i referentnih vrijednosti izmjerenih klasičnom metodom uz UV/Vis spektrofotometriju. Koeficijenti korelacije kalibracije i unutarnje validacije modela vrlo su bliski vrijednosti jedan, unatoč istraživanom parametru i činjenici da referentne vrijednosti nisu jednoliko raspoređne u cijelom kalibracijskom području. Širi raspon se nije mogao postići bez veće intervencije u sastav, a posljedično tome i u proizvodni postupak. Takvi uzorci nisu proizvedeni jer bi uvođenje dodatnih varijabli učinilo model još kompleksnijim, bez sigurnosti zadovoljavajućeg predviđanja rezultata iz serija rutinske proizvodnje.



Slika 46. Ovisnost predviđenih vrijednosti o referentnim vrijednostima oslobođenog alopurinola iz tableta kalibracijskog seta i kalibracijskog testnog seta (unutarnja validacija) za 15. minutu oslobađanja.

Tablica 9. Statistički parametri završnog kalibracijskog modela za 15. minutu oslobađanja.

Parametar	**Vrijednost**
Spektralno područje (cm^{-1})	7158,9–5484,9
Matematička obrada spektara	1. derivacija (17 točaka glačanja) + SNV
Broj PLS varijabli	8
Kalibracijski set	
Broj uzoraka	70
Raspon ref. vrijednosti (%)	28,4–101,9
% objašnjene varijance	94,51
RMSEE (%)	3,68
RPD	4,27
Koeficijent korelacije	0,9722
Odsječak	4,850
Nagib	0,945
Kalibracijski testni set (unutarnja validacija)	
Broj uzoraka	45
Raspon ref. vrijednosti (%)	32,4–99,1
% objašnjene varijance	92,13
RMSEP (%)	3,75
RPD	3,58
Koeficijent korelacije	0,9632
Odsječak	–0,426
Nagib	1,001
Pristranost predviđanja (%)	0,328

U tablici 10. prikazane su statistički parametri različitih kalibracijskih modela ovisno o cjelokupnom spektralnom području i različitim matematičkim obradama spektara. Iz podataka je vidljivo da je upravo odabrano spektralno područje 7158,9–5484,9 cm^{-1}, kao i prva derivacija u kombinaciji sa SNV najpogodniji.

Tablica 10. Statistički parametri kalibracijskih modela ovisno o analiziranom spektralnom području i matematičkoj obradi spektara.

Matematička obrada	**Spektralno područje / cm^{-1}**	**Broj PLS varijabli**	**RMSEE / %**	**RMSEP / %**	**Koeficijent korelacije (testni set)**	**RPD (testni set)**
Nema	9200–3800	7	5,45	5,48	0,9232	2,56
Nema	7158,9–5484,9	8	4,90	5,17	0,9347	2,69
SNV	7158,9–5484,9	7	4,63	4,69	0,9435	2,91
MSC	7158,9–5484,9	9	3,92	4,69	0,9442	2,92
1. derivacija	7158,9–5484,9	7	4,39	4,80	0,9417	2,84
2. derivacija	7158,9–5484,9	5	5,51	5,93	0,9061	2,35
1. derivacija + MSC	7158,9–5484,9	6	4,58	4,49	0,9469	2,99
1. derivacija + SNV	9200–3800	7	4,39	4,68	0,9417	2,88
Straight line subtraction	7158,9–5484,9	6	5,37	5,25	0,9303	2,64

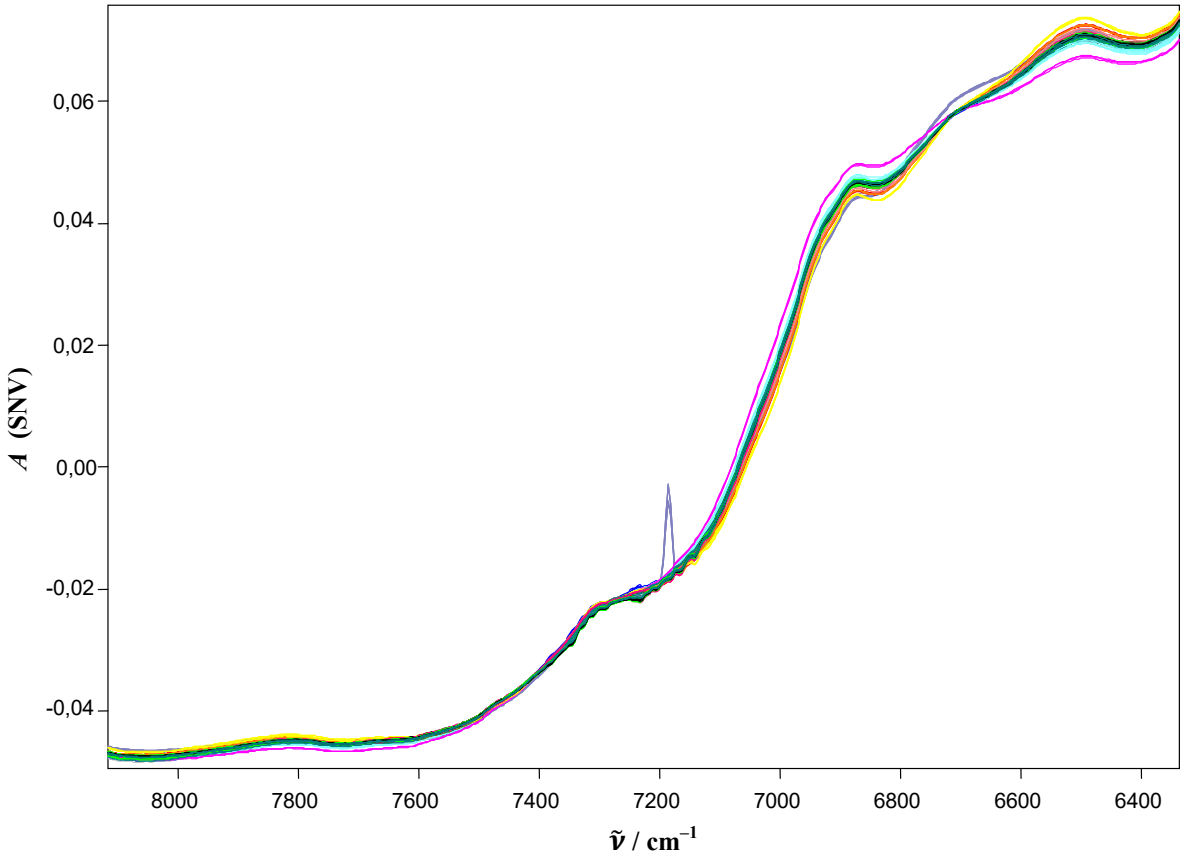
Razvijeni PLS model provjeren je na neovisnom setu uzoraka od 36 tableta iz 11 različitih serija obiju doza formulacije I (tablica 11). Set je sadržavao uzorke optimizacijskih i pilotskih te komercijalnih serija, uključujući i uzorke skladištene pri različitim uvjetima (C4, C4ST). Referentne vrijednosti oslobođenog alopurinola iznosile su između 90,0% i 100,8%, a predviđene NIR vrijednosti razlikovale su se od 0,0 do 6,6%. Veće razlike između metoda zabilježene su za serije B8 i D1. Dok za B8 uzrok većeg odstupanja na jednoj tableti može biti u provođenju analize oslobađanja referentnom metodom, za D1 se može objasniti izostankom uvrštavanja komercijalne serije 200 mg doze u model. Zadovoljavajući rezultati dodatno su potvrđeni *F*-testom ($\alpha = 0,05$) i uparenim *t*-testom ($\alpha = 0,05$). Razlike u rezultatima između dviju metoda ne smatraju se značajnim: $F = 1,26 < F_{krit} = 1,76$; $t_{eksp} = 0,44 < t_{krit} = 1,69$.

Tablica 11. Vrijednosti oslobođenog alopurinola u 15. minuti određene referentnom UV/Vis spektrofotometrijskom metodom i predloženom NIR spektroskopskom metodom.

Serija / doza	Uzorak	Referentna vrijednost / %	Predviđena vrijednost / %	Razlika / %
B4 / 200 mg	1	97,0	94,7	2,3
	2	96,5	94,9	1,6
	3	92,9	92,6	0,3
B5 / 200 mg	1	96,2	96,4	–0,2
	2	96,6	96,4	0,2
	3	97,1	96,1	1,0
B6 / 200 mg	1	93,3	98,3	–5,0
	2	96,0	95,4	0,6
	3	96,7	96,9	–0,2
B7 / 200 mg	1	96,3	94,0	2,3
	2	95,9	96,3	–0,4
	3	96,5	99,5	–3,0
B8 / 200 mg	1	90,5	96,6	–6,1
	2	93,2	96,7	–3,5
	3	92,6	96,4	–3,8
B9P / 200 mg	1	92,4	91,1	1,3
	2	94,8	92,6	2,2
	3	90,0	89,7	0,3
C4 / 200 mg	1	94,0	90,8	3,2
	2	93,7	93,4	0,3
	3	94,1	94,4	–0,3
C4ST / 200 mg	1	93,5	90,6	2,9
	2	94,0	93,2	0,8
	3	95,4	92,1	3,3
D1 / 200 mg	1	92,6	97,8	–5,2
	2	97,4	96,8	0,6
	3	93,0	99,6	–6,6
D3 / 100 mg	1	96,5	94,9	1,6
	2	98,4	95,5	2,9
	3	100,8	96,2	4,6
D4 / 100 mg	1	96,2	96,2	0,0
	2	98,0	101,3	–3,3
	3	99,1	99,1	0,0
D5 / 100 mg	1	92,1	93,4	–1,3
	2	95,8	97,5	–1,7
	3	96,9	95,9	1,0

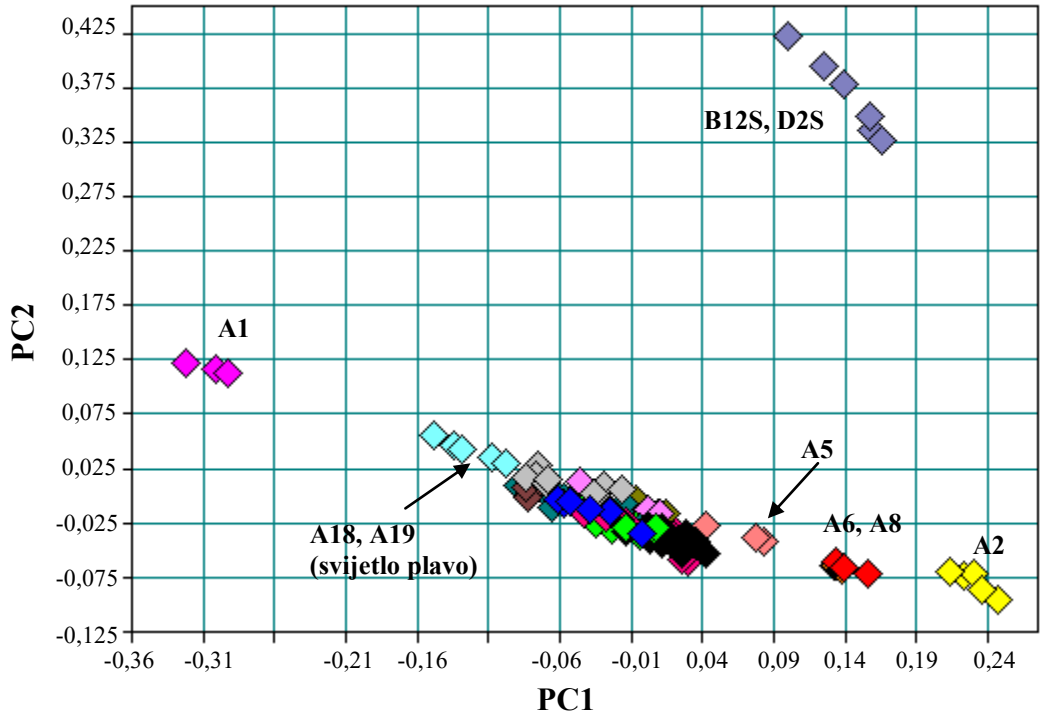
4.3.3.2. Oslobađanje alopurinola u 20. minuti

U izradi i razvoju PLS modela za 20. minutu uzorkovanja uključeno je 119 tableta iz sljedećih serija: A1, A2, A3, A4, A5, A6, A8, A10, A12, A18, A19, A21, A22, A23, B9N, B9V, B10, B10V, B11, B11V, B11U, B12S, C1, C3, C5, C5ST, C7, C8, C8ST, C9, C9ST, D2S, D6, E1, E2, E3, E4. U odnosu na prethodno vrijeme uzorkovanja uključena je laboratorijska proba A3, koja je sadržavala 15% manje ukupnog škroba i 50% više povidona. Manje od 85% oslobođenog alopurinola zabilježeno je jedino za tablete formulacije II i laboratorijske probe A2, a rezultati unutar pojedine serije ujednačeniji su nego pri nižim vremenima uzorkovanja (tablice P1 i P2). Spektralno područje 8115,5–6337,3 cm^{-1} nakon obrade postupcima SNV i *mean centering* odabrano je za završni kvantitativni model (slika 47). Oštra vrpca pri 7185 cm^{-1}, koja odgovara talku, razlikuje spektre formulacije II od formulacije I.

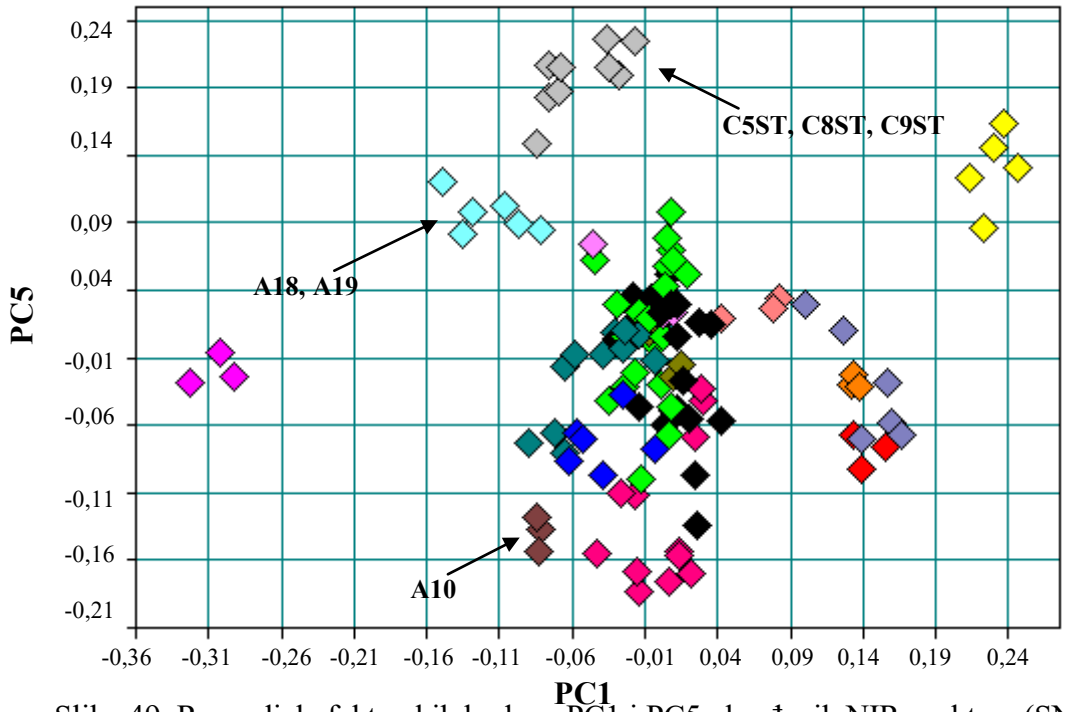


Slika 47. Matematički obrađeni NIR spektri uzoraka u području 8115,5–6337,3 cm^{-1}, koji su sastavni dio kalibracijskog modela za 20. minutu oslobađanja.

Prema dobivenim podacima iz PCA vidljivo je da je još uvijek moguće NIR spektre korelirati s referentnim vrijednostima (slika 48). Postoci oslobađanja, iako viši nego u 15. minuti oslobađanja, zadržali su korelacije s PC bodovima ovisno o količini prisutnog škroba i povidona (A4, A5, A6, A8), kao i magnezijevog stearata (A2). Vrijeme lubrikacije više nije kritični faktor koji značajno utječe na otpuštanje djelatne tvari, što se može zaključiti prema vrlo sličnim rezultatima proba A18 (94,1–96,2%) i A19 (90,0–97,6%). Prema prikazanoj ovisnosti bodova PC2 i PC1 (slika 48), prva glavna komponenta odvojila je uzorke većih i manjih razlika u formulaciji (B12S i D2S, A1, A2, A5, A6 i A8). Laboratorijska proba A3, iako izmijenjenog sastava, nije odvojena od glavnog klastera, dok su probe A18 i A19 smještene uz sam njegov rub. Bodovi koji odgovaraju tabletama A6 i A8 potpuno su preklopljeni. Duž PC5 odvojena je proba A10 od glavnog klastera kao i A18, A19 te uzorci oznake ST, no uzorci A5, A6 i A8 grupirani su s uzorcima B12S i D2S (slika 49).



Slika 48. Raspodjela faktorskih bodova PC1 i PC2 obrađenih NIR spektara (SNV) u spektralnom području 8115,5–6337,3 cm^{-1}.

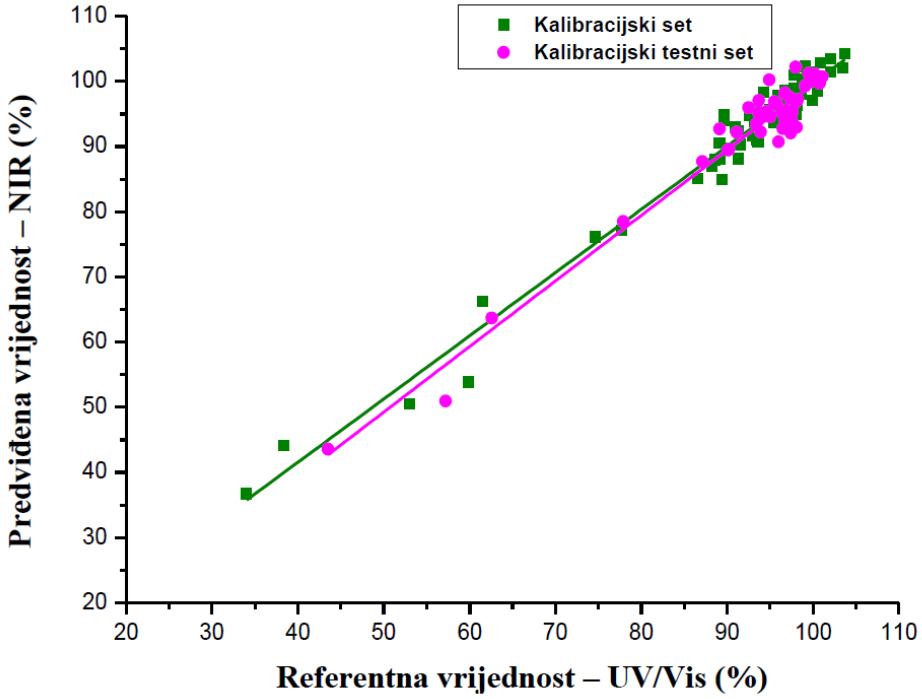


Slika 49. Raspodjela faktorskih bodova PC1 i PC5 obrađenih NIR spektara (SNV) u spektralnom području 8115,5–6337,3 cm^{-1}.

Završni PLS model uključivao je 9 latentnih varijabli, višu RPD vrijednost i niže srednje kvadratne pogreške nego model za 15. minutu uzorkovanja (tablica 12), kao i manju ujednačenost raspodjele referentnih vrijednosti u cijelom kalibracijskom području (slika 50).

Tablica 12. Statistički parametri završnog kalibracijskog modela za 20. minutu oslobađanja.

Parametar	**Vrijednost**
Spektralno područje (cm^{-1})	8155,5–6337,3
Matematička obrada spektara	SNV
Broj PLS varijabli	9
Kalibracijski set	
Broj uzoraka	74
Raspon ref. vrijednosti (%)	34,0–103,7
% objašnjene varijance	97,0
RMSEE (%)	2,39
RPD	5,77
Koeficijent korelacije	0,9849
Odsječak	2,764
Nagib	0,970
Kalibracijski testni set (unutarnja validacija)	
Broj uzoraka	45
Raspon ref. vrijednosti (%)	43,5–101,1
% objašnjene varijance	94,59
RMSEP (%)	2,62
RPD	4,37
Koeficijent korelacije	0,9751
Odsječak	–1,067
Nagib	1,006
Pristranost predviđanja (%)	0,473



Slika 50. Ovisnost predviđenih vrijednosti o referentnim vrijednostima oslobođenog alopurinola iz tableta kalibracijskog seta i kalibracijskog testnog seta (unutarnja validacija) za 20. minutu oslobađanja.

Razvijeni PLS model provjeren je na istom neovisnom setu uzoraka od 36 tableta iz 11 različitih serija, kao i u slučaju provjere modela za 15. minutu uzorkovanja (tablica 13). Referentne vrijednosti oslobođenog alopurinola iznosile su između 93,2% i 101,9%, a predviđene NIR vrijednosti razlikovale su se od 0,1 do 5,2%. Veće razlike između metoda zabilježene su za uzorke serija B8 i D1 (4,0–5,2%) doze 200 mg, dok je za ostale serije ta razlika znatno niža. *F*-testom ($\alpha = 0,05$) potvrđene su razlike u varijancama ($F = 1,78 > F_{krit} = 1,76$). Prema uparenom *t*-testu ($\alpha = 0,05$) razlike u rezultatima između dviju metoda ne smatraju se značajnim: $t_{eksp} = 1,58 < t_{krit} = 1,69$. Na temelju referentnih i predviđenih rezultata za svaku tabletu zasebno i činjenice da je najveća razlika u cijelom testiranom setu 5,2%, kalibracijski model može se smatrati točnim i pouzdanim za određivanje masenog udjela otpuštenog alopurinola u 20. minuti oslobađanja.

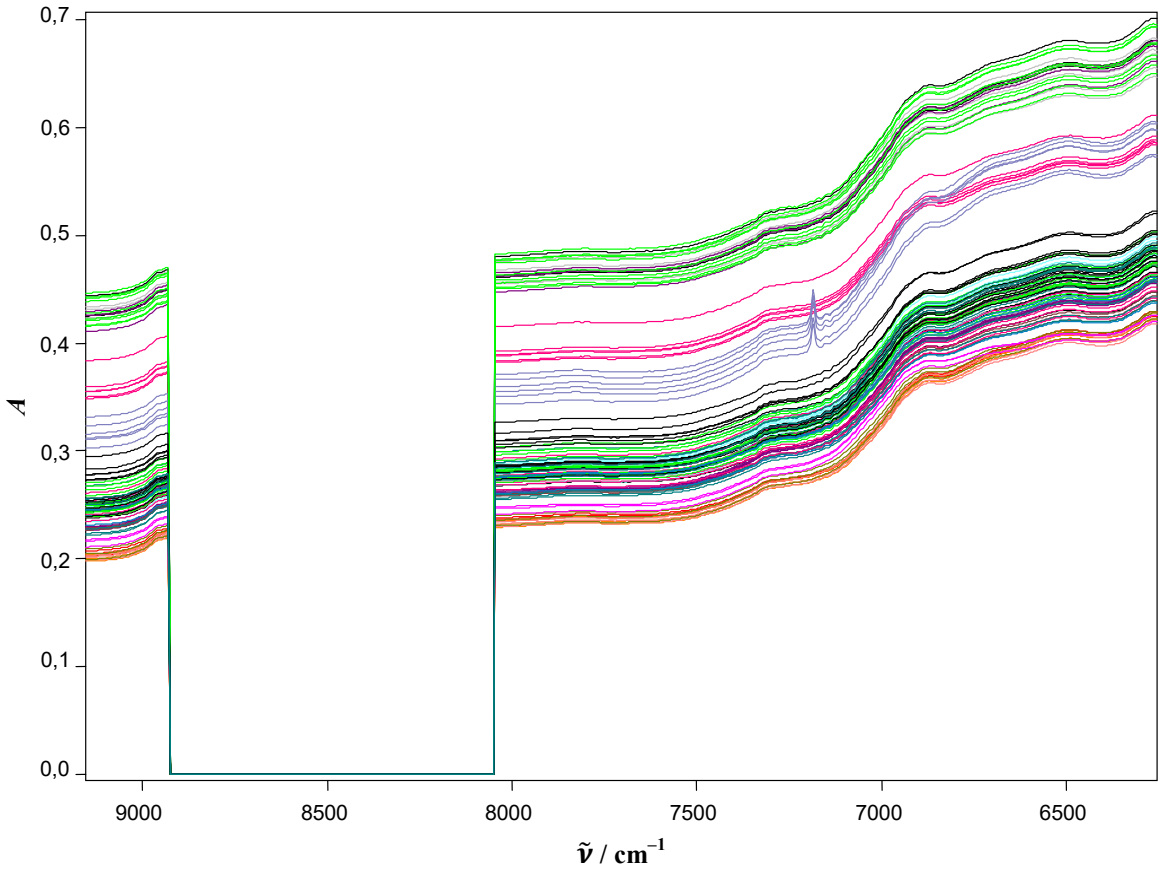
Tablica 13. Vrijednosti oslobođenog alopurinola u 20. minuti određene referentnom UV/Vis spektrofotometrijskom metodom i predloženom NIR spektroskopskom metodom.

Serija / doza	Uzorak	Referentna vrijednost / %	Predviđena vrijednost / %	Razlika / %
B4 / 200 mg	1	97,9	98,4	–0,5
	2	99,4	100,0	–0,6
	3	95,0	96,2	–1,2
B5 / 200 mg	1	97,8	99,2	–1,4
	2	99,6	102,5	–2,9
	3	99,0	98,2	0,8
B6 / 200 mg	1	95,8	98,7	–2,9
	2	98,4	96,3	2,1
	3	98,3	98,9	–0,6
B7 / 200 mg	1	98,0	95,0	3,0
	2	97,1	95,8	1,3
	3	98,1	96,4	1,7
B8 / 200 mg	1	93,2	97,2	–4,0
	2	95,0	96,9	–1,9
	3	95,1	100,3	–5,2
B9P / 200 mg	1	97,1	97,2	–0,1
	2	96,0	95,1	0,9
	3	93,8	92,9	0,9
C4 / 200 mg	1	96,9	98,0	–1,1
	2	97,2	96,6	0,6
	3	96,9	95,7	1,2
C4ST / 200 mg	1	94,9	92,5	2,4
	2	96,2	94,4	1,8
	3	96,0	93,7	2,3
D1 / 200 mg	1	94,9	99,7	–4,8
	2	97,4	101,5	–4,1
	3	96,8	97,9	–1,1
D3 / 100 mg	1	98,2	101,2	–3,0
	2	100,6	100,2	0,4
	3	101,9	100,4	1,5
D4 / 100 mg	1	100,3	101,3	–1,0
	2	100,1	101,9	–1,8
	3	99,8	98,9	0,9
D5 / 100 mg	1	97,0	95,7	1,3
	2	98,3	100,6	–2,3
	3	97,5	100,9	–3,4

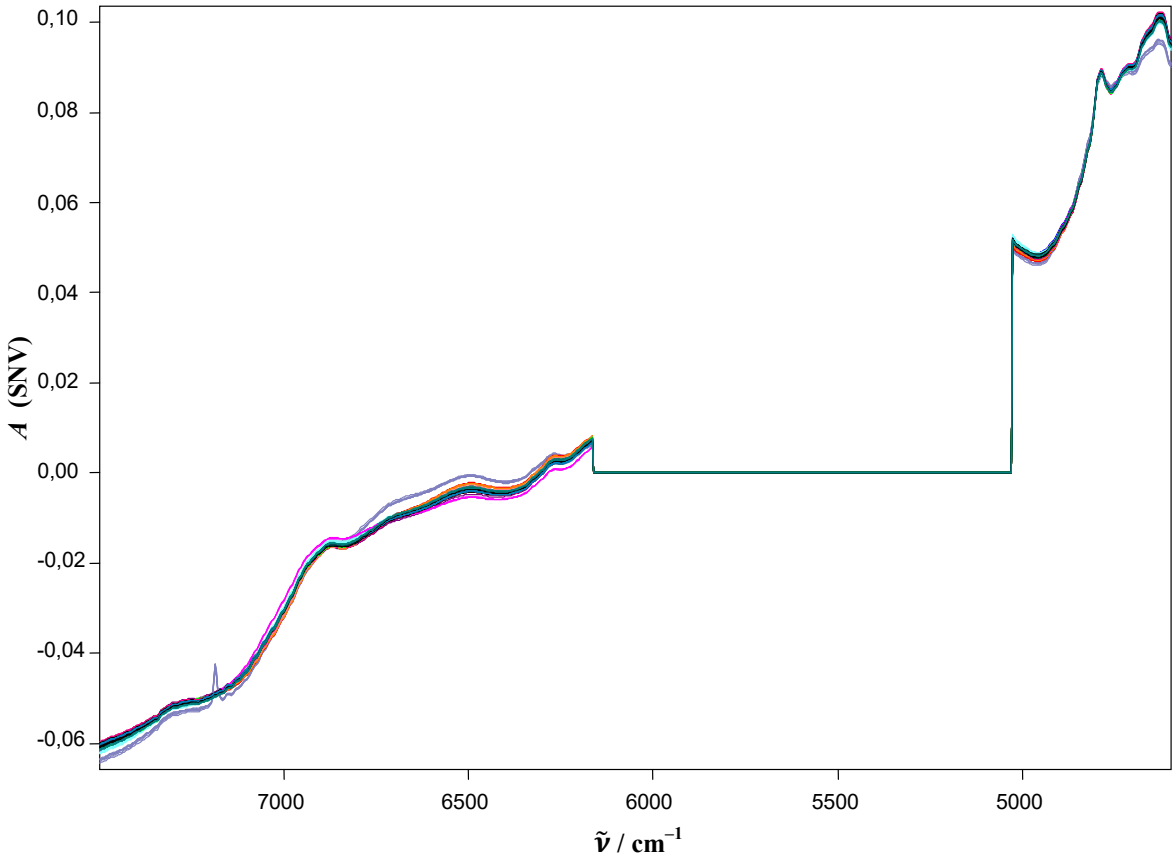
4.3.3.3. Oslobađanje alopurinola u 30. i 45. minuti

Osim tableta formulacije II i laboratorijske probe A2, svi ostali uzorci otpustili su više od 90% alopurinola u 30. minuti uzorkovanja. Manje razlike u sastavu tableta više se ne mogu sa sigurnošću korelirati s referentnim vrijednostima. Obzirom da su razlike u vrijednostima određenima za 30. i 45. minutu za formulaciju I gotovo zanemarive, trideseta minuta smatra se završetkom procesa oslobađanja djelatne tvari.

Za 30. minutu uzorkovanja razvijen je PLS model sa 122 tablete izuzetih iz serija: A1, A3, A5, A6, A8, A10, A12, A14, A15, A18, A19, A21, A22, A23, B9, B9N, B9V, B9U, B10, B10N, B10V, B11, B12S, C1, C3, C5, C5ST, C6, C7, C8, C8ST, C9, C9ST, D2S, D6, E1, E2, E3, E4. U završni kalibracijski model za 45. minutu uzorkovanja uključeno je istih 116 tableta kao i kod prethodnog vremena uzorkovanja, no izostavljene su laboratorijske probe A14 i A15. Uzorci serije A2 izostavljeni su iz oba modela zbog velikih razlika u vrijednostima oslobađanja između tableta iste serije (30. minuta: 51,0–95,7%; 45. minuta: 59,5– 96,9%). Za ostale uvrštene serije izračunane su RSD vrijednosti 1–2%. Za 30. minutu odabrana su dva spektralna područja u kojima nije bilo potrebe za matematičkom obradom prije primjene PLS, dok su za 45. minutu spektri obrađeni postupkom SNV (slike 51 i 52).



Slika 51. NIR spektri uzoraka u spektralnom području 9153–8929,3 cm^{-1} i 8046–6256,3 cm^{-1}, uključenih u kalibracijski model za 30. minutu oslobađanja.

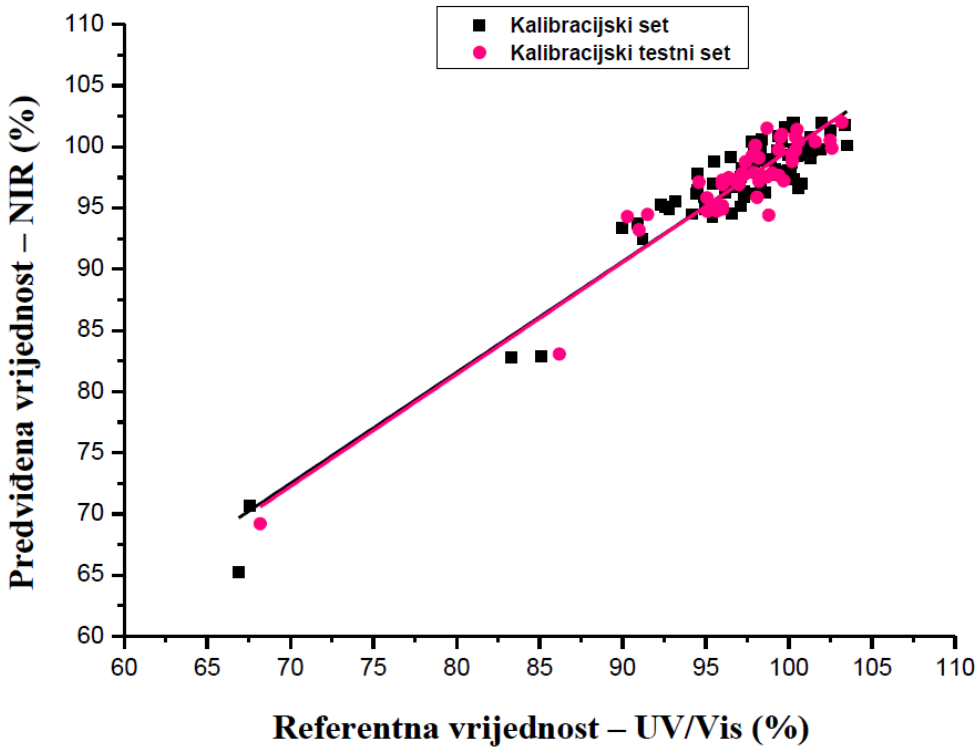


Slika 52. Matematički obrađeni NIR spektri uzoraka u spektralnom području 7498,3–6163,7 cm^{-1} i 5025,9–4597,7 cm^{-1}, uključenih u kalibracijski model za 45. minutu oslobađanja.

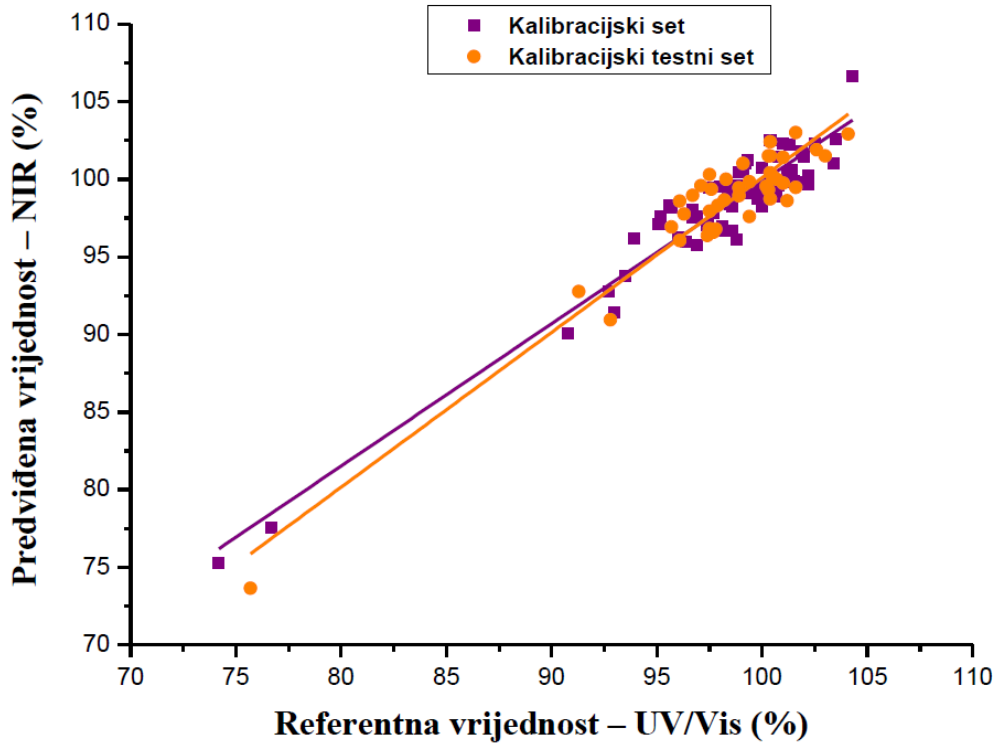
Prema vrijednostima statističkih parametara prikazanima u tablici 14, oba modela su prihvatljiva. Provjera je provedena na neovisnom setu uzoraka (tablica 15). Maksimalna razlika između predviđenih i referentnih vrijednosti niža je nego za 15. i 20. minutu oslobađanja i iznosi 3,5% (B8), iako referentne vrijednosti duž cijelog kalibracijskog raspona nisu jednako raspoređene (Slike 53 i 54). Zadovoljavajući rezultati dodatno su potvrđeni *F*-testom ($\alpha = 0,05$) i uparenim *t*-testom ($\alpha = 0,05$). Razlike u rezultatima između dviju metoda ne smatraju se značajnim: $F = 1,75 < F_{krit} = 1,76$; $t_{eksp} = 0,71 < t_{krit} = 1,69$ za 30. minutu i $F = 1,19 < F_{krit} = 1,76$; $t_{eksp} = 0,81 < t_{krit} = 1,69$ za 45. minutu.

Tablica 14. Statistički parametri završnog kalibracijskog modela za 30. i 45. minutu oslobađanja.

Parametar	**Vrijednost**	
	30. minuta	**45. minuta**
Spektralni raspon (cm^{-1})	9153–8929,3 8046–6256,3	7498,3–6163,7 5025,9–4597,7
Matematička obrada spektara	nema	SNV
Broj PLS varijabli	8	10
Kalibracijski set		
Broj uzoraka	76	75
Raspon ref. vrijednosti (%)	66,9–103,5	74,2–104,3
% objašnjene varijance	90,73	91,7
RMSEE (%)	1,97	1,43
RPD	3,28	3,47
Koeficijent korelacije	0,9525	0,9576
Odsječak	8,976	8,165
Nagib	0,907	0,917
Kalibracijski testni set (unutarnja validacija)		
Broj uzoraka	46	41
Raspon ref. vrijednosti (%)	68,2–103,2	75,7–104,1
% objašnjene varijance	90,05	88,84
RMSEP (%)	1,69	1,46
RPD	3,17	3,00
Koeficijent korelacije	0,9491	0,9485
Odsječak	8,092	0,412
Nagib	0,916	0,997
Pristranost predviđanja (%)	0,0398	–0,110



Slika 53. Ovisnost predviđenih vrijednosti o referentnim vrijednostima oslobođenog alopurinola iz tableta kalibracijskog seta i kalibracijskog testnog seta (unutarnja validacija) za 30. minutu oslobađanja.



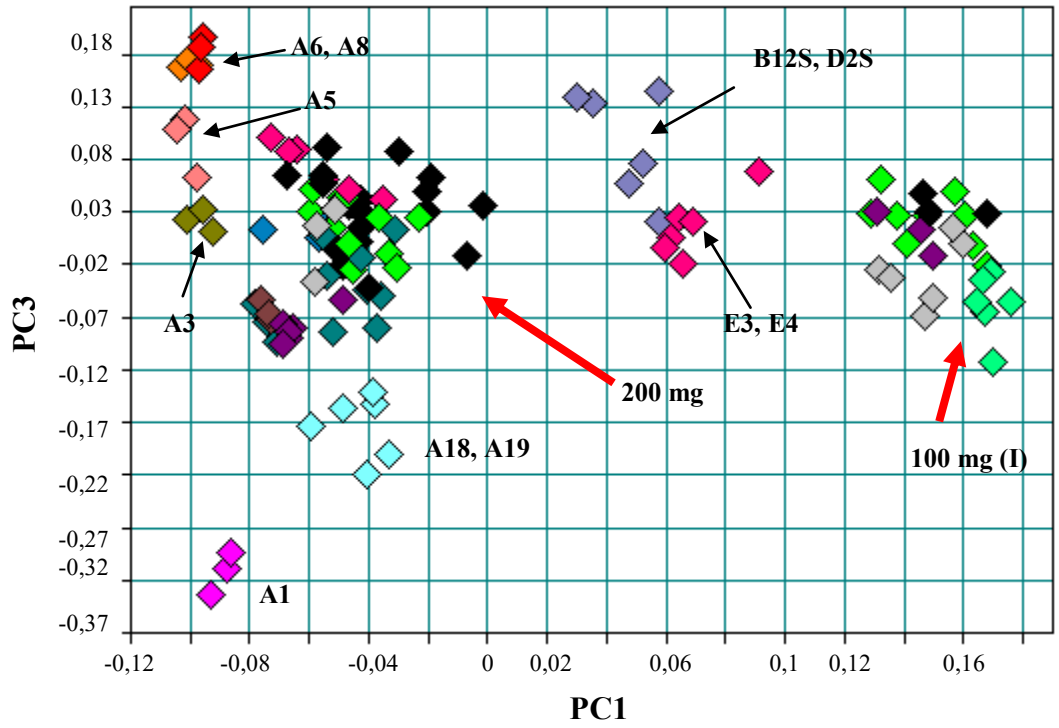
Slika 54. Ovisnost predviđenih vrijednosti o referentnim vrijednostima oslobođenog alopurinola iz tableta kalibracijskog seta i kalibracijskog testnog seta (unutarnja validacija) za 45. minutu oslobađanja.

Tablica 15. Vrijednosti oslobođenog alopurinola u 30. minuti i 45. minuti određene referentnom UV/Vis spektrofotometrijskom metodom i predloženom NIR spektroskopskom metodom.

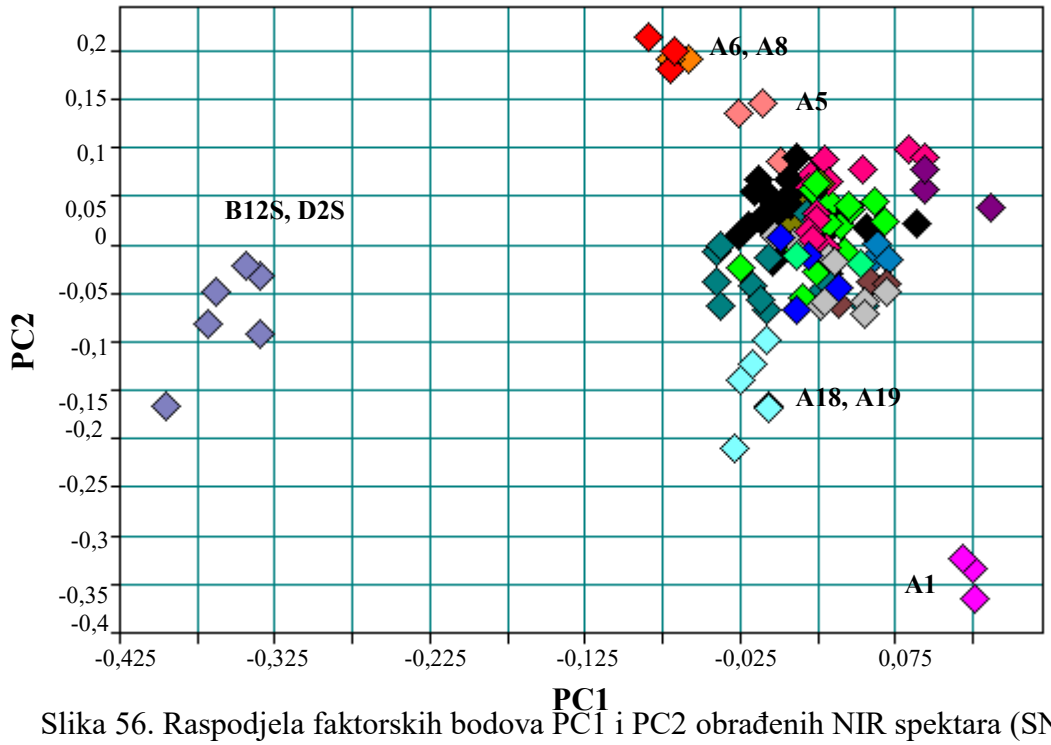
Serija / doza	Uzorak	Referentna vrijednost / %	Predviđena vrijednost / %	Razlika / %	Referentna vrijednost / %	Predviđena vrijednost / %	Razlika / %
		30. minuta			45. minuta		
B4 / 200 mg	1	99,8	98,0	1,8	99,8	99,7	0,1
	2	99,7	100,2	–0,5	101,1	100,8	0,3
	3	96,8	98,6	–1,8	99,7	101,7	–2,0
B5 / 200 mg	1	98,5	99,7	–1,2	99,9	100,5	–0,6
	2	100,4	100,5	–0,1	100,4	100,8	–0,4
	3	99,6	101,3	–1,7	99,6	102,5	–2,9
B6 / 200 mg	1	98,4	100,3	–1,9	98,4	99,9	–1,5
	2	99,5	99,6	–0,1	99,5	100,4	–0,9
	3	99,4	99,8	–0,4	99,4	101,1	–1,7
B7 / 200 mg	1	98,8	100,0	–1,2	100,5	98,1	2,4
	2	98,2	99,8	–1,6	98,3	99,6	–1,3
	3	99,7	100,2	–0,5	99,7	100,0	–0,3
B8 / 200 mg	1	94,8	98,3	–3,5	95,0	98,5	–3,5
	2	95,8	97,5	–1,7	97,1	99,3	–2,2
	3	96,1	98,3	–2,2	98,1	98,0	0,1
B9P / 200 mg	1	99,2	98,7	0,5	100,7	100,2	0,5
	2	98,0	97,3	0,7	98,7	98,8	–0,1
	3	97,0	97,8	–0,8	97,0	98,5	–1,5
C4 / 200 mg	1	96,9	94,8	2,1	97,8	97,5	0,3
	2	97,3	94,8	2,5	98,9	97,9	1,0
	3	98,4	94,7	3,7	98,9	97,5	1,4
C4ST / 200 mg	1	95,7	94,1	1,6	98,2	98,1	0,1
	2	97,9	95,0	2,9	99,3	98,9	0,4
	3	97,1	94,6	2,5	98,5	97,0	1,5
D1 / 200 mg	1	97,3	97,6	–0,3	98,6	101,6	–3,0
	2	100,7	99,3	1,4	102,3	100,1	2,2
	3	99,5	98,0	1,5	99,5	99,7	–0,2
D3 / 100 mg	1	98,2	100,9	–2,7	100,9	100,5	0,4
	2	101,3	101,4	–0,1	102,7	102,6	0,1
	3	102,4	103,5	–1,1	102,5	101,7	0,8
D4 / 100 mg	1	101,5	102,3	–0,8	102,1	102,1	0,0
	2	100,1	102,3	–2,2	100,8	102,7	–1,9
	3	100,8	101,5	–0,7	101,8	101,0	0,8
D5 / 100 mg	1	98,1	100,4	–2,3	99,5	98,9	0,6
	2	100,5	100,8	–0,3	101,9	98,7	3,2
	3	101,6	100,5	1,1	101,7	101,2	0,5

Iako primjenom PCA nije moguće povezati fizikalno–kemijska svojstva s referentnim vrijednostima kao što je to slučaj u 15. i 20. minuti oslobađanja, bodovi glavnih komponenti opisuju razlike u formulaciji i izgledu tableta ovisno o primijenjenoj matematičkoj obradi i

odabranom spektralnom rasponu. Tim vrlo jednostavnim postupkom, dobivaju se informacije o analiziranim uzorcima i moguće razlike između njih, iako su referentne vrijednosti oslobađanja djelatne tvari jednake. Na slici 55 prikazana je o ovisnost bodova PC3 o PC1 neobrađenih spektara za 30. minutu uzorkovanja. Prva glavna komponenta odvojila je uzorke ovisno o izgledu tableta, a treća ovisno o formulaciji. Za 45. minutu oslobađanja PC1 je opisala razlike u formulaciji (slika 56).



Slika 55. Raspodjela faktorskih bodova PC1 i PC3 NIR spektara u spektralnom području 9153–8929,3 cm^{-1} i 8046–6256,3 cm^{-1}.

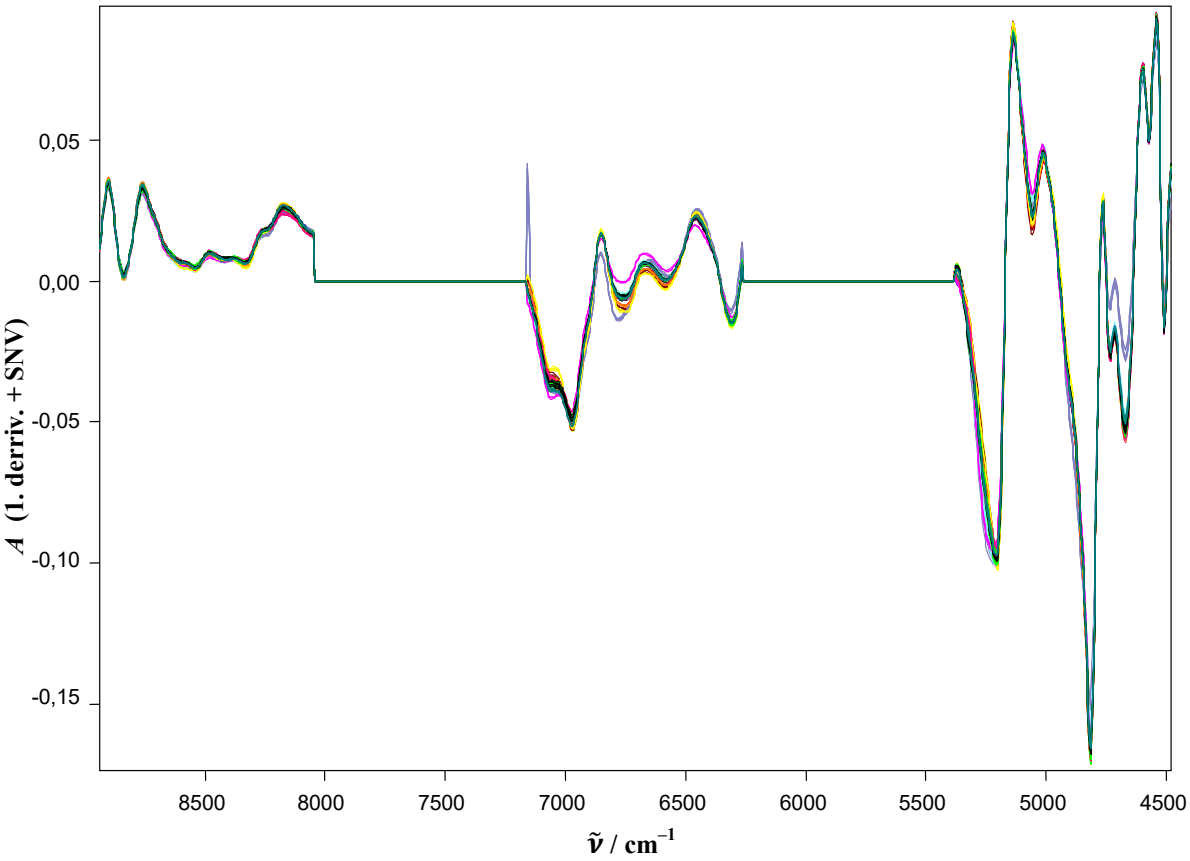


Slika 56. Raspodjela faktorskih bodova PC1 i PC2 obrađenih NIR spektara (SNV) u spektralnom području 7498,3–6163,7 cm^{-1} i 5025,9–4597,7 cm^{-1}.

4.3.3.4. Oslobađanje alopurinola u 5. i 10. minuti

Nedostatak ranijih vremena uzorkovanja pri analizi tableta s vrlo brzim oslobađanjem je neujednačenost rezultata unutar iste serije uzoraka. Za dvadesetak serija relativna standardna devijacija izmjerenih vrijednosti oslobađanja u 5. minuti iznosila je više od 10%, a u 10. minuti bila je nekoliko puta veća nego što je u 15. minuti uzorkovanja. Razlog je nehomogeni proces raspadanja tableta i otpuštanje alopurinola, kao i sam postupak analize. Svaka sekunda može utjecati na krajnji rezultat, a ručnim uzorkovanjem nije moguće osigurati uvijek istovremeni prekid oslobađanja djelatne tvari. Unatoč tome razvijena su dva PLS modela, posebno za 5. i 10. minutu oslobađanja.

U završni PLS model za 5. minutu uvršteno je 112 tableta iz sljedećih serija: A1, A2, A4, A6, A7, A8, A14, A15, A18, A19, A21, A22, A23, A26, A27, A28, B9N, B9V, B9U, B10, B10V, B11, B11V, B12S, C1, C3, C5, C5ST, C7, C8, C8ST, C9, C9ST, D2S, D6, E1, E2, E3, E4. Neki uzorci iz navedenih serija nisu bili uključeni u model zbog prevelikih razlika u rezultatima unutar iste serije. Matematički obrađeni spektri odabranih spektralnih područja prikazani su na slici 57.



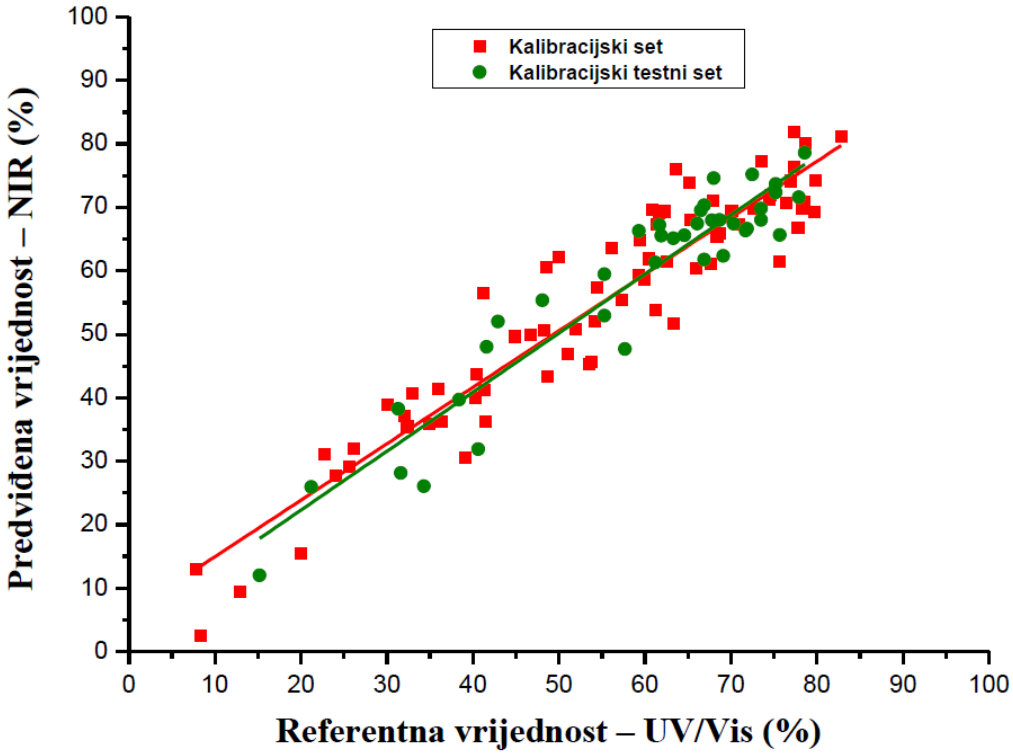
Slika 57. Matematički obrađeni NIR spektri uzoraka u spektralnom području 8937–8046 cm^{-1}, 7158,9–6264 cm^{-1} i 5380,7–4482 cm^{-1}, uključenih u kalibracijski model za 5. minutu oslobađanja.

Statističke vrijednosti završnog modela navedene su u tablici 16, a ovisnost predviđenih vrijednosti o referentnim vrijednostima kalibracijskog seta i kalibracijskog testnog seta (unutarnja validacija) prikazana na slici 58. Za razliku od vrijednosti oslobađanja alopurinola u 15. minuti i nakon nje, referentne vrijednosti za 5. i 10 minutu jednoliko su raspoređene unutar kalibracijskog područja. Na otpuštanje djelatne tvari utjecale su uz različite formulacije tableta, i razlike u tvrdoći, izgledu i proizvodnom postupku. Kada na rezultate ne bi utjecao sam postupak provođenja analize, navedeno vrijeme uzorkovanja bilo bi idealno za praćenje svih važnih fizikalno–kemijskih svojstava proizvoda. Izuzev laboratorijske probe A2, za koju je odskakanje referentnih vrijednosti zabilježeno za sva vremena uzorkovanja, vrijednosti u petoj minuti oslobađanja mogu osim na razlike između formulacije I i II, ukazati i na manje promjene. To se odnosi na laboratorijske probe A6 (59,3–63,3%) i A8 (65,2%, 73,8%) koje sadrže jednaku, manju količinu ukupnog škroba, pri

čemu proba A8 sadrži manje povidona, te na razlike između količine škroba dodanog tijekom i nakon granulacije (A14 (više škroba dodano tijekom granulacije): 51,0–57,7%; A4 (više škroba dodano nakon granulacije): 32,4–34,3%). Dulje vrijeme lubrikacije (A19) rezultiralo je manjom količinom otpuštenog alopurinola za oko 10% u odnosu na kraće vrijeme lubrikacije (A18). Utjecaj tvrdoće vidljiv je na uzorcima serije B10 i B10V, kod kojih su tvrđe tablete otpustile otprilike 15% manje djelatne tvari. Utjecaj geometrije alata za tabletiranje uočen je na probama A25 (67,8–77,5%), i A26 (41,4%, 48,1%). Obzirom da tablete proizvodnih serija doze 100 mg neće imati bikonveksni oblik kao laboratorijska proba A25, navedena serija nije uvrštena u kalibracijski model.

Tablica 16. Statistički parametri završnog kalibracijskog modela za 5. i 10. minutu oslobađanja.

Parametar	**Vrijednost**	
	5. minuta	**10. minuta**
Spektralni raspon (cm^{-1})	8937–8046 7158,9–6264 5380,7–4482	8937–6264
Matematička obrada spektara	1. derivacija (17 točaka glačanja) + SNV	*straight line subtraction*
Broj PLS varijabli	9	9
Kalibracijski set		
Broj uzoraka	74	71
Raspon ref. vrijednosti (%)	7,8–82,8	17,3–99,0
% objašnjene varijance	88,96	93,26
RMSEE (%)	6,78	4,56
RPD	3,01	3,85
Koeficijent korelacije	0,9432	0,9657
Odsječak	6,081	5,386
Nagib	0,890	0,933
Kalibracijski testni set (unutarnja validacija)		
Broj uzoraka	38	48
Raspon ref. vrijednosti (%)	15,2–78,6	17,4–96,6
% objašnjene varijance	89,81	90,98
RMSEP (%)	5,23	4,63
RPD	3,14	3,39
Koeficijent korelacije	0,9486	0,9561
Odsječak	3,696	3,535
Nagib	0,930	0,946
Pristranost predviđanja (%)	0,428	0,874



Slika 58. Ovisnost predviđenih vrijednosti o referentnim vrijednostima oslobođenog alopurinola iz tableta kalibracijskog seta i kalibracijskog testnog seta (unutarnja validacija) za 5. minutu oslobađanja.

Primjenom PCA na odabrana spektralna područja u NIR spektrima, matematički obrađenim postupcima prve derivacije i SNV nisu dobivene dodatne informacije koje već nisu poznate iz ostalih vremena oslobađanja.

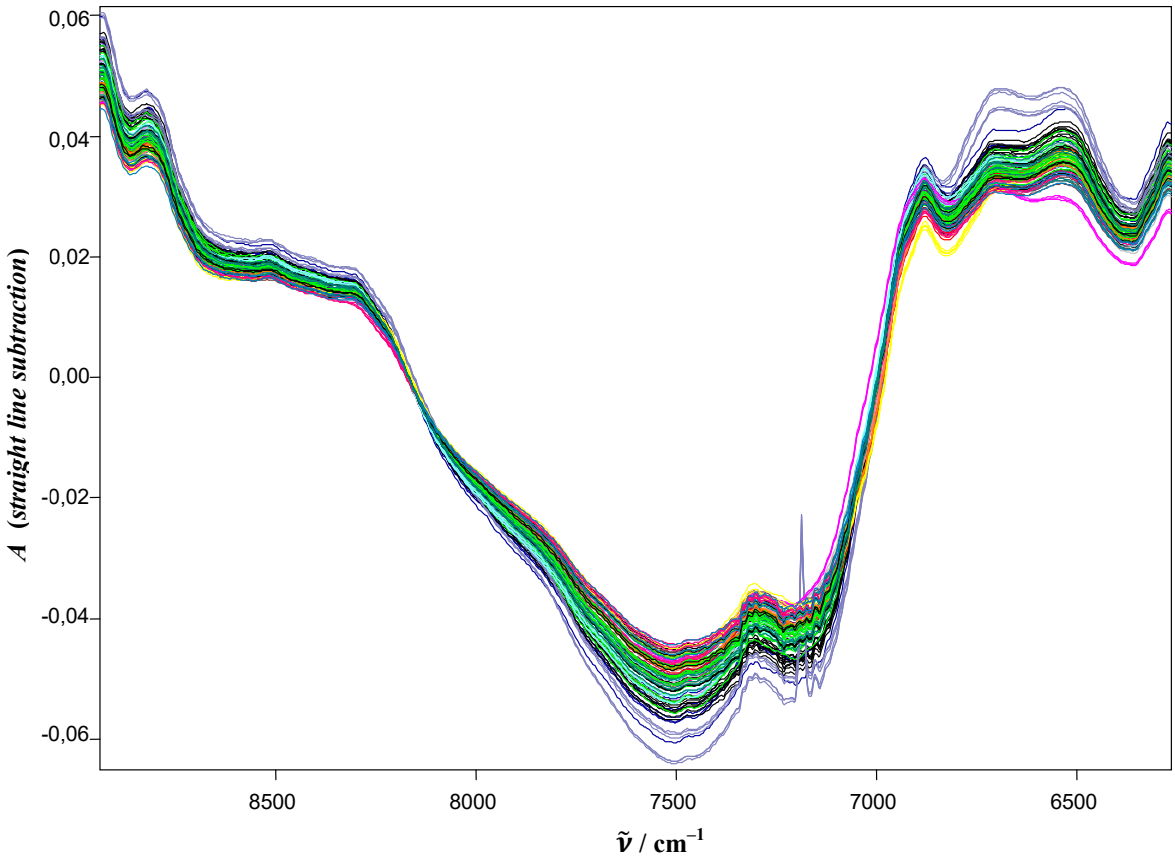
Pouzdanost modela ispitna je na neovisnom setu uzoraka, a rezultati predviđanja navedeni su u tablici 17. Razlike u odnosu na referentnu metodu su prevelike i kreću se u rasponu od 1,1 do 20,6%, što nije prihvatljivo. Referentna metoda za 5. minutu oslobađanja nije dovoljno pouzdana pa samim time nije niti predložena NIR metoda.

Tablica 17. Vrijednosti oslobođenog alopurinola u 5. minuti i 10. minuti određene referentnom UV/Vis spektrofotometrijskom metodom i predloženom NIR spektroskopskom metodom.

Serija / doza	Uzorak	Referentna vrijednost / %	Predviđena vrijednost / %	Razlika / %	Referentna vrijednost / %	Predviđena vrijednost / %	Razlika / %
		5. minuta			10. minuta		
B4 / 200 mg	1	62,2	60,5	1,7	92,2	82,8	9,4
	2	60,0	56,9	3,1	90,3	86,0	4,3
	3	68,8	63,9	4,9	90,0	85,2	4,8
B5 / 200 mg	1	64,8	53,2	11,6	92,0	83,5	8,5
	2	61,7	59,9	1,8	90,2	87,3	2,9
	3	69,3	62,8	6,5	92,0	90,0	2,0
B6 / 200 mg	1	66,9	65,5	1,4	87,2	83,1	4,1
	2	65,5	54,7	10,8	93,7	84,9	8,8
	3	52,9	58,8	–5,9	90,3	85,9	4,4
B7 / 200 mg	1	56,3	44,8	11,5	87,7	77,9	9,8
	2	66,2	45,6	20,6	92,8	77,3	15,5
	3	62,2	51,6	10,6	90,2	83,2	7,0
B8 / 200 mg	1	68,4	70,3	–1,9	84,5	85,6	–1,1
	2	69,4	64,3	5,1	86,1	88,7	–2,6
	3	71,0	63,5	7,5	84,1	85,8	–1,7
B9P / 200 mg	1	76,5	68,7	7,8	87,2	84,0	3,2
	2	73,7	76,6	–2,9	92,4	83,5	8,9
	3	74,5	73,2	1,3	86,9	82,5	4,4
C4 / 200 mg	1	71,1	65,4	5,7	89,6	88,6	1,0
	2	74,8	63,8	11,0	90,1	87,5	2,6
	3	75,1	66,5	8,6	90,0	86,0	4,0
C4ST / 200 mg	1	74,6	69,6	5,0	89,5	86,5	3,0
	2	75,1	70,1	5,0	88,2	86,1	2,1
	3	78,0	68,6	9,4	93,2	86,6	6,6
D1 / 200 mg	1	53,1	55,2	–2,1	84,3	89,8	–5,5
	2	68,4	66,9	1,5	89,6	88,2	1,4
	3	68,8	77,2	–8,4	87,2	88,7	–1,5
D3 / 100 mg	1	55,3	49,3	6,0	89,6	90,4	–0,8
	2	60,2	57,9	2,3	92,2	91,1	1,1
	3	74,4	55,4	19,0	99,9	90,7	9,2
D4 / 100 mg	1	43,8	46,2	–2,4	83,6	86,5	–2,9
	2	55,1	55,8	–0,7	92,9	92,5	0,4
	3	66,8	59,7	7,1	96,3	89,8	6,5
D5 / 100 mg	1	47,9	46,8	1,1	81,0	79,6	1,4
	2	49,7	45,1	4,6	81,3	82,4	–1,1
	3	53,5	55,5	–2,0	88,7	86,3	2,4

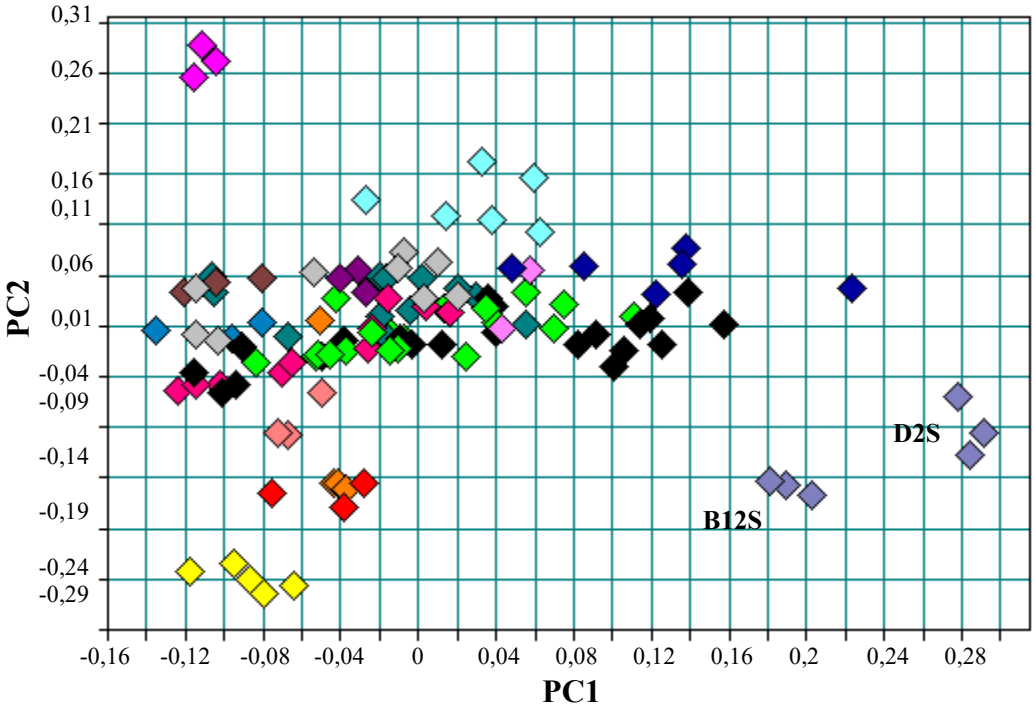
U razvoj kalibracijskog PLS modela za 10. minutu oslobađanja uključeno je 119 tableta iz sljedećih serija: A1, A2, A4, A5, A6, A8, A10, A12, A14, A18, A19, A21, A22, A23, B9N, B9V, B10, B10N, B10V, B11, B11V, B11U, B12S, C1, C3, C5, C5ST, C7, C8, C8ST, C9, C9ST, D2S, D6, E1, E2, E3, E4. Relativne standardne devijacije uzoraka unutar pojedinih serija niže su nego za 5. minuti uzorkovanja. Vrijednosti oslobođenog alopurinola iz uzoraka koji se razlikuju u tvrdoći gotovo su izjednačeni. Razlike referentnih vrijednosti uzoraka različitih formulacija jače su istaknute za laboratorijske probe A4, A5 i A10, nego u 15. minuti oslobađanja. Isto vrijedi i za razliku u vremenu lubrikacije za uzorke A18 i A19.

Spektri su prije uvrštavanja u završni PLS model obrađeni postupkom *straight line subtraction* u rasponu 8937–6264 cm^{-1} (slika 59).



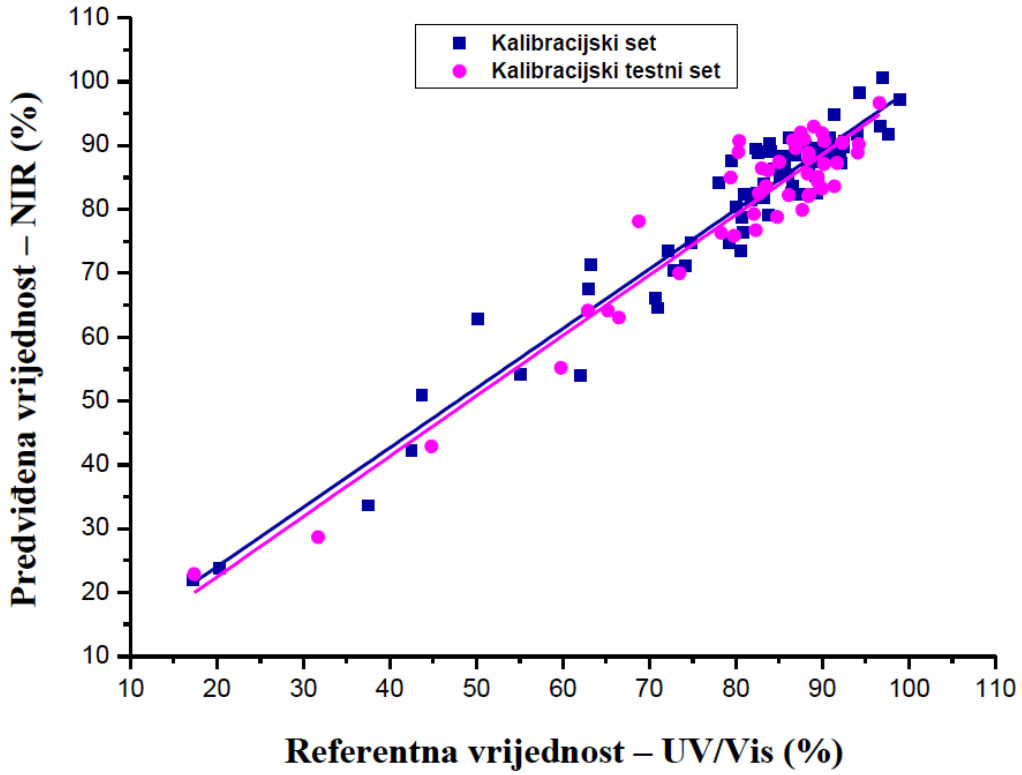
Slika 59. Matematički obrađeni NIR spektri uzoraka u spektralnom području 8937–6264 cm^{-1}, uključeni u kalibracijski model za 10. minutu oslobađanja.

Korelacija informacija na temelju PCA analize i referentnih vrijednosti, znatno je lošija nego za 15. minutu oslobađanja, jednako kao i odvajanje uzoraka na temelju fizikalnih razlika. Jedina dodatna informacija koja nije opažena niti za jedno drugo vrijeme uzorkovanja je odvajanje uzoraka B12S od D2S duž PC1 (slika 60). Navedeni uzorci razlikuju se prema proizvođaču djelatne tvari, veličini čestica, starosti i veličini proizvodne serije, a odabrano spektralno područje uz primijenjenu matematičku obradu uspjelo je to istaknuti.



Slika 60. Raspodjela faktorskih bodova PC1 i PC2 obrađenih NIR spektara u spektralnom području 8937–6264 cm^{-1}.

Podaci o završnom PLS modelu navedeni su u tablici 16 (slika 61), a predviđene vrijednosti na neovisnom setu uzoraka u tablici 17. Razlike u rezultatima između metoda kreću se u rasponu od 0,4 do 15,5%, a za većinu serija razlika je veća od 5%. Iako su dobivene predviđene vrijednosti prihvatljivije nego za 5. minutu oslobađanja, one nisu dovoljno točne i mogu služiti samo u informativne svrhe.



Slika 61. Ovisnost predviđenih vrijednosti o referentnim vrijednostima oslobođenog alopurinola iz tableta kalibracijskog seta i kalibracijskog testnog seta (unutarnja validacija) za 10. minutu oslobađanja.

§ 5. ZAKLJUČAK

Rezultati provedenog istraživanja upućuju na mogućnost primjene NIR spektroskopije za predviđanje otpuštanja alopurinola iz neobloženih tableta s vrlo brzim oslobađanjem. Razvijeno je šest zasebnih kvantitativnih kemometričkih modela uz PLS metodu regresije, po jedan za svako vrijeme uzorkovanja (5., 10., 15., 20., 30. i 45. minuta). Razvoj NIR metode uključivao je uzorke različitih fizikalno–kemijskih svojstava u svrhu pokrivanja mogućih varijacija u proizvodnji tableta te osiguravanja dovoljno širokog raspona referentnih vrijednosti. Iako je sam postupak razvoja metode prilično zahtjevan, provođenje analiza vrlo je jednostavno. Točnost metode provjerena je na zasebnom setu uzoraka završnog sastava formulacije I doze 100 i 200 mg. Prema vrijednostima statističkih parametara koji opisuju svaki od PLS modela može se zaključiti da je predložena metoda pogodna za određivanje alopurinola u 15., 20., 30. i 45. minuti oslobađanja. Ranija vremena uzorkovanja (5. i 10. minuta) karakterizirana su većim razlikama između izmjerenih i predviđenih vrijednosti, koje iznose i do dvadesetak posto. Obzirom da je predmet istraživanja bio kruti oralni oblik s vrlo brzim oslobađanjem, najvažniji model je onaj koji opisuje otpuštanje alopurinola u 15. minuti uzorkovanja. Osim zadovoljavajućih predviđenih vrijednosti oslobođenog alopurinola za svaku pojedinačnu tabletu, dobiveni su dodatni podaci o proizvodu koje klasičnom metodom oslobađanja nije bilo moguće opaziti. Primjenom PCA na NIR spektre snimljene difuznom refleksijom zračenja odvojeni su uzorci ovisno o sastavu, izgledu tableta, proizvođaču gotovog proizvoda i uvjetima skladištenja. Raspodjela faktorskih bodova prve i druge glavne komponente ukazala je na razliku u količini dodanih pomoćnih tvari, koju je moguće korelirati s otpuštanjem alopurinola. Najveća varijanca odnosila se upravo na sadržaj pomoćnih tvari, a one manje na razlike u fizikalnim svojstvima, primjerice ovisnim o uvjetima skladištenja i mjestu proizvodnje. Razvijenom NIR spektroskopskom metodom moguće je razlikovati uzorke ne samo prema kemijskoj formulaciji, već i fizikalnim svojstvima tableta, za razliku od referentne UV/Vis spektroskopske metode čijom su primjenom do 15. minute uzorkovanja navedene informacije nepovratno izgubljene. Iako je PCA služila kao pomoć pri razvoju PLS modela, opažene rezultate bilo je moguće povezati i s količinom otpuštene djelatne tvari.

Manje razlike između predviđenih i referentnih vrijednosti u odnosu na 15. minutu oslobađanja zabilježene su za 20. minutu, kao i niže pogreške korijena srednjih kvadratnih pogrešaka kalibracije i predviđanja, viša vrijednost rezidualnog odstupanja predviđanja, niža vrijednost pristranosti predviđanja, a vrijednost nagiba bliža je jedinici. Razlog tomu su ujednačenije vrijednosti postotka oslobođenog alopurinola unutar iste serije uzoraka, tj. niža RSD vrijednost. Mogućnost korelacije referentnih vrijednosti i podataka opaženih na temelju PCA još uvijek postoji, ali s manjom sigurnošću zbog sve manjeg utjecaja razlika u formulaciji i kritičnih koraka u proizvodnom postupku na otpuštanje alopurinola. U 30. i 45. minuti oslobađanja referentne vrijednosti vrlo su slične i korelacija s PCA podacima je onemogućena. Informacije pohranjene u NIR spektrima nisu ovisile o vremenima uzorkovanja, a utjecaj pojedinih fizikalno–kemijskih osobina uzoraka na oslobađanje alopurinola utvrđen je analizom različitih spektralnih područja prethodno obrađenih odgovarajućim matematičkim obradama.

Jednoliko raspoređene referentne vrijednosti duž cijelog kalibracijskog područja zabilježene su za 5. i 10. minutu oslobađanja, no razvijeni modeli nisu pouzdani zbog slabe točnosti rezultata određenih referentnom metodom. Relativna standardna devijacija vrlo je visoka za većinu serija uključenih u razvoj modela, kao i u provjeru metode. Osim što je do izražaja došao nehomogeni proces otpuštanja alopurinola u otopinu, većim pogreškama pridonio je i sam postupak provođenja analize ručnog uzorkovanja. Uključivanjem većeg broja tableta iste serije ublažile bi se RSD vrijednosti, ali ne dovoljno. To bi moglo uzrokovati probleme kod periodičkih provjera (validacije) NIR metode pa se smatra da primarna, a posljedično tome i sekundarna metoda nisu dovoljno robustne i pouzdane za kvantitativno određivanje oslobođenog alopurinola u 5. i 10. minuti uzorkovanja.

Temeljem rezultata ovog istraživanja, općenito se može zaključiti da je NIR spektroskopija u kombinaciji s multivarijatnim statističkim metodama moguća alternativa klasičnom načinu analize oslobađanja djelatne tvari iz farmaceutskih oblika s vrlo brzim oslobađanjem. Potrebni podaci dobivaju se u vrlo kratkom vremenu i na vrlo jednostavan način, što omogućava njenu primjenu u rutinskoj kontroli kvalitete gotovog proizvoda te u praćenju njegovog stanja u slučaju promjena kritičnih fizikalno–kemijskih osobina. Kraće vrijeme analize omogućuje brže generiranje rezultata i u konačnici ubrzava postupak puštanja lijeka u promet.

§ 6. POPIS KRATICA I SIMBOLA

A – apsorbancija

as – asimetrična vibracija

AOTF – akustičko–optički prilagodljivi filter

BA – bioraspoloživost

BCS – biofarmaceutski sustav klasifikacije

BE – bioekvivalentan

DA – diskriminantna analiza

DoE – dizajn eksperimenata

f_1 – faktor različitosti

f_2 – faktor sličnosti

FDA – Administracija za hranu i lijekove

EMA – Europska agencija za lijekove

GMP – dobra proizvođačka praksa

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

IVIVC – *in vitro–in vivo* korelacija

MIR – srednje infracrveno zračenje

MSC – višestruka korekcija raspršenog zračenja

NIR – blisko infracrveno zračenje

NIRS – spektroskopija bliskog infracrvenog zračenja

PAT – procesna analitička tehnologija

PC – glavne komponente

PCA – analiza po glavnim komponentama

PCR – regresija po glavnim komponentama

PLS – parcijalni postupak najmanjih kvadrata

RMSEC, RMSEE – korijen srednje kvadratne pogreške kalibracije

RMSECV – korijen srednje kvadratne pogreške unakrsne validacije

RMSEP – korijen srednje kvadratne pogreške predviđanja

RPD – vrijednost rezidualnog odstupanja predviđanja

RSD – relativna standardna devijacija

Q – količina oslobođene djelatne tvari od deklaracije izražena u postotku

QBD – kvaliteta ugrađena u dizajn (engl., *Quality by Design*)

s – simetrična vibracija

SD – standardna devijacija

SEC – standardna pogreška kalibracije

SECV – standardna pogreška unakrsne validacije

SEP – standardna pogreška predviđanja

SIMCA – meko neovisno modeliranje analogije klasa

SNV – standardna normalna variata

T – transmitancija

t – vrijeme

UV – ultraljubičasto zračenje

Vis – vidljivo zračenje

WC – korelacija valnih duljina

δ – deformacijska vibracija

ν – istezna vibracija

$\tilde{\nu}$ – valni broj

ξ_i – Recignov indeks

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. S. H. Tabasi, V. Moolchandani, R. Fahmy i S. W. Hoag, *Int. J. Pharm*. **382** (2009) 1–6.
2. A. C. de Oliveira Neves, G.M. Soares, S. C. de Morais, F. S. L. da Costa, D. L. Porto i K. M. G. de Lima, *J. Pharmaceut. Biomed.* **57** (2012) 115–119.
3. M. P. Freitas, A. Sabadin, L. M. Silva, F. M. Gianotti, D. A. do Couto, E. Tonhi, R. S. Medeiros, G. L. Coco, V. F. T.Russo i J. A. Martins, *J. Pharmaceut. Biomed.* **39** (2005) 17–21.
4. A. S. Tatavarti, R. Fahmy, H. Wu, A. S. Hussain, W. Marnane, D. Bensley, G. Hollenbeck i S. W. Hoag, *AAPS. PharmSciTech* **6 (1)** (2005) 91–99.
5. T. Kuny, C. Schatz, M. Ulmschneider, S. Marrer i H. Leuenberger, *Dissolut. Technol.* **february** (2003) 22–28.
6. C. Gendre, M. Boiret, M. Genty, P. Chaminade i J. M. Pean, *Int. J. Pharm*. **421** (2011) 237–243.
7. P. Pawar, Y. Wang, G. Keyvan, G. Callegari, A. Cuitino i F. Muzzio, *Int. J. Pharm*. **512** (2016) 96–107.
8. Directive 2001/83/EC of the European parliament and of the council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use, OJ L 311, 28.11.2001, p. 67.
9. Pravilnik o ispitivanju bioraspoloživosti i bioekvivalenciji lijekova, *Narodne novine*, 124/97.
10. Center for drug evaluation and research (CDER), *Guidance for industry, Immediate release solid oral dosage forms, scale-up and postapproval changes: chemistry, manufacturing and controls,* in vitro *dissolution testing and* in vivo *bioequivalence documentation*, November 1995.
11. The United State Pharmacopoeia, USP 40 – NF 35, *1088* In vitro *and* in vivo *evaluation of dosage forms,* U.S. Pharmacopoeial Convention, Rockville, 2016.
12. U.S. Department of health and human services food and drug administration, Center for drug evaluation and research (CDER), *Guidance for industry, Bioavailability and bioequivalence studies for orally administrated drug products – general considerations, Revision 1*, March 2003.

13. A. Dokoumetzidis i P. Macheras, *Int. J. Pharm.* **321** (2006) 1–11.
14. J. Dressman i J. Krämer, *Pharmaceutical dissolution testing*, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2005.
15. European Pharmacopoeia (Ph.Eur.) 9th edition, *2.9.1. Disintegration of tablets and capsules,* Council of Europe, Strasbourg, 2016.
16. A. Gupta, R. L. Hunt, R. B. Shah, V. A. Sayed i M. A. Khan, *AAPS. PharmSciTech* **10(2)** (2009) 495–499.
17. The United State Pharmacopoeia, USP 40 – NF 35 (2017), *1090 Assessment of drug product performance – bioavailability, bioequivalence and dissolution,* U.S. Pharmacopoeial Convention, Rockville, 2016.
18. G. Singhvi i M. Singh, *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2(1)** (2011) 77–84.
19. W. I. Higuchi, *J. Pharm. Sci*. **56 (3)** (1967) 315–324.
20. P. Costa i J. M. S. Lobo, *Eur. J. Pharm. Sci.* **13** (2001) 123–133.
21. I. J. Hardy, A. Windberg-Baarup, C. Neri, P. J. Byway, S. W. Booth i S. Fitzpatrick, *Int. J. Pharm.* **337** (2007) 246–253.
22. M. H. Shoaib, J. Tazeen, H. A. Merchant i R. I. Yousuf, *Pak. J. Pharm. Sci.* **19(2)** (2006) 119-124.
23. D. J. Phillips, S. R. Pygall, V. Brett Cooper i J. C. Mann, *J. Pharm. Pharmacol.* **64** (2012) 1549–1559.
24. The United State Pharmacopoeia, USP 40 – NF 35 (2017), *711 Dissolution,* U.S. Pharmacopoeial Convention, Rockville, 2016.
25. European Pharmacopoeia (Ph.Eur.) 9th edition, *2.9.3. Dissolution test for solid dosage forms,* Council of Europe, Strasbourg, 2016.
26. Dissolution toolkit procedures for mechanical calibration and performance verification test apparatus 1 and apparatus 2, Version 2.0, USP, 2010.
27. The United State Pharmacopoeia, USP 40 – NF 35 (2017), *1092 The dissolution procedure: Development and validation,* U.S. Pharmacopoeial Convention, Rockville, 2016.
28. http://www.labhut.com/education-centre/about-dissolution-testing/apparatus-1-rotating-basket.html (preuzeto 14. kolovoza 2017. god.)
29. http://www.labhut.com/education-centre/about-dissolution-testing/apparatus-2-paddle-test.html (preuzeto 14. kolovoza 2017. god.)

30. J. Kukura, J. L. Baxter i F. J. Muzzio, *Int. J. Pharm.* **279** (2004) 9–17.
31. Q. Wang, D. Ma i J. P. Higgins, *Dissolut. Technol.* **august** (2006) 6–13.
32. U.S. Department of health and human services food and drug administration, Center for drug evaluation and research (CDER), *Guidance for industry, Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system, draft, Revision 1*, May 2005.
33. ICH harmonized tripartite guideline, *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*, 2005.
34. G. P. Martin i V. A. Gray, *Addressing compliance concerns during dissolution method development, validation and transfer*, *Analytical Method Validation Volume III,* IVT Network, 2013.
35. European Medicines Agency, *Reflection paper on the dissolution specification for generic oral immediate release products, Draft,* EMA/332805/2016, 2016.
36. European Medicines Agency, *Guideline on the investigation of bioequivalence,* Doc. Ref.: CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1/ Corr **, London 2010.
37. T. O' Hara, A. Dunne, J. Butler i J. Devane, *Pharm. Sci. Technol. To.* **1(5)** (1998) 214–223.
38. M. L. Dumont i M. R. Berry, B. Nickerson, *J. Pharmaceut. Biomed.* **44** (2007) 79–84.
39. S. S. Baharate i S. B. Baharate i A. N. Bajaj, *J. Excipients and Food Chem.* **1(3)** (2010) 3–26.
40. R. C. Rowe, P. J. Sheskey i M. E. Quinn (Ed.), *Handbook of pharmaceutical excipinets, sixth ed.*, Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, London, Chicago 2009.
41. S. Grbic, J. Parojcic, S. Ibric i Z. Djuric, *AAPS. PharmSciTech* **12(1)** (2011) 165–171.
42. The United State Pharmacopoeia, USP 40 – NF 35 (2017), *1059 Excipient performance,* U.S. Pharmacopoeial Convention, Rockville, 2016.
43. Solid dose experts Techceuticals, *The manufacturing process: Tablets and capsule manufacturing* **15** (2015) 1–12.
44. H. Kalasz i I. Antalz, *Curr. Med. Chem.* **13** (2006) 2535–2563.
45. K. Sugisawa, T. Kanek, T. Sado i T. Sato, *J. Pharmaceut. Biomed.* **49** (2009) 858–861.
46. J. Wang, H. Wen i D. Desai, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **75** (2010) 1–15.

47. European Pharmacopoeia (Ph.Eur.) 9th edition, *2.2.40. Near-infrared spectrophotometry* Council of Europe, Strasbourg, 2016.
48. J. Workman Jr. i L. Weyer, *Practical guide to interpretive near-infrared spectroscopy*, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2008.
49. H. Günzler i H. U. Gremlich, *Uvod u infracrvenu spektroskopiju*, Školska knjiga, Zagreb, 2006.
50. T. De Beer, A. Burggraeve, M. Fonteyne, L. Saerens, J.P. Remon i C. Vervaet, *Int. J. Pharm.* **417** (2011) 32–47.
51. D. A. Burns i E. W. Ciurczak, *Handbook of near infrared analysis, third edition*, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2008.
52. M. Jamrógiewicz, *J. Pharmaceut. Biomed.* **66** (2012) 1–10.
53. http://www.mep.net.au/wpmep/wpcontent/uploads/2013/05/MEP_Monograph_NIRS_81085026EN.pdf (preuzeto 14. kolovoza 2017. god.)
54. H. W. Siesler, Y. Ozaki, S. Kawata i H. M. Heise, *Near-infrared spectroscopy: Principles, Instruments, Applications*, Wiley VCH, Weinheim, 2002.
55. G. Reich, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **57** (2005) 1109–1143.
56. The United State Pharmacopoeia, USP 40 – NF 35 (2017), *1119 Near-infrared spectrophotometry,* U.S. Pharmacopoeial Convention, Rockville, 2016.
57. R. P. Cogdill, C. A. Anderson, M. D. Lopez, D. Molseed, R. Chisholm, R. Bolton, T. Herkert, A. M. Afnán i J. K. Drennen III, *AAPS. PharmSciTech* **6(2)** (2005) 262–272.
58. M. Alcalá, M. Blanco, D. Moyano, N. W. Broad, N. O'Brien, D. Friedrich, F. Pfeifer, i H. W. Siesler, *J. Near Infrared Spec.* **21** (2013) 445–457.
59. http://struna.ihjj.hr/search-do/?q=kemometrika&naziv=1&polje=0#container (preuzeto 15. kolovoza 2017. god.)
60. Z. Xiaobo, Z. Jiewen, M. J. W. Povey, M. Holmes i M. Hanpin, *Anal. Chim. Acta* **667** (2010) 14–32.
61. Y. Roggo, P. Chalus, L. Maurer, C. L. Martinez, A. Edmond i N. Jent, *J. Pharmaceut. Biomed.* **44** (2007) 683–700.
62. EMEA, CHMP, CVMP, QWP, *Guideline on the use of near infrared spectroscopy by the pharmaceutical industry and the data requirements for new submissions and variations*, London, UK, 2014.

63. The United State Pharmacopoeia, USP 40 – NF 35 (2017), *1039 Chemometrics,* U.S. Pharmacopoeial Convention, Rockville, 2016.
64. A. Candolfi, R. De Maesschalck, D. J. Rimbaud, P. A. Hailey i D. L. Massart, *J. Pharmaceut. Biomed.* **21** (1999) 115–132.
65. T. Rajalahti i O. M. Kvalheim, *Int. J. Pharm.* **417** (2011) 280–290.
66. J. Luypaert, D.L. Massart i Y. Vander Heyden, *Talanta* **72** (2007) 865–883.
67. S. Wold, M. Sjöström i L. Erikkson, *Chemometr. Intell. Lab.* **58** (2001) 109–130.
68. N. Zhao, Z. Wu, Q. Zhang, X. Shi, Q. Ma i Y. Qiao, *Sci. Rep.-UK* **5:11647** (2015) 1–10.
69. C. De Bleye, P.-F. Chavez, J. Mantanus, R. Marini, Ph. Hubert, E. Rozet i E. Ziemons, *J. Pharmaceut. Biomed.* **69** (2012) 125–132.
70. N. Broad, P. Graham, P. Hailey, A. Hardy, S. Holland, S. Hughes, D. Lee, K. Prebble, N. Salton i P. Warren, *Guidelines for the development and validation of near-infrared spectroscopic methods in the pharmaceutical industry*, John Wiley & Sons, Chichester, 2002.
71. H. Mark, G. E. Ritchie, R. W. Roller, E. W. Ciurczak, C. Tso i S. A. MacDonald, *J. Pharmaceut. Biomed.* **28** (2002) 251–260.
72. G. E. Ritchie, R. W. Roller, E. W. Ciurczak, H. Mark, C. Tso i S. A. MacDonald, *J. Pharmaceut. Biomed.* **29** (2002) 159–171.
73. J. A. Farrell, K. Higgins i J. H. Kalivas, *J. Pharmaceut. Biomed.* **61** (2012) 114–121.
74. Y. Sulub, R. LoBrutto, R. Vivilecchia i B. Wabuyele, *Vib. Spetrosc.* **46** (2008) 128–134.
75. Y. Sulub, R. LoBrutto, R. Vivilecchi i B. Wabuyele, *Anal. Chim. Acta* **611** (2008) 143–150.
76. S. S. Rosa, P. A. Barata, J. M. Martins i J. C. Menzes, *Talanta* **75** (2008) 725–733.
77. I. C. Wang, M. J. Lee, D. Y. Seo, H. E. Lee, Y. Choi, W. S. Kim, C. S Kim, M. Y. Jeong i G. J. Choi, *AAPS. PharmSciTech* **12(2)** (2011) 764–770.
78. K. M. Morisseau i C. T. Rhodes, *Pharm. Res.* **14(1)** (1997) 108–111.
79. Y. Roggo, C. Roeseler i M. Ulmschneider, *J. Pharmaceut. Biomed.* **36** (2004) 777–786.
80. P. L. Guorong, W. Cai i X. Shao, *J. Pharmaceut. Biomed.* **70** (2012) 288–294.
81. W. L. Yoon, R. D. Jee, A. Charvill, G. Lee i A. C. Moffat, *J. Pharmaceut. Biomed.* **34** (2004) 933–944.

82. O. Ye. Rodionova, K. S. Balyklova, A. V. Titova i A. L. Pomerantsev, *J. Pharmaceut. Biomed.* **98** (2014) 186–192.
83. O. Ye. Rodionova i A. L. Pomerantsev, *Trends Anal. Chem.* **29 (8)** (2010) 795–803.
84. The Rules Governing Medicinal Products in the European Union: *Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use*, Volume 4, Chapter 5, Bruxelles.
85. M. J. Vredenbregt, P. W. J. Caspers, R. Hoogerbrugge i D. M. Barends, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **56** (2003) 489–499.
86. O. Ye. Rodionova, Y. V. Sokovikov i A. L. Pomerantsev, *Anal. Chim. Acta* **642** (2009) 222–227.
87. K. Krämer i S. Ebel, *Anal. Chim. Acta* **420** (2000) 155–161.
88. A. Candolfi, R. De Maesschalck, D. L. Massart P. A. Hailey i A. C. E. Harrington *J. Pharmaceut. Biomed.* **19** (1999) 923–935.
89. L. Alvarenga, D. Ferreira, D. Altekruse, J.C. Menezes i D. Lochmann, *J. Pharmaceut. Biomed.* **48** (2008) 62–69.
90. T. E. Elizarova, S. V. Shtyleva, i T. V. Pleteneva, *Pharm. Chem. J.* **42(7)** (2008) 51–53.
91. M. J. Vredenbregt, L. Blok-Tip, R. Hoogerbrugge, D.M. Barends i D. de Kaste, *J. Pharmaceut. Biomed.* **40** (2006) 840–849.
92. I. Baer, R. Gurny i P. Margot, *Forensic Sci. Int.* **167** (2007) 234–241.
93. M. Otsuka, Y. Kanai i Y. Hattori, *J. Pharm. Sci.* **103** (2014) 2924–2936.
94. D. Mainali, J. Li, P. Yehl i N. Chetwyn, *J. Pharmaceut. Biomed.* **95** (2014) 169–175.
95. M. H. Ferreira, J. W. B. Braga i M. M. Sena, *Microchem. J.* **109** (2013) 158–164.
96. D. Pan, G. Crull, S. Yin i J. Grosso, *J. Pharmaceut. Biomed.* **89** (2014) 268–275.
97. E. Ziémons, J. Mantanus, P. Lebrun, E. Rozet, B. Evrard i Ph. Hubert, *J. Pharmaceut. Biomed.* **53** (2010) 510–516.
98. C. P. Meza, M. A. Santos i R. J. Romañach, *AAPS. PharmSciTech* **7(1)** (2006) 1–9.
99. M. Ito, T. Suzuki, S. Yada, H. Nakagami, H. Teramoto, E. Yonemochi i K. Terada, *J. Pharmaceut. Biomed.* **53** (2010) 396–402.
100. A. L. V. Gligor, T. Casain, A. Reznek, I. Tomuta i F. Gligor, *Farmacia* **63(3)** (2015) 381–387.
101. M. Blanco, A. Peguero, *Trends Anal. Chem.* **29 (10)** (2010) 1127–1136.
102. N. Chieng, T. Rades i J. Aaltonen, *J. Pharmaceut. Biomed.* **55** (2011) 618–644.

103. M. Otsuka, F. Kato, Y. Matsuda i Y. Ozaki, *AAPS. PharmSciTech* **4(2)** (2003) 1–12.

104. M. Blanco i A. Villar, *J. Pharm. Sci.* **92(4)** (2003) 823–830.

105. M. Blanco, R. Cueva-Mestanza i A. Peguero, *J. Pharmaceut. Biomed.* **51** (2010) 797–804.

106. E. Peeters, A. F. Tavares da Silva, M. Toiviainen, J. Van Renterghem, J. Vercruysse, M. Juuti, J. A. Lopes, T. De Beer, C. Vervaet i J. P. Remon, *Asian J. Pharm.* **11(4)** (2016) 547-558.

107. U.S. Department of health and human services food and drug administration, Center for drug evaluation and research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), Office of Regulatory Affairs (ORA), *Guidance for industry*, *PAT — A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance,* September 2004.

108. K. A. Bakeev, *Process Analytical Technology, second ed., Spectroscopic tools and implementation strategies for the chemical and pharmaceutical industries,* John Wiley & Sons, New York 2010.

109. R. B. Shah. M. A. Tawakkul i M. A. Khan, *J. Pharm. Sci.* **96 (5)** (2007) 1356–1365.

110. A. Peinado, J. Hammond i A. Scott, *J. Pharmaceut. Biomed.* **54** (2011) 13–20.

111. A. R. Jiménez, C. V. Figueroa i M. T. A. Morantes, *Ingeniería y Dessarolo,* **31** (2013) 120–134.

112. D.M. Koller, A. Posch, G. Hörl, C. Voura, S. Radl, N. Urbanetz, S.D. Fraser, W. Tritthart, F. Reiter, M. Schlingmann i J.G. Khinast, *Powder Technol.* **205** (2011) 87–96.

113. S. Matero, F. Van den Berg, S. Poutiainen, J. Rantanen i J. Pajander, *J. Pharm. Sci.* **102 (5)** (2013) 1385–1403.

114. A. D. Karande, P. W. S. Heng i Celine V. Liew, *Int. J. Pharm*. **396** (2010) 63–74.

115. L. Martínez, A. Peinado i L. Liesum, *Int. J. Pharm*. **451** (2013) 67–75.

116. A. Heinz, C. J. Strachan, K. C. Gordon i T. Rades, *J. Pharm. Pharmacol.* **61** (2009) 971–988.

117. M. Römer, J. Heinämäki, C. Strachan, N. Sandler i J. Yliruusi, *AAPS PharmSciTech* **9(4)** (2008) 1047–1053.

118. M. Andersson, M. Josefson, F.W. Langkilde i K.-G. Wahlund, *J. Pharmaceut. Biomed.* **20** (1999) 27–37.

119. M. Blanco, M. Alcalá, J. M. González i E. Torras, *J. Pharm. Sci.* **95 (10)** (2006) 2137–2144.

120. A. Pestieau, F. Krier, G. Thoorens, A. Dupont, P. F. Chavez, E. Ziemons, P. Hubert i B. Evrard, *J. Pharmaceut. Biomed.* **98** (2014) 60–67.

121. J. Märk, M. Andre, M. Karner, C. W. Huck, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **76** (2010) 320–327.

122. E. Hernandez, P. Pawar, G. Keyvan, Y. Wang, N. Velez, G. Callegari, A. Cuitino, B. Michniak-Kohn, F. J. Muzzio i R. J. Romanach, *J. Pharmaceut. Biomed.* **117** (2016) 568–576.

123. European Pharmacopoeia (Ph.Eur.) 9th edition, *Allopurinol* Council of Europe, Strasbourg, 2016.

124. E. M. Samy, M. A. Hassan, S. S. Tous i C. T. Rhodes, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **49** (2000) 119–127.

125. V. S. Patel i W. G. Kramer, *J. Pharm. Sci.* **75(3)** (1986) 275–277.

126. http://www.halmed.hr/lijekovi/Baza-lijekova#rezultati (preuzeto 15. kolovoza 2017. god.)

127. M. K. Reinders, L. C. Nijdam, E. N. van Roon, K. L. L. Movig, T. L.Th. A. Jansen, M. A. F. J. van de Laar i J. R. B. J. Brouwers, *J. Pharmaceut. Biomed.* **45** (2007) 312–317.

128. M. S. Refat, G. G. Mohamed i A. Fathi, *Bull. Korean Chem. Soc.* **31(6)** (2010) 1535–1542.

129. F. Runa, M. R. Sarkar, R. Sultana, K. Jahan i Z. K. Labu, *J. Biomed. Pharm. Res.* **2(3)** (2013) 1–7.

130. M. G. Abd El-Wahed, M.S. Refat, S.M. El-Megharbel, *J. Mol. Struct.* **888** (2008) 416–429.

131. The United State Pharmacopoeia, USP 40 - NF 35 (2017), *Allopurinol tablets,* U.S. Pharmacopoeial Convention, Rockville, 2016.

132. H. Abe, M. Otsuka, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **38** (2012) 412–419.

133. M. Otsuka, I. Yamane, *J. Pharm. Sci.* **98(11)** (2009) 4296–4305.

134. L. G. Weyer, S.-C. Lo, *Spectra-Structure Correlations in the Near-infrared*, in J. M. Chalmers, P. R. Griffiths (Eds.), Handbook of Vibrational Spectroscopy, John Wiley & Sons Ltd, 2002.

135. S. Petit, R. Martin, A. Wiewiora, P. De Parseval, A, Decarreau, *Am. Mineral.* **89** (2004) 319–326.

§ 8. PRILOZI

Tablica P1. Referentne vrijednosti oslobađanja alopurinola iz tableta Alopurinol 200 mg.

Serija	Broj uzoraka	*t* / min	Oslobađanje / %			
			Pojedinačne vrijednosti	Srednja vrijednost	SD	RSD
A1	3	5	70,1; 56,1; 64,6	63,6	7,1	11,1
		10	89,7; 80,3; 88,4	86,1	5,1	5,9
		15	95,2; 91,6; 95,4	94,1	2,2	2,3
		20	96,7; 98,0; 98,3	97,7	0,9	0,9
		30	97,8; 99,6; 98,3	98,6	0,9	0,9
		45	97,9; 100,8; 98,8	99,2	1,5	1,5
A2	6	5	23,8; 15,2; 12,9; 29,3; 8,4; 7,8	16,2	8,6	53,2
		10	37,5; 20,3; 31,7; 59,4; 17,4; 17,3	30,6	16,3	53,4
		15	45,9; 28,7; 45,7; 79,2; 28,4; 32,4	43,4	19,3	44,4
		20	53,0; 38,4; 57,2; 89,0; 34,0; 43,5	52,5	19,9	37,9
		30	69,0; 51,0; 81,5; 95,7; 44,2; 69,0	68,4	19,0	27,8
		45	83,5; 59,5; 92,7; 96,9; 54,8; 82,3	78,3	17,3	22,1
A3	3	5	51,8; 44,7; 54,2	50,3	5,0	9,8
		10	79,6; 80,3; 83,9	81,3	2,3	2,9
		15	87,1; 87,7; 90,8	88,6	2,0	2,2
		20	91,0; 91,1; 93,4	91,8	1,4	1,5
		30	94,2; 95,7; 95,4	95,1	0,8	0,9
		45	95,6; 97,8; 97,7	97,0	1,3	1,3
A4	3	5	34,3; 32,4; 39,1	35,3	3,5	9,8
		10	66,5; 63,0; 74,9	68,1	6,1	9,0
		15	80,9; 80,2; 85,5	82,2	2,9	3,5
		20	90,2; 89,6; 89,1	89,6	0,6	0,7
		30	95,9; 95,6; 94,3	95,3	0,9	0,9
		45	98,0; 97,7; 96,0	97,2	1,1	1,1
A5	3	5	41,4; 33,1; 26,5	33,7	7,4	22,1
		10	71,0; 70,7; 65,2	69,0	3,3	4,7
		15	83,3; 82,1; 79,8	81,7	1,8	2,2
		20	89,4; 86,6; 87,1	87,7	1,5	1,7
		30	91,2; 90,0; 91,0	90,7	0,7	0,7
		45	98,6; 95,2; 96,3	96,7	1,8	1,8
A6	3	5	59,4; 59,3; 63,3	60,6	2,3	3,7
		10	82,4; 82,1; 83,8	82,8	0,9	1,1
		15	86,4; 88,3; 90,6	88,4	2,1	2,4
		20	88,6; 90,1; 91,3	90,0	1,4	1,5
		30	91,5; 92,3; 92,8	92,2	0,6	0,7
		45	97,4; 98,0; 96,4	97,3	0,8	0,8
A7	3	5	66,5; 60,9; 68,7	65,4	4,0	6,1
		10	85,6; 86,2; 83,4	85,1	1,5	1,7
		15	93,0; 93,2; 92,7	92,9	0,2	0,2
		20	97,5; 95,1; 95,6	96,1	1,3	1,3
		30	98,2; 97,9; 97,1	97,7	0,6	0,6
		45	99,8; 99,4; 97,1	98,8	1,5	1,5
A8	3	5	65,2; 58,9; 73,5	65,9	7,3	11,1
		10	83,7; 79,5; 86,2	83,2	3,4	4,1

Serija	Broj uzoraka	*t* / min	Oslobađanje / %			
			Pojedinačne vrijednosti	Srednja vrijednost	SD	RSD
		15	91,8; 88,4; 90,7	90,3	1,8	1,9
		20	93,4; 91,5; 93,4	92,8	1,1	1,2
		30	96,0; 94,5; 96,2	95,6	0,9	1,0
		45	96,7; 95,1; 96,7	96,1	0,9	1,0
A10	3	5	61,3; 52,9; 62,0	58,7	5,1	8,6
		10	83,0; 83,9; 84,1	83,7	0,6	0,7
		15	92,4; 92,5; 90,6	91,8	1,1	1,2
		20	95,8; 96,6; 94,3	95,6	1,2	1,2
		30	99,7; 100,3; 98,2	99,4	1,1	1,1
		45	99,9; 100,7; 98,9	99,9	0,9	0,9
A12	3	5	71,5; 71,5; 81,4	74,8	5,7	7,7
		10	90,9; 94,2; 96,7	93,9	2,9	3,1
		15	95,9; 99,1; 99,6	98,2	2,0	2,1
		20	99,0; 99,6; 99,9	99,5	0,5	0,5
		30	101,3; 101,9; 100,6	101,3	0,6	0,6
		45	101,3; 101,9; 101,6	101,6	0,3	0,3
A14	3	5	57,4; 57,7; 51,0	55,4	3,8	6,8
		10	79,3; 79,8; 80,8	79,9	0,8	1,0
		15	92,2; 97,6; 93,0	94,3	2,9	3,1
		20	94,7; 97,6; 97,1	96,5	1,6	1,5
		30	97,1; 99,2; 99,9	98,8	1,5	1,5
		45	97,1; 99,4; 99,9	98,8	1,5	1,5
A15	3	5	55,3; 61,3; 53,8	56,8	4,0	7,0
		10	82,1; 85,5; 79,6	82,4	2,9	3,6
		15	92,9; 91,6; 89,6	91,4	1,7	1,8
		20	97,2; 95,1; 94,2	95,5	1,6	1,6
		30	99,0; 96,0; 98,2	97,7	1,5	1,6
		45	99,6; 97,3; 98,2	98,4	1,2	1,2
A16	3	5	24,3; 30,3; 35,9	30,2	5,8	19,3
		10	34,9; 53,7; 60,4	49,7	13,2	26,5
		15	34,9; 68,3; 82,9	62,0	24,6	39,7
		20	41,1; 76,6; 92,3	70,0	26,2	37,5
		30	66,4; 84,7; 96,3	82,5	15,1	18,3
		45	78,9; 92,8; 96,3	89,3	9,2	10,3
A18	3	5	48,7; 32,1; 31,6	37,5	9,7	26,0
		10	80,5; 73,5; 72,9	75,7	4,2	5,6
		15	91,4; 88,7; 90,2	90,1	1,3	1,5
		20	94,1; 95,0; 96,2	95,1	1,1	1,1
		30	98,3; 97,8; 99,5	98,5	0,8	0,8
		45	98,3; 99,1; 100,2	99,2	1,0	1,0
A19	3	5	25,6; 31,3; 26,1	27,7	3,2	11,5
		10	50,2; 63,2; 62,9	58,8	7,5	12,7
		15	72,7; 86,6; 90,2	83,2	9,2	11,1
		20	90,0; 97,6; 97,4	95,0	4,4	4,6
		30	100,5; 98,7; 100,6	99,9	1,1	1,1
		45	102,2; 100,4; 100,6	101,1	1,0	1,0
A21	3	5	60,0; 65,3; 61,9	62,4	2,7	4,4
		10	86,8; 88,3; 86,9	87,3	0,8	1,0
		15	93,7; 94,0; 94,4	94,1	0,3	0,3
		20	95,0; 96,3; 95,5	95,6	0,7	0,7
		30	95,5; 97,2; 96,5	96,4	0,9	0,9
		45	98,0; 98,2; 98,4	98,2	0,2	0,2

Serija	Broj uzoraka	*t* / min	Oslobađanje / %			
			Pojedinačne vrijednosti	Srednja vrijednost	SD	RSD
A22	3	5	60,5; 63,4; 67,8	63,9	3,7	5,7
		10	85,5; 84,5; 86,6	85,5	1,1	1,2
		15	95,1; 92,3; 92,7	93,4	1,5	1,6
		20	95,9; 93,4; 94,9	94,8	1,3	1,3
		30	97,3; 97,2; 97,4	97,3	0,1	0,1
		45	97,5; 99,2; 97,5	98,1	1,0	1,0
A23	3	5	67,7; 75,4; 66,0	69,7	5,0	7,2
		10	85,3; 89,5; 86,4	87,1	2,2	2,5
		15	94,1; 92,2; 90,8	92,4	1,7	1,8
		20	97,8; 93,7; 92,6	94,7	2,7	2,9
		30	98,6; 94,5; 95,1	96,1	2,2	2,3
		45	100,0; 95,7; 96,1	97,2	2,4	2,5
B4	3	5	62,2; 60,0; 68,8	63,7	4,6	7,2
		10	92,2; 90,3; 90,0	90,8	1,2	1,3
		15	97,0; 96,5; 92,9	95,5	2,2	2,3
		20	97,9; 99,4; 95,0	97,5	2,2	2,3
		30	99,8; 99,7; 96,8	98,8	1,7	1,8
		45	99,8; 101,1; 99,7	100,2	0,8	0,8
B5	3	5	64,8; 61,7; 69,3	65,3	3,8	5,8
		10	92,0; 90,2; 92,0	91,4	1,1	1,2
		15	96,2; 96,6; 97,1	96,6	0,5	0,5
		20	97,8; 99,6; 99,0	98,8	0,9	0,9
		30	98,5; 100,4; 99,6	99,5	1,0	1,0
		45	99,9; 100,4; 99,6	100,0	0,4	0,4
B6	3	5	66,9; 65,5; 52,9	61,8	7,7	12,5
		10	87,2; 93,7; 90,3	90,4	3,3	3,6
		15	93,3; 96,0; 96,7	95,4	1,8	1,9
		20	95,8; 98,4; 98,3	97,5	1,5	1,5
		30	98,4; 99,5; 99,4	99,1	0,7	0,7
		45	98,4; 99,5; 99,4	99,1	0,7	0,7
B7	3	5	56,3; 66,2; 62,2	61,6	5,0	8,0
		10	87,7; 92,8; 90,2	90,2	2,5	2,8
		15	96,3; 95,9; 96,5	96,2	0,3	0,3
		20	98,0; 97,1; 98,1	97,7	0,5	0,6
		30	98,8; 98,2; 99,7	98,9	0,8	0,8
		45	100,5; 98,3; 99,7	99,5	1,1	1,1
B8	3	5	68,4; 69,4; 71,0	69,6	1,3	1,9
		10	84,5; 86,1; 84,1	84,9	1,1	1,3
		15	90,5; 93,2; 92,6	92,1	1,4	1,6
		20	93,2; 95,0; 95,1	94,4	1,0	1,1
		30	94,8; 95,8; 96,1	95,6	0,7	0,7
		45	95,0; 97,1; 98,1	96,7	1,6	1,7
B9	3	5	74,7; 81,0; 83,7	79,8	4,6	5,8
		10	92,5; 92,6; 95,0	93,4	1,4	1,5
		15	98,2; 97,1; 99,1	98,1	1,0	1,0
		20	100,1; 98,4; 100,5	99,7	1,1	1,1
		30	100,1; 99,1; 100,8	100,0	0,9	0,9
		45	100,1; 99,5; 101,7	100,4	1,1	1,1
B9N	3	5	77,3; 82,8; 74,6	78,3	4,2	5,3
		10	92,2; 91,4; 86,6	90,1	3,1	3,4
		15	94,3; 96,0; 89,9	93,4	3,2	3,4
		20	96,9; 96,0; 93,0	95,3	2,0	2,1

Serija	Broj uzoraka	*t* / min	Oslobađanje / %			
			Pojedinačne vrijednosti	Srednja vrijednost	SD	RSD
		30	97,0; 98,6; 96,2	97,3	1,2	1,3
		45	100,3; 99,3; 96,9	98,8	1,8	1,8
B9V	3	5	75,7; 78,6; 73,5	75,9	2,6	3,4
		10	87,4; 89,5; 85,1	87,3	2,2	2,6
		15	92,4; 95,8; 92,8	93,7	1,9	2,0
		20	95,4; 97,4; 98,0	96,9	1,4	1,4
		30	97,3; 100,0; 99,4	98,9	1,4	1,5
		45	97,4; 100,0; 99,4	98,9	1,4	1,4
B9P	3	5	76,5; 73,7; 74,5	74,9	1,5	2,0
		10	87,2; 92,4; 86,9	88,8	3,1	3,5
		15	92,4; 94,8; 90,0	92,4	2,4	2,6
		20	97,1; 96,0; 93,8	95,6	1,7	1,8
		30	99,2; 98,0; 97,0	98,1	1,1	1,1
		45	100,7; 98,7; 97,0	98,8	1,9	1,9
B9U	3	5	79,8; 77,9; 78,6	78,8	1,0	1,3
		10	93,5; 90,8; 89,6	91,3	2,0	2,2
		15	97,4; 96,8; 93,7	96,0	2,0	2,1
		20	97,4; 96,8; 94,1	96,1	1,8	1,8
		30	97,4; 96,8; 96,2	96,8	0,6	0,6
		45	98,6; 97,5; 98,5	98,2	0,6	0,7
B10	3	5	63,6; 66,9; 68,4	66,3	2,5	3,7
		10	81,0; 86,1; 86,8	84,6	3,2	3,7
		15	89,3; 91,8; 93,4	91,5	2,1	2,3
		20	91,3; 94,0; 94,8	93,4	1,9	2,0
		30	96,6; 95,5; 97,1	96,4	0,8	0,9
		45	98,1; 97,5; 98,8	98,1	0,6	0,6
B10N	3	5	57,2; 62,5; 71,3	63,7	7,1	11,2
		10	78,1; 79,4; 85,7	81,1	4,1	5,0
		15	89,1; 86,4; 90,2	88,6	2,0	2,2
		20	93,1; 91,5; 92,3	92,3	0,8	0,9
		30	94,4; 95,7; 94,9	95,0	0,6	0,7
		45	96,7; 97,7; 96,7	97,0	0,6	0,6
B10V	3	5	41,2; 48,5; 59,3	49,7	9,1	18,3
		10	78,3; 80,7; 83,3	80,8	2,5	3,1
		15	89,9; 87,4; 89,9	89,1	1,5	1,7
		20	92,5; 89,7; 93,2	91,8	1,9	2,0
		30	94,6; 93,2; 95,4	94,4	1,1	1,2
		45	95,7; 93,9; 96,9	95,5	1,5	1,6
C1	6	5	62,6; 61,6; 61,4; 54,2; 54,5; 73,5	61,3	7,0	11,5
		10	82,7; 88,4; 88,3; 80,0; 86,0; 89,4	85,8	3,7	4,4
		15	92,6; 95,8; 98,5; 91,2; 95,8; 96,8	95,1	2,7	2,9
		20	96,7; 97,6; 98,6; 93,6; 98,0; 97,4	97,0	1,8	1,9
		30	96,7; 99,7; 100,0; 97,3; 100,6; 97,9	98,7	1,6	1,6
		45	101,2; 101,0; 101,4; 99,8;100,6; 99,3	100,6	0,8	0,8
C3	3	5	78,7; 68,0; 77,3	74,7	5,8	7,8
		10	90,9; 85,0; 88,0	88,0	2,9	3,3
		15	95,1; 90,8; 92,6	92,8	2,2	2,4
		20	97,6; 93,9; 93,2	94,9	2,4	2,5
		30	98,6; 96,0; 95,0	96,6	1,8	1,9
		45	99,6; 96,1; 96,0	97,3	2,1	2,1
C4	3	5	71,1; 74,8; 75,1	73,6	2,2	3,0
		10	89,6; 90,1; 90,0	89,9	0,3	0,3

Serija	Broj uzoraka	*t* / min	Oslobađanje / %			
			Pojedinačne vrijednosti	Srednja vrijednost	SD	RSD
		15	94,0; 93,7; 94,1	93,9	0,2	0,2
		20	96,9; 97,2; 96,9	97,0	0,2	0,2
		30	96,9; 97,3; 98,4	97,6	0,8	0,8
		45	97,8; 98,9; 98,9	98,5	0,6	0,6
C4ST	3	5	74,6; 75,1; 78,0	75,9	1,8	2,4
		10	89,5; 88,2; 93,2	90,3	2,6	2,9
		15	93,5; 94,0; 95,4	94,3	1,0	1,0
		20	94,9; 96,2; 96,0	95,7	0,8	0,8
		30	95,7; 97,9; 97,1	96,9	1,1	1,2
		45	98,2; 99,3; 98,5	98,7	0,6	0,6
C5	3	5	71,7; 75,2; 75,7	74,2	2,2	3,0
		10	87,7; 88,4; 88,5	88,2	0,4	0,5
		15	93,6; 93,2; 93,1	93,3	0,3	0,3
		20	97,5; 96,7; 95,6	96,6	1,0	1,0
		30	98,3; 97,9; 98,1	98,1	0,2	0,2
		45	99,6; 98,8; 99,4	99,3	0,4	0,4
C5ST	3	5	70,3; 61,7; 69,1	67,0	4,7	7,0
		10	88,4; 83,5; 90,0	87,3	3,4	3,9
		15	93,3; 89,0; 95,4	92,6	3,2	3,5
		20	94,6; 93,7; 98,1	95,5	2,3	2,5
		30	96,0; 95,1; 98,8	96,6	2,0	2,0
		45	97,6; 97,1; 100,7	98,5	2,0	2,0
D1	3	5	53,1; 68,4; 68,8	63,4	9,0	14,1
		10	84,3; 89,6; 87,2	87,0	2,6	3,0
		15	92,6; 97,4; 93,0	94,4	2,7	2,8
		20	94,9; 97,4; 96,8	96,4	1,3	1,4
		30	97,3; 100,7; 99,5	99,2	1,8	1,8
		45	98,6; 102,3; 99,5	100,1	1,9	1,9
E1	3	5	67,9; 66,1; 74,5	69,5	4,4	6,4
		10	82,7; 80,4; 82,6	81,9	1,3	1,6
		15	86,7; 86,7; 86,2	86,5	0,3	0,4
		20	88,2; 89,1; 89,2	88,8	0,6	0,6
		30	90,9; 92,6; 90,3	91,2	1,2	1,3
		45	92,7; 93,5; 91,3	92,5	1,1	1,2
E2	3	5	53,6; 30,1; 41,6	41,8	11,8	28,2
		10	92,5; 63,8; 86,9	81,1	15,2	18,8
		15	99,8; 91,7; 97,6	96,4	4,2	4,4
		20	103,5; 100,9; 101,1	101,9	1,4	1,4
		30	103,5; 102,6; 101,4	102,5	1,1	1,0
		45	103,5; 102,6; 102,0	102,7	0,8	0,7

Tablica P2. Referentne vrijednosti oslobađanja alopurinola iz tableta Alopurinol 100 mg.

Serija	Broj uzoraka	*t* / min	Oslobađanje / %			
			Pojedinačne vrijednosti	Srednja vrijednost	SD	RSD
A25	3	5	75,4; 77,5; 67,8	73,6	5,1	7,0
		10	90,5; 89,4; 84,9	88,3	3,0	3,4
		15	97,4; 93,0; 92,5	94,3	2,7	2,9
		20	98,6; 94,4; 96,1	96,4	2,1	2,2
		30	100,6; 96,0; 96,6	97,7	2,5	2,5
		45	100,6; 98,1; 96,8	98,5	1,9	1,9
A26	3	5	41,4; 62,5; 48,1	50,6	10,8	21,3
		10	80,8; 88,0; 82,0	83,6	3,9	4,6
		15	92,8; 94,3; 91,1	92,7	1,6	1,8
		20	94,2; 95,8; 93,4	94,4	1,2	1,3
		30	95,5; 97,8; 95,8	96,4	1,2	1,3
		45	96,6; 98,3; 97,1	97,3	0,9	0,9
A27	3	5	72,6; 85,6; 79,5	79,2	6,5	8,2
		10	93,1; 97,1; 94,9	95,1	2,0	2,1
		15	98,9; 100,4; 98,4	99,2	1,1	1,1
		20	99,3; 101,0; 99,0	99,8	1,1	1,1
		30	101,6; 101,3; 99,8	100,9	1,0	0,9
		45	101,6; 101,3; 100,0	101,0	0,9	0,8
A28	3	5	40,3; 44,9; 62,2	49,1	11,5	23,4
		10	72,9; 83,8; 89,3	82,0	8,3	10,2
		15	89,3; 95,4; 95,7	93,5	3,6	3,9
		20	94,4; 98,3; 96,6	96,4	1,9	2,0
		30	96,8; 99,8; 96,7	97,8	1,8	1,8
		45	98,1; 100,6; 98,8	99,2	1,3	1,3
B11V	3	5	40,5; 51,1; 46,7	46,1	5,3	11,5
		10	68,8; 74,1; 81,7	74,9	6,5	8,7
		15	91,2; 92,4; 94,3	92,6	1,6	1,7
		20	96,5; 95,8; 96,7	96,3	0,5	0,5
		30	96,6; 98,2; 96,9	97,2	0,8	0,9
		45	98,6; 99,7; 98,8	99,0	0,6	0,6
B11U	3	5	45,1; 58,6; 63,1	55,6	9,3	16,8
		10	83,3; 82,3; 89,2	84,9	3,7	4,4
		15	94,1; 95,9; 96,7	95,6	1,3	1,4
		20	96,8; 97,6; 97,8	97,4	0,5	0,6
		30	98,2; 99,4; 98,8	98,8	0,6	0,6
		45	98,2; 99,4; 99,1	98,9	0,6	0,6
B11	3	5	55,3; 48,3; 51,9	51,8	3,5	6,8
		10	84,8; 72,2; 74,8	77,3	6,6	8,6
		15	93,1; 86,9; 89,7	89,9	3,1	3,4
		20	96,5; 96,6; 95,9	96,3	0,4	0,4
		30	98,0; 99,4; 97,9	98,4	0,8	0,9
		45	98,9; 100,8; 99,2	99,6	1,0	1,0
B12S	3	5	35,0; 40,6; 41,5	39,0	3,5	9,0
		10	55,1; 59,8; 62,0	59,0	3,5	5,9
		15	66,9; 71,2; 72,7	70,2	3,0	4,3
		20	74,6; 77,9; 77,7	76,7	1,9	2,4
		30	83,3; 86,2; 85,1	84,9	1,5	1,7
		45	90,8; 93,0; 92,8	92,2	1,2	1,3
C6	3	5	78,3; 71,8; 82,4	77,5	5,3	6,9
		10	92,4; 90,8; 93,6	92,3	1,4	1,5

Serija	Broj uzoraka	*t* / min	Oslobađanje / %			
			Pojedinačne vrijednosti	Srednja vrijednost	SD	RSD
		15	95,3; 95,8; 96,3	95,8	0,5	0,5
		20	97,3; 97,9; 97,1	97,5	0,4	0,4
		30	99,3; 98,3; 98,9	98,8	0,5	0,5
		45	99,3; 99,1; 98,9	99,1	0,2	0,2
C7	3	5	77,0; 72,5; 71,0	73,5	3,1	4,2
		10	91,4; 87,5; 87,4	88,8	2,3	2,6
		15	96,1; 91,9; 92,9	93,6	2,2	2,4
		20	99,4; 97,3; 95,5	97,4	1,9	2,0
		30	101,3; 100,7; 100,2	100,7	0,6	0,6
		45	104,1; 102,2; 101,5	102,6	1,4	1,3
C8	3	5	73,5; 66,9; 68,7	69,7	3,4	4,8
		10	90,0; 89,8; 94,1	91,3	2,4	2,6
		15	96,4; 99,1; 98,9	98,1	1,5	1,5
		20	98,0; 99,5; 99,1	98,9	0,7	0,8
		30	98,4; 100,2; 100,9	99,8	1,3	1,3
		45	98,6; 100,4; 101,2	100,1	1,3	1,3
C8ST	3	5	55,7; 71,9; 75,2	67,6	10,4	15,5
		10	90,2; 91,7, 92,3	91,4	1,1	1,2
		15	95,4; 97,0; 96,7	96,4	0,8	0,8
		20	97,1; 97,7; 96,7	97,2	0,5	0,5
		30	100,2; 98,7; 97,9	98,9	1,2	1,2
		45	101,0; 100,4; 98,3	99,9	1,4	1,4
C9	3	5	76,4; 79,7; 90,0	82,0	7,1	8,6
		10	94,1; 92,5; 99,0	95,2	3,4	3,6
		15	98,6; 94,5; 101,9	98,4	3,7	3,8
		20	100,6; 97,0; 103,7	100,4	3,3	3,3
		30	102,5; 99,4; 103,7	101,9	2,2	2,2
		45	103,0; 100,3; 104,3	102,5	2,0	2,0
C9ST	3	5	78,5; 62,3; 81,1	74,0	10,2	13,7
		10	91,5; 85,1; 92,0	89,6	3,9	4,3
		15	98,1; 94,2; 95,7	96,0	2,0	2,0
		20	98,1; 97,2; 96,3	97,2	0,9	0,9
		30	98,3; 100,3, 98,5	99,0	1,1	1,1
		45	98,9, 100,4, 98,5	99,3	1,0	1,0
D2S	3	5	20,0; 21,2; 22,7	21,3	1,4	6,5
		10	42,5; 43,7; 44,8	43,7	1,1	2,6
		15	52,2; 55,1; 55,8	54,4	1,9	3,5
		20	59,9; 61,5; 62,6	61,4	1,4	2,2
		30	66,9; 67,6; 68,2	67,6	0,6	0,9
		45	75,7; 74,2; 76,7	75,5	1,3	1,7
D3	3	5	55,3; 60,2; 74,4	63,3	9,9	15,7
		10	89,6; 92,2; 99,9	93,9	5,4	5,7
		15	96,5; 98,4; 100,8	98,6	2,1	2,2
		20	98,2; 100,6; 101,9	100,2	1,9	1,9
		30	98,2; 101,3; 102,4	100,6	2,2	2,2
		45	100,9; 102,7; 102,5	102,1	1,0	1,0
D4	3	5	43,8; 55,1; 66,8	55,2	11,5	20,8
		10	83,6; 92,9; 96,3	90,9	6,6	7,2
		15	96,2; 98,0; 99,1	97,8	1,5	1,5
		20	100,3; 100,1; 99,8	100,1	0,2	0,2
		30	101,5; 100,1; 100,8	100,8	0,7	0,7
		45	102,1; 100,8; 101,8	101,6	0,7	0,7

Serija	Broj uzoraka	*t* / min	Oslobađanje / %			
			Pojedinačne vrijednosti	Srednja vrijednost	SD	RSD
D5	3	5	47,9; 49,7; 53,5	50,4	2,9	5,7
		10	81,0; 81,3; 88,7	83,7	4,4	5,2
		15	92,1; 95,8; 96,9	94,9	2,5	2,7
		20	97,0; 98,3; 97,5	97,6	0,7	0,7
		30	98,1; 100,5; 101,6	100,1	1,8	1,8
		45	99,5; 101,9; 101,7	101,0	1,3	1,3
D6	6	5	42,9; 61,2; 68,4; 50,0; 78,3; 77,8	63,1	14,5	23,0
		10	87,9; 94,3; 97,0; 82,3; 96,6; 97,6	92,6	6,2	6,7
		15	98,6; 98,2; 99,9; 96,2; 98,1; 99,8	98,5	1,4	1,4
		20	100,8; 99,1; 100,2; 98,2; 98,7; 99,9	99,5	1,0	1,0
		30	103,4; 100,4; 101,2; 99,6; 100,3; 101,6	101,1	1,3	1,3
		45	103,4; 100,4; 101,5; 101,0; 100,4; 101,6	101,4	1,1	1,1
E3	3	5	33,0; 38,4; 36,0	35,8	2,7	7,6
		10	89,9; 89,0; 89,3	89,4	0,5	0,5
		15	101,6; 98,6; 98,8	99,6	1,7	1,7
		20	102,0; 100,2; 100,5	100,9	1,0	1,0
		30	102,0; 100,2; 100,5	100,9	1,0	1,0
		45	102,0; 100,2; 100,5	100,9	1,0	1,0
E4	3	5	36,4; 24,1; 58,0	39,5	17,2	43,5
		10	85,5; 65,0; 90,2	80,2	13,4	16,7
		15	98,1; 97,9; 99,0	98,3	0,6	0,6
		20	99,8; 102,0; 100,4	100,7	1,2	1,2
		30	99,8; 102,5; 100,4	100,9	1,4	1,4
		45	100,0; 102,5; 100,4	101,0	1,3	1,3

Tablica P3. Rezultati izmjerene tvrdoće tableta Alopurinol 100 mg i Alopurinol 200 mg.

Doza / mg	Serija	Tvrdoća / N
200	A22	83
	B9	82
	B9N	54
	B9V	100
	B10	71
	B10N	55
	B10V	90
	C1	74
	C5	68
	D1	72
	E1	78
	E2	78
100	A25	36
	A26	65
	A28	103
	B11	61
	B11N	30
	B11V	75
	B12S	40
	D2S	43
	D3	74
	E3	68

§ 9. ŽIVOTOPIS

Jelena Smetiško rođena je 06. prosinca 1983. godine u Koprivnici, a živi u Križevcima. Osnovnu školu završila je u Križevcima. Godine 1998. upisuje Prirodoslovno-matematičku gimnaziju Ivana Zakmardija Dijankovečkoga u Križevcima. Godine 2002. upisuje Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu koji završava 25.01.2008. i stječe titulu diplomiranog inženjera kemije. Od 17.03.2008. godine zaposlena je Belupu d.d. lijekovi i kozmetika u sektoru Istraživanje i razvoj. Trenutno radi u odjelu Analitički laboratoriji kao Glavni tehnolog analitičar. Godine 2011. upisuje Sveučilišni poslijediplomski doktorski studij kemije. Doktorski rad izrađuje u Belupu uz mentorstvo izv. prof. dr. sc. Snežane Miljanić sa Zavoda za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Koautor je dva znanstvena rada objavljena u CC časopisima. Sudjelovala je na prvom Simpoziju studenata doktorskih studija PMF-a 2016. godine s posterskim priopćenjem: „Primjena NIR spektroskopije u istraživanju otpuštanja alopurinola iz neobloženih tableta s trenutnim oslobađanjem“.

Objavljeni radovi u CC časopisima:

1. J. Smetiško i S. Miljanić, *Dissolution assessment of allopurinol immediate release tablets by near infrared spectroscopy, J. Pharmaceut. Biomed.* **145** (2017) 322–330.
2. S. Rončević, L. Pitarević Svedružić, J. Smetiško i D. Medaković, *ICP-AES analysis of metal content in shell of mussel Mytilus galloprovincialis from Croatian coastal waters, Int. J. Environ. An. Ch.* **90 (08)** (2010) 620–632.